UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
FLÁVIA DE SOUZA FERNANDES

ÁCIDO BETULÍNICO APLICADO SOBRE A PELE DE CAMUNDONGOS COM LESÕES PSORIASIFORMES INDUZIDAS POR IMIQUIMODE: EFEITOS LOCAIS, BIOSSINALIZAÇÃO E EFEITOS POTENCIALMENTE ADVERSOS

Palhoça
2020

FLÁVIA DE SOUZA FERNANDES

ÁCIDO BETULÍNICO APLICADO SOBRE A PELE DE CAMUNDONGOS COM LESÕES PSORIASIFORMES INDUZIDAS POR IMIQUIMODE: EFEITOS LOCAIS, BIOSSINALIZAÇÃO E EFEITOS POTENCIALMENTE ADVERSOS

LINHA DE PESQUISA:
Estudos e desenvolvimento de medicamentos e produtos para a saúde

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientador: Maicon Roberto Kviecinski, Dr.
Co-orientadora: Verônica Vargas Horewicz, Dra.

Palhoça
2020

F39 Fernandes, Flávia de Souza, 1981-
Ácido betulínico aplicado sobre a pele de camundongos com lesões psoriasiformes induzidas por imiquimode: efeitos locais, biossinalização e efeitos potencialmente adversos/ Flávia de Souza Fernandes. – 2020.
217 f. : il. color. ; 30 cm

Tese (Doutorado) – Universidade do Sul de Santa Catarina, Pós-graduação em Ciências da Saúde.
Orientação: Prof. Dr. Maicon Roberto Kviecinski
Coorientação: Profa. Dra. Verônica Vargas Horewicz

1. Psoríase - Tratamento. 2. Ácido betulínico. 3. Tratamento sobre a pele. 4. Lesões psoriasiformes. I. Kviecinski, Maicon Roberto. II. Horewicz, Verônica Vargas. III. Universidade do Sul de Santa Catarina. IV. Título.

CDD (21. ed.) 616.526

Ficha catalográfica elaborada por Alessandra Pires CRB 14/809

unisul
Universidade

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - DOUTORADO

Título da Tese

Ácido betulínico aplicado sobre a pele de camundongos com lesões psoriasiformes induzidas por imiquimode: efeitos locais, biossinalização e efeitos potencialmente adversos

FLÁVIA DE SOUZA FERNANDES
AUTOR

Aprovado pela Banca Avaliadora de Defesa da Tese em 06 de novembro de 2020.

Doutor **Maicon Roberto Kviecinski** (Orientador) Maicon Kviecinski

Doutor **Adriano Martendal** (Avaliador externo – IFC) – *presente por videoconferência*

Doutora **Fabiana Ourique da Silva** (Avaliador externo – UFSC) – *presente por videoconferência*

Doutor **Daniel Fernandes Martins** (Avaliador interno – PPGCS) – *presente por videoconferência*

Doutora **Franciane Bobinski** (Avaliador interno - PPGCS) – *presente por videoconferência*

Professor Doutor Jefferson Luiz Truebert
COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - UNISUL

Aos meus pais adotivos Terezinha de Souza Fernandes e Aníbal Costa Almeida (in memoriam) que eram analfabetos funcionais, mas ensinaram-me a linguagem do amor, o mais belo que a caligrafia e mais importante que tudo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu esposo, Alexandre Vanzuita, por estar sempre ao meu lado, incentivando-me a prosseguir na vida acadêmica e fazendo-me acreditar que posso mais do que imagino. Obrigada por ter feito do meu sonho o nosso sonho.

Aos amores da minha vida, Miriã Tamilli Fernandes Lemonie, Sarah Stefani Fernandes Lemonie e Djully Ellen Oliveira Bobsin que embora não tenham conhecimento do que é uma tese, iluminaram de maneira especial os meus pensamentos, levando-me a busca do conhecimento. Perdão por minha ausência em momentos importantes de suas vidas.

Ao Instituto Federal Catarinense que é base na integração entre ciência, tecnologia e cultura como dimensões indissociáveis da vida humana e no desenvolvimento da investigação científica.

Ao Programa de Bolsas do Fundo de apoio à Manutenção e ao Desenvolvimento da Educação Superior UNIEDU/FUMDES, por proporcionar-me uma bolsa de estudo.

A Secretaria Marcieli Bugança que me recebeu no Programa, pelo acolhimento, competência, profissionalismo e dedicação na profissão.

Ao Professore Dr. Maicon Roberto Kviecinski, meu orientador, que com tanta presteza e dedicação orientou-me com sabedoria. Sempre disponível e disposto a ajudar-me. Obrigada por não permitir que desistisse e pela confiança.

À colega Dra. Verônica Vargas Horewicz, minha co-orientadora, por me auxiliar na finalização deste trabalho permitindo-me a autoria e autonomia.

“Me movo como educador, porque, primeiro, me movo como gente” (FREIRE, 1996, p. 94).

RESUMO

Introdução: Pacientes psoriáticos descontinuam os tratamentos orais ou injetáveis alegando problemas de eficácia e segurança. O ácido betulínico (AB) forma agregados supramoleculares por automontagem espontânea em veículo hidroalcoólico, que podem potencialmente depositar-se sobre as lesões psoriasiformes da pele dos animais de onde poderia ser liberado, tendo alcance sistêmico e exibindo amplo espectro de ativo, inclusive para os casos moderados e severos de psoríase. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia, segurança e mecanismo de ação de AB aplicado sobre a pele de camundongos com lesões psoriasiformes induzidas por imiquimode. **Metodologia:** A cada 24 h (5 dias), imiquimode era aplicado no dorso depilado dos camundongos (exceto no grupo não tratado); 2 h depois, o veículo (solução aquosa de glicerol a 10%) (100 µL), 0,05 mg/mL de clobetasol ou 0,5 mg/mL de AB eram administrados pela mesma via. Foram avaliados o índice de gravidade por área da psoríase (PASI), peso corporal, consumo de água/ração e deambulação (n = 12/grupo). O tempo para completa limpeza da pele (CSC) foi avaliado (n = 6/grupo) e AB causou sua maior redução (até 40%). Em outros seis camundongos/grupo foram quantificados na pele: acantose epidérmica e o número de linfócitos e granulócitos nas papilas dérmicas. Além disso, fosforilação da Akt e ERK. No sangue foram avaliados: concentração de TNF, IL-17A, IFNγ, IL-10, TGFβ e indicadores de toxicidade. **Resultados:** AB e clobetasol reduziram o PASI ($p < 0,001$) e a acantose (até 3 vezes), normalizando a infiltração de imunócitos e a concentração de TNF, reduzindo IL-17A (≅ 50%) (ambos, $p = 0,01$), p-Akt ($p < 0,01$ e 0,05, respectivamente) e p-ERK2 ($p < 0,001$ e 0,05, respectivamente). Apenas o AB normalizou a concentração de INFγ e foi o único capaz de inibir p-ERK1 ($p < 0,001$), sem intensificar a toxicidade do imiquimode. **Conclusão:** Os dados sugerem que AB pode ser considerado uma molécula candidata para o desenvolvimento de um novo tratamento para psoríase aplicado sobre a pele.

Palavras chave: Ácido betulínico; Lesões psoriasiformes; Tratamento sobre a pele; Eficácia e segurança; Mecanismo de ação.

ABSTRACT

Introduction: Psoriatic patients discontinue oral or injectable medications on the grounds of efficacy and safety problems. Betulinic acid (BA) forms supramolecular aggregates by spontaneous self-assembly in a hydroalcoholic vehicle, which can potentially be deposited on psoriasiform lesions of the animals' skin from which it could be released, having a systemic reach and exhibiting a broad spectrum of benefic effects, including for cases moderate and severe psoriasis. The objective of the study was to evaluate the efficacy, safety of this mechanism of action of BA applied on the skin of mice with psoriasiform lesions induced by imiquimod. **Methodology**: Every 24 h (5 days), imiquimod was applied to the shaved back of the mice (except in the untreated group); 2 h later, the vehicle (10% aqueous glycerol solution) (100 µL), 0.05 mg / ml clobetasol or 0.5 mg / ml AB were administered by the same route. The severity index by area of psoriasis (PASI), body weight, water / feed consumption and walking (n = 12 / group) were evaluated. The time for complete cleaning of the skin (CSC) was evaluated (n = 6 / group) and AB caused its greatest reduction (up to 40%). In six other mice / group, the skin was quantified: epidermal acanthosis and the number of lymphocytes and granulocytes in the dermal papillae. In addition, phosphorylation of Akt and ERK. In the blood were evaluated: concentration of TNF, IL-17A, IFNγ, IL-10, TGFβ and indicators of toxicity. **Results**: AB and clobetasol reduced PASI ($p < 0.001$) and acanthosis (up to 3 times), normalizing immunocyte infiltration and TNF concentration, reducing IL-17A (≅ 50%) (both, $p = 0.01$), p-Akt ($p < 0.01$ and 0.05, respectively) and p-ERK2 ($p < 0.001$ and 0.05, respectively). Only AB normalized the INFγ concentration and was the only one capable of inhibiting p-ERK1 ($p < 0.001$), without intensifying the toxicity of imiquimod. **Conclusion**: The data suggest that AB can be considered a candidate molecule for the development of a new treatment for psoriasis applied to the skin.

Keywords: Betulinic acid; Psoriasiform lesions; Skin treatment; Effectiveness and safety; Mechanism of action.

Lista de abreviaturas e siglas

AIM2 - Proteína induzível por interferon ausente no melanoma
Akt - Proteína cinase B
ALINDI - Grupo de Pesquisa em Alergia, Inflamação e Doenças Infecciosas
ALT - Alanina-aminotransferase
Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Apaf-1 - Fator de ativação 1 de protease apoptótica
APCs - Células apresentadoras de antígenos
AST - Aspartato-aminotransferase
ATP - Adenosina trifosfato
AUC - Área sob a curva
BCR - Receptor de antígeno da célula B
BID - Proteína ativadora de apoptose da família de proteínas Bcl2
CD4 - Glicoproteína de diferenciação 4 (correceptor) de superfície de células T auxiliadoras
CD8 - Glicoproteína de diferenciação 8 (correceptor) de superfície de células T citotóxica
CD36 - Aglomerado proteico de diferenciação 36 ou glicoproteína plaquetária 4
CDs - Correceptor(es) ou marcador(es) de superfície de células imunes
CDSs - Sensores de DNA citosólico
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CI - Concentração inibitória
CONITEC - Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde
CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX - Cicloxigenase
CXCL4 - Ligante 4 de quimiocina (motivo C-X-C)
DAMPs - Padrões moleculares associados ao dano
DC (s) - Células dendríticas
DISC - Complexo de sinalização indutor de morte
DLQI - Índice de Qualidade de Vida Dermatológico
DNA - Ácido dexoxirribonucleico
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

Elk 1 - Fatores específicos da transformação de eritroblastos

EMT - Componentes de matriz extracelular

eNOS - Óxido nítrico sintase endotelial

ERK- Cinase ativada por sinal extracelular

EUA - Estados Unidos da América

Fab - Fragmento de ligação ao antígeno

Foxp3^{+} - Proteína reguladora escurfina

FPR - Receptores de peptídeos formilados

FPRL1 - Receptor 1 do peptídeo N-formil

G-CSF - Fator estimulador de colônias granulocitárias

GDP - Guanosina difosfato

GM-CSF - Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos

GTP - Guanosina trifosfato

HIF 1 - Fator induzível por hipóxia

HLA - Sistema antígeno leucocitário humano

IFN-γ - Interferon gama

IL - Interleucina

iNOS - Óxido nítrico sintase induzível

ITAM - Imunoreceptores baseado em tirosina

JAK- Janus cinase

LABIOEX - Laboratório de Bioquímica Experimental da Universidade Federal de Santa Catarina

LaNEX- Laboratório de Neurociência Experimental

LAT - Proteína adaptadora associada a linfócito T

LPS - Lipopolissacarídeo

MAPKs - Cinases ativadas por mitógenos

MASP1 - Serinaproteases 1 associada à manose

MASP2 - Serinaproteases 2 associada à manose

MDA - Receptor de gene associado à diferenciação do melanoma

MEK- Cinase da cinase ativada por mitógeno

MHC – Proteína (s) do complexo principal de histocompatibilidade

mTNF - Fator de necrose tumoral associado à membrana

NEMO - Modulador essencial do NF-κB ou IKKβ/α

NF-κB - Fator nuclear kappa B

NK (s) - Célula(s) *natural killer(s)*

NO - Óxido nítrico

NOD - Receptores similares ao domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo

PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos

PASI - Índice de severidade da psoríase por área

PCDT - Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas

PCR - Proteína C reativa

PD-1 - Proteína de ponto de verificação das células do sistema imune

PDK 1- Proteína cinase dependente de fosfoinositida 1

PDK 2 - Proteína cinase dependente de fosfoinositida 2

PLGA - Ácido poli (lático-co-glicólico)

PGA - *Physician Global Assessment*

PI3K - Via da fosfoinusitol-3-cinase

PNU - Polimorfismo de nucleotídeo único

P/V - Peso/volume

PUVA - Terapia fotodinâmica com Psolareno + UVA

Raf - Proteína cinase proto-oncogene serina/treonina

RAG1 -Gene indutor de recombinação 1

RAG2 -Gene indutor de recombinação 2

RIG - Receptor do gene 1 induzível pelo ácido retinóico

RIP1 - Proteína cinase que interage com receptores em resíduos de serina/treonina

RNA - Ácido ribonucleico

ROS - Espécies reativas de oxigênio

RORγt - Fator de transcrição de tipo de receptor de ácido retinóico gama-t

RRPs - Receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos

SC - Santa Catarina

SNAIL - Fatores de transcrição de dedo de zinco

SP-A - Proteína surfactante A

SP-D - Proteína surfactante D

STAT - Transdutor de sinal e ativador da proteína de transcrição

sTNF - Fator de necrose tumoral solúvel

STAT - Transdutor de sinal e ativador de transcrição

SUS - Sistema único de saúde
TCRs - Receptores de células T
TCRs - Receptores de células T
Tdt - Desoxinucleotidiltransferase terminal
TFD - terapia fotodinâmica
TGF-β - Fator de transformação do crescimento beta
Tfh - Células T auxiliares foliculares
Ths - Células T auxiliares
TNF- Fator de necrose tumoral
TNFRs – Receptor (es) da família do fator de necrose tumoral
TNFRSF - Receptores da superfamília do fator de necrose tumoral
TRADD - Domínio de morte associado ao receptor de fator de necrose tumoral
TRAF - Fator associado ao fator de recrutamento do fator de necrose tumoral
Tregs - Células T regulatórias
UNISUL - Universidade do Sul de Santa Catarina
VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular
WSXWS - Sequência triptofano - serina - aminoácido variável -triptofano - serina

Lista de quadros

Quadro 1 - Moléculas do sistema imune de reconhecimento de padrões moleculares associados com patógenos ou ao dano celular.....29
Quadro 2 - Variáveis de estudo.....153

Lista de Tabela

Tabela 1 - Populações celulares envolvidas nas lesões psoriáticas.....117
Tabela 2 - Sinais de toxicidade em camundongos fêmeas tratadas topicamente a cada 24h durante 05 dias com AB.....147

Lista de figuras

Figura 1 - Medula óssea, células precurssoras de células sanguíneas e imunológicas.....26
Figura 2 - Principais proteínas de fase aguda: Proteína C-reativa, fibrinogênio e proteínas do sistema complemento.....35
Figura 3 - Comunicação celular: (a) autócrina, (b) parácrina e (c) endócrina.....37

Figura 4 - Classificação dos sinais ou ligantes.....40
Figura 5 - A expressão do receptor é determinante para especificidade das respostas celulares.....41
Figura 6 - Quatros tipos de transdutores de sinais.....43
Figura 7 - Etapas da biossinalização e transdução de sinais.....44
Figura 8 - Dois protótipos representando os principais tipos de receptores usados no sistema imune.....45
Figura 9 - Famílias de receptores de citocinas.....47
Figura 10 - Transdução de sinal por interferon gama.....48
Figura 11 - Principais modalidades de sinalização intracelular.....50
Figura 12 - Vias de transdução de sinais induzidas a partir da ativação da família do receptor do fator de necrose tumoral (TNF).....51
Figura 13 - Ativação de receptores do fator de necrose tumoral (TNFR) possui papel paradoxal: podem induzir à apoptose, por outro lado, em certas circunstâncias podem induzir sobrevivência, proliferação, diferenciação celular, além da expressão gênica de proteínas mediadoras de inflamação e outras citocinas.....52
Figura 14 - O fator de necrose tumoral solúvel (sTNF) pode ativar a via das cinases ativadas por mitógeno (p38, Jun cinase - JNK e ERK) a partir do receptor TNFR1. O TNF associado à membrana (mTNF) pode ativar a via da fosfoinusitol-3-cinase (PI3K) – proteína cinase B (Akt) a partir do receptor TNFR2.....53
Figura 15 - Mecanismos de indução de apoptose a partir de ativação de receptores da família do fator de necrose tumoral (TNFRs) 56
Figura 16 - Via das cinases ativadas por mitógeno (MAPKs) (A) e modelos de desativação de vias de biossinalização (B) 57
Figura 17 - Vias de biossinalização com papel na transformação patogênica de queratinócitos da pele.....59
Figura 18 - Vias de sinalização intracelular da IL-17A e IL17-F.....62
Figura 19 - Ativação da via da fosfatidilinusitol-3-fosfato (PI3K) – proteína cinase B (Akt) pela família TNF e IL-17.....63
Figura 20 - As células apresentadoras de antígenos (APCs): a ativação de APCs é o primeiro passo para a indução da imunidade adaptativa.....67
Figura 21 - Ontogenia de linfócitos.....69
Figura 22 - Constituição dos complexos receptores T $CD4^+$ e $CD8^+$ (TCRs).....72

Figura 23 - Etapas das respostas imunes mediadas por células T $CD4^+$.....75
Figura 24 - Diferenciação e atividade das subpopulações de linfócitos T $CD4^+$ (Ths) e T $CD8^+$ citotóxicos (Tcs) efetores e de memória.....76
Figura 25 - Célula B madura (A) e o complexo receptor de antígeno da célula B (B)...80
Figura 26 - Ativação do linfócito B Th independente (A) e Th dependente (B).....81
Figura 27 - Camadas da pele.....95
Figura 28 - Constituintes da pele.....97
Figura 29 - O desmossomo.....98
Figura 30 - Junção dermoepidérmica.....102
Figura 31 - Estrutura da pele e tipos de células imunológicas encontradas na pele...108
Figura 32 - Aparência das lesões da psoríase vulgar ou em placas.....113
Figura 33 - Aparência das lesões da psoríase gutata.....114
Figura 34 - Aparência das lesões da psoríase pustulosa.....114
Figura 35 - Aparência das lesões da psoríase eritrodérmica.....115
Figura 36 - Amostra histológica de pele saudável e de pele psoriática.....116
Figura 37 - Principais células e moléculas envolvidas na patogênese da psoríase...118
Figura 38 - Diferenciação induzível de Th17 patogênico na presença de IL-23.....123
Figura 39 – Estrutura da molécula do ácido betulínico (AB).....135
Figura 40 – Delineamento do estudo (protocolo experimental).....148

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 19
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO 23
1.1.1 Estrutura e direcionamento do referencial teórico 23
1.1.2 Sistema imune 24
1.1.2.1 Visão geral, estruturação (constituintes) e aspectos ontogênicos 24
1.1.2.2 Receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados ao dano e a patógenos 28
1.1.2.3 Respostas imunes de primeira linha de defesa 30
1.1.2.4 Citocinas e quimiocinas: química e função 37
1.1.2.5 Comunicação celular (biossinalização) e transdução de sinais 39
1.1.2.6 Biossinalização por interferon gama 47
1.1.2.7 Biossinalização pela família do fator de necrose tumoral 49
1.1.2.8 Biossinalização pela família da interleucina 17 60
1.1.2.9 A ativação de células apresentadoras de antígenos (APCs) é o primeiro passo para a indução da imunidade adaptativa: moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC I e MHC II) 64
1.1.2.10 Ontogenia de linfócitos 68
1.1.2.10.1 Ontogenia dos linfócitos T 68
1.1.2.11 Ativação de linfócitos T 72
1.1.2.11.1 Funções de células Th CD4$^+$ e polarização das respostas imunes 74
1.1.12 Ontogenia dos linfócitos B 78
1.1.2.13 Respostas imunes de defesa (imunidade) e desenvolvimento de tolerância imunológica que garantem homeostase 84
1.1.2.14 Resposta imunes anormais: hipersensibilidade 86
1.1.2.15 Autoimunidade 88
1.1.2.15.1 Linfócito Th17, T reguladores, interleucina 17 e autoimunidade 92
1.1.3 O tecido cutâneo 95
1.1.3.1 A epiderme 96
1.1.3.2 A derme 101
1.1.3.3 Pele e sistema imune 104
1.1.4 Psoríase: ênfase nas formas dermatológicas da doença 108

1.1.4.1 Contextualização, epidemiologia e carga da doença 108
1.1.4.2 Diagnóstico e formas clínicas dermatológicas de psoríase 111
1.1.4.3 Características histolopatológica..... 115
1.1.4.4 Imunopatogênese da psoríase.....118
1.1.4.5 Causas genéticas e ambientais 124
1.1.4.6 Tratamento disponível para psoríase e suas limitações.....127
1.1.4.6.1 Formas tópicas de tratamento.....127
1.1.4.6.2 Formas sistêmicas de tratamento 129
1.1.4.6.3 Compostos Biológicos 132
1.1.5 O ácido betulínico..... 134
1.1.5.1 Citotoxicidade e atividade antitumoral de AB..... 136
1.1.5.2 Atividade antiviral de AB.....136
1.1.5.3 Atividade antiinflamatória de AB.....137
1.1.5.4 Atividade antidiabética de AB.....138
1.1.5.5 Atividade anti-hiperlipidêmica de AB.....138
1.1.5.6 Outras atividades de AB.....138
1.1.6 Modelos experimentais de lesões psoriasiformes em animais.....139
2. OBJETIVOS..... 143
2.1 OBJETIVO GERAL 143
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 143
3. MÉTODOS 144
3.1 TIPO DE ESTUDO..... 144
3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS..... 144
3.3 ANIMAIS..... 146
3.4 DETERMINAÇÃO DA DOSE DE ÁCIDO BETULÍNICO.....146
3.5 DELINEAMENTO DO ESTUDO..... 147
3.6 ENSAIOS, TESTES E TÉCNICAS..... 149
3.6.1 Avaliação da severidade das lesões..... 149
3.6.2 Ensaio de campo aberto..... 149
3.6.3 Histologia.....149
3.6.4 Determinação do tempo para limpeza completa da pele 150

3.6.5 Coleta e preparação do sangue e pesagem dos órgãos..... 151
3.6.6 Dosagem de citocinas IL-17, IL-10, TNF, IFN-γ e TGF-β 151
3.6.7 Imunoeletroforese de proteínas (Western blot) 151
3.6.8 demais análises sanguíneas 152
3.7 VARIÁVEIS DE ESTUDO 153
3.8 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS 153
3.9 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA 155
4. ARTIGO CIENTÍFICO 156
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS 160
6. PERSPECTIVAS 161
REFERÊNCIAS 162
ANEXO A - Parecer aprovação do Comitê de Ética 191
ANEXO B- Produção científica publicada durante o período do doutorado ... 192

1. INTRODUÇÃO

O contexto deste estudo foi relacionado com o desenvolvimento de um novo medicamento de aplicação sobre a pele para pacientes com formas dermatológicas de psoríase. Este estudo foi parte de um projeto maior já iniciado pelo Grupo de Pesquisa em Alergia, Inflamação e Doenças Infecciosas (ALINDI) da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL). Inicialmente, os pesquisadores tinham um interesse sobre produtos naturais que pudessem servir como fontes de (algum) fármacos inovador(es) para o tratamento de doenças da pele, principalmente a psoríase. Por este motivo, o ponto de partida foi um estudo etnofarmacológico realizado por meio de entrevistas com pessoas que utilizavam medicina popular e terapias integrativas. Na época, foram incluídos mais de 110 participantes de pastorais da saúde e grupos da terceira idade de quatro cidades da região sul do estado de Santa Catarina, Brasil[1]. Os resultados do trabalho levaram os pesquisadores a selecionar a espécie vegetal *Dillenia indica* Linnaeus (*D. indica*) para ser estudada mais aprofundadamente.

Quando os pesquisadores da Unisul iniciaram o projeto, não existiam estudos científicos sobre atividade antipsoriática de *D. indica*. Então, foi realizado um estudo inicial para avaliar alguns extratos obtidos dos frutos[2], que foram padronizados em ácido betulínico (AB); um componente majoritário[3]. Os extratos foram aplicados topicamente em animais submetidos a um modelo rudimentar de lesões psoriasiformes fotonecróticas induzidas por irradiação ultravioleta na cauda de ratos (modelo científico de Perry)[2]. Na época, este modelo estava entre os poucos disponíveis e entre o mais utilizados nos estudos pré-clínicos sobre psoríase[4–7], embora já fossem conhecidas suas limitações[8]. Este modelo não recapitula a maioria dos eventos imunomediados presentes na psoríase de humanos, somente estratifica a pele causando paraceratose[8,9]. No estudo realizado anteriormente na UNISUL, foram testados três diferentes extratos (hidroetanólico, acetato de etila e éter de petróleo). Os resultados demonstraram que justamente o extrato contendo as concentrações mais altas de AB apresentaram também os efeitos antipsoriáticos mais promissores.

Mais tarde, a autora liderou o desenvolvimento de um estudo para avaliar a segurança do extrato promissor de *D. indica* padronizado em ácido betulínico. Este estudo foi importante para identificar possíveis efeitos adversos a partir do extrato

aplicado sobre a pele íntegra de animais saudáveis. Os resultados também providenciaram uma ideia quanto as doses que posteriormente poderiam ser utilizadas em estudos futuros. Os dados desta pesquisa demonstraram que a dose máxima de extrato que continha AB em concentração de 1,5 mg/mL, aplicado sobre a pele íntegra de camundongos, durante 10 dias consecutivos, não causou efeitos adversos nos animais[10]. Recentemente, foi publicado um estudo sugerindo que AB suprime as respostas de linfócitos T auxiliadores 17 (Th17) e melhora a inflamação da pele em murinos com lesões psoriasiformes quando administrado por via oral[11].

Contudo, dados de uma ampla pesquisa internacional de base populacional que avaliou as perspectivas dos pacientes no manejo da psoríase, revelaram que a maioria dos pacientes para os quais foram prescritos tratamentos orais ou injetáveis descontinuaram o tratamento. Esse estudo foi projetado para eliminar ao máximo vieses regionais de clínicas e de dermatologistas em específico. Para isso, foi projetado um estudo multicêntrico que incluiu 3.426 entre 139.948 pacientes originários de sete países: Estados Unidos, Canadá, França, Alemanha, Itália, Espanha e Reino Unido. Estiveram envolvidos nesta pesquisa 781 médicos. Os dados deste estudo revelaram que, no geral, 46% dos pacientes com psoríase avaliados afirmaram que os efeitos da terapia são piores do que aqueles da própria doença e mais de 85% deles afirmou acreditar na necessidade do desenvolvimento de novos fármacos para no tratamento da psoríase[12]. No caso dos pacientes para os quais medicações orais tradicionais foram prescritas, os pacientes alegaram que os tratamentos foram interrompidos por questões de segurança, tolerabilidade e necessidade de monitoramento laboratorial. Em relação aos tratamentos injetáveis, que envolvem compostos biológicos, os pacientes afirmaram achar a terapia pesada, ter temor das injeções que causam ansiedade, inconveniências e efeitos adversos[12]. Portanto, é possível reconhecer a importância dos medicamentos administrados sobre a pele para tratar a psoríase. Esta, na verdade, é a via usada para tratar a maioria dos pacientes com doença de gravidade leve[12].

Uma parte significativa da população (2-5%) sofre de psoríase; a doença autoimune humana mais prevalente mundialmente. A psoríase é uma inflamação crônica sistêmica, que compreende principalmente formas cutâneas e artríticas[13]. Sua carga de doença inclui alta morbidade, desemprego e muitas comorbidades. Neste trabalho, foram abordadas questões relacionadas principalmente aos medicamentos

disponíveis para tratar psoríase, os quais têm eficácia limitada e causam efeitos colaterais graves[12,13].

Nos últimos seis anos, o grupo ALINDI tem estudado uma molécula para tratar psoríase: o ácido betulínico (AB) ou ácido (3β) -3-hidroxi-lup-20 (29) -en-28-óico, que é um triterpeno pentacíclico natural do tipo lupano. AB é biossintetizado a partir do isopreno através de vias que formam lupeol (R = CH3), betulina (R = CH2OH) e AB (R = COOH). Essas reações são catalisadas por oxidases C-28, que são encontradas em certas plantas. Com exceções, AB geralmente é responsável por > 0,1% do peso seco da planta, o que não é suficiente para atender à crescente demanda por AB[14,15]. A casca da bétula (*Betulla spp*.) e outros certos gêneros de plantas produzem betulina abundantemente (> 30%) (AB ≤ 2,5%). Comercialmente, AB é geralmente disponibilizado a partir da oxidação da betulina[14]. O número de artigos científicos avaliando bioatividades de AB é notável (> 1430 artigos em 2020, PubMed).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia, segurança e mecanismo de ação de AB purificado aplicado sobre lesões psoriasiformes induzidas por imiquimode no dorso depilado de camundongos. Algumas evidencias científicas sugerem que AB forma espontaneamente agregados supramoleculares por um processo de automontagem, o que é típico para este tipo de substância triterpenóide em meio aquoso ou hidroalcoólico[14]. A hipótese criada para o presente estudo foi que desta forma, o AB a partir dos agregados supramoleculares formados e depositados sobre a pele dos animais poderia ser liberado, tendo alcance sistêmico e exibindo amplo espectro de atividade antipsoriática que poderia ser benéfica inclusive para os casos moderados e severos da doença. Evidências científicas demonstraram que a partir dos agregados supramoleculares, o AB pode sofrer reações subsequentes com o oxigênio molecular, dando origem a metobólitos bioativos ainda mais potentes[14]. Para testar a hipótese, foi utilizado o modelo do imiquimode que é um fármaco ativador imune que quando aplicado sobre a pele de camundongos causa a formação de lesões que compartilham várias das principais características da psoríase humana.

Atualmente já existem registros de dois ensaios clínicos que estão avaliando a segurança e a tolerabilidade de AB aplicado sobre a pele. O primeiro estudo é um estudo de fase I/II que está avaliando pomadas de AB quanto à segurança e eficácia no tratamento de nevos displásicos para prevenir melanomas (http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00346502). Outro ensaio clínico está avaliando

a segurança, tolerabilidade e eficácia de AB em pacientes com melanoma metastático cutâneo (https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00701987). Portanto, os resultados do presente estudo adicionam a literatura, pois sugerem que AB pode ser considerado uma molécula candidata para o desenvolvimento de um novo tratamento para psoríase aplicado sobre a pele, apoiando a condução de estudos clínicos em pacientes com psoríase. A hipótese do presente estudo foi: o AB aplicado sobre a pele poderia ter um efeito antipsoriático sistêmico benéfico para os casos de psoríase, leve, moderada e severa. Ao passo que a pergunta de pesquisa foi: o AB representa uma molécula promissora em termos de eficácia e segurança para o desenvolvimento de um medicamento para tratar lesões psoriasiformes sendo aplicado sobre a pele?

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Estrutura e direcionamento do referencial teórico

Como introduzido anteriormente, a literatura moderna define a psoríase como uma doença comum (de alta prevalência e incidência crescente), sistêmica, não contagiosa, sendo um processo inflamatório crônico autoimunomediado, que apresenta um espectro de formas clínicas, sendo as principais, as formas cutâneas e artropáticas[11,16,17]. A revisão da literatura apresentada a seguir irá fornecer fundamentos teóricos que embasaram o desenvolvimento desta tese.

Primeiro, foram revisados aspectos do sistema imune (seus constituintes e funções), o sistema imune inato, as respostas imunes de primeira linha de defesa, a resposta inflamatória aguda e crônica. Foram descritas as citocinas e quimiocinas e o papel que elas desempenham, algo que vem sendo esclarecido a cada dia mais; como atuam na comunicação celular (biossinalização), transdução de sinais e modulação da expressão gênica, diferenciação, sobrevivência e proliferação celular. Foi revisado o sistema imune adaptativo, incluindo a ontogenia dos linfócitos T e B (subpopulações e funções), a ativação de células apresentadoras de antígenos; o primeiro passo para indução da imunidade adaptativa, a sensibilização do sistema imune, os mecanismos de defesa do organismo que atuam para eliminar patógenos e/ou recuperar a homeostase e o eventual desenvolvimento de imunidade/memória imunológica. Permeando este texto, também foram revisadas situações que envolvem principalmente patógenos cuja à velocidade de ação/infecção supera à atividade do sistema imune, sendo verdade que em algumas situações os patógenos não são eliminados e o organismo adapta-se para uma sobrevida acompanhada de uma desordem crônica.

Além dos processos que visam a defesa do organismo, foram revisados mecanismos, mutações e pontos de checagem que ocorrem durante a ontogenia dos constituintes do sistema imune que visam a homeostase, garantindo tolerância por parte do sistema imune frente a elementos inofensivos do meio ambiente e constituintes próprios do organismo. Desta forma, esta revisão também apresenta os mecanismos que atuam para garantir tolerância imunológica (e autotolerância), juntamente com casos nos quais a tolerância é comprometida, nos quais ocorrem

respostas imunes anormais (de hipersensibilidade, incluindo a atopia, enfatizando principalmente a autoimunidade). Foram revisados os tipos de doenças de hipersensibilidade, enfatizando a patogenia da psoríase, uma doença caracterizada por fases de latência e exacerbação, quando mecanismos de uma resposta inflamatória crônica mesclam-se com processos de agudização da doença[13,18]. Um dos principais focos de interesse desta tese foram as limitações do tratamento disponível para psoríase[19], que é relacionado com frequência a muitos efeitos colaterais e inclusive eficácia que deixa a desejar[13,18]. Este texto apresenta uma revisão sobre o tecido cutâneo e como o sistema imune se estrutura na pele. O presente estudo foi uma pesquisa desenvolvida na linha de estudos e desenvolvimento de medicamentos e produtos para a saúde; desta forma, este texto ainda realizou uma revisão detalhada sobre as alternativas terapêuticas (principalmente farmacológicas) atualmente disponíveis para psoríase e sobre as pesquisas de desenvolvimento de novos fármacos nesta área. Foi realizada uma revisão da literatura atualizada sobre o ácido betulínico (AB), uma molécula inovadora que aqui foi testada para o tratamento sobre a pele de camundongos com lesões psoriasiformes. Foram apresentados os antecedentes científicos, as razões que levaram selecionar o AB como uma molécula candidata para o desenvolvimento de um novo medicamento; as características do modelo experimental (animal) utilizado, suas vantagens e limitações e as bases teóricas necessárias para entender o delineamento deste estudo.

1.1.2 Sistema imune

1.1.2.1 Visão geral, estruturação (constituintes) e aspectos ontogênicos

O corpo humano possui níveis de organização que dependem um do outro. Por exemplo, o organismo humano é constituído de vários sistemas de órgãos. Os órgãos são constituídos de tecidos e estes são constituídos de células e moléculas. A função de cada sistema depende da atividade integrada de seus órgãos, que realizam atividades específicas[20,21].

O sistema imune caracteriza-se pela capacidade de reconhecer determinadas estruturas moleculares estranhas (endógenas ou exógenas) e desenvolver respostas

efetoras diante destas estruturas, o que no geral, provoca a destruição ou inativação da(s) mesma(s)[22]. O sistema imune representa um sistema que providencia uma defesa essencial contra o desenvolvimento de infecções, tumores e outras doenças, por meio de respostas imunes. A geração inadequada destas respostas pode produzir efeitos deletérios para o organismo, provocando reações inflamatórias crônicas e dano orgânico em maior ou menor intensidade[22].

O sistema imune é constituído por órgãos geradores primários ou centrais, tais como a medula óssea e o timo e, órgãos linfoides secundários ou periféricos, tais como os linfonodos, baço, sistema imune nas barreiras epiteliais, o sistema vascular linfático, leucócitos e moléculas[23]. A medula óssea é o sítio de geração de células sanguíneas circulantes, incluindo hemácias, granulócitos e monócitos, bem como é o sítio de origem da linhagem linfóide de células. A geração das células mencionadas ocorrem inicialmente durante o desenvolvimento fetal, em ilhotas do saco vitelino e mesênquina para-aórtico, mudando para o fígado entre o terceiro e quarto mês de gestação, até finalmente consolidar-se na medula óssea[23–28].

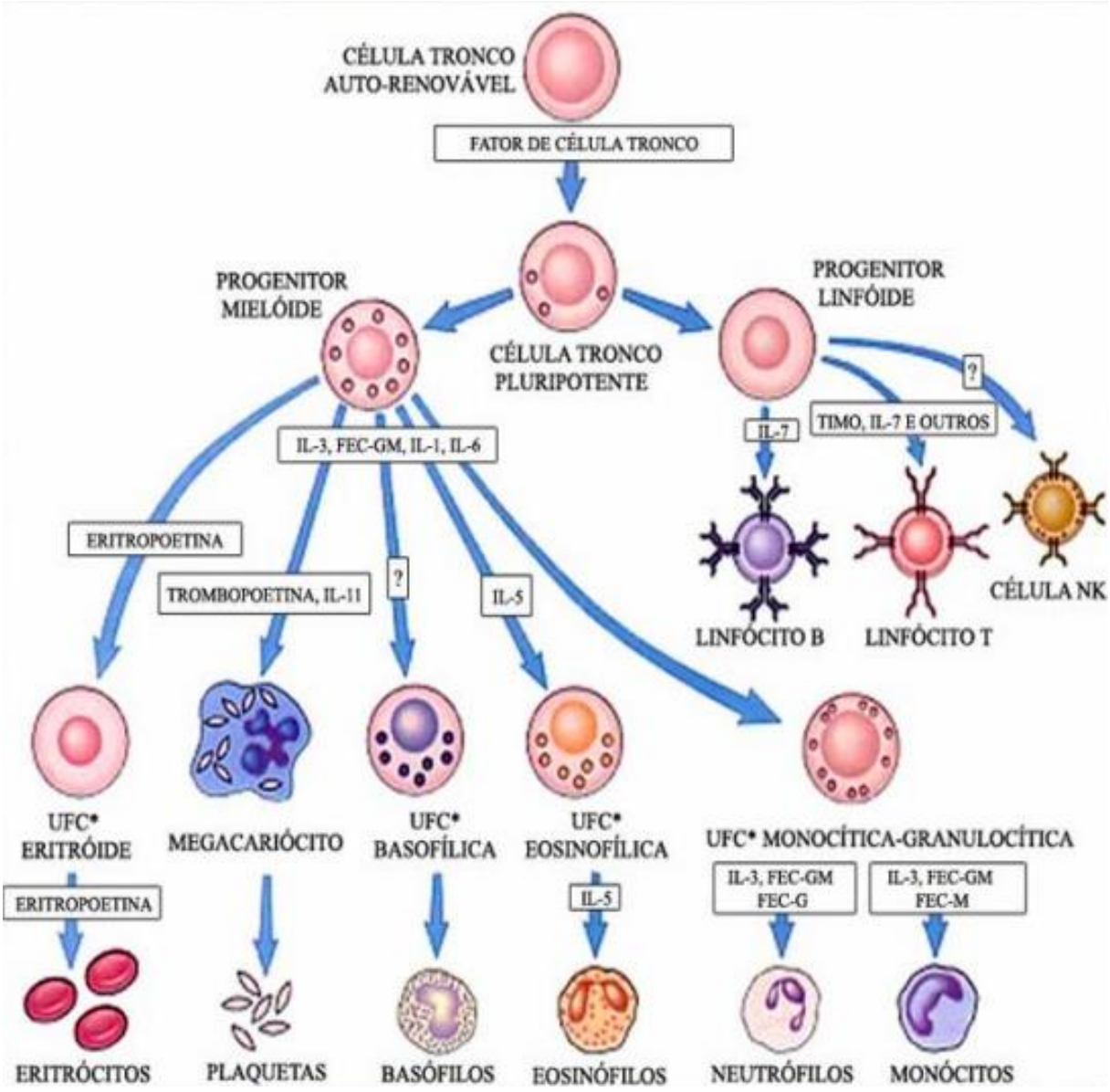
Hemácias, granulócitos, monócitos, células dendríticas, mastócitos, plaquetas, linfócitos B e T e células linfoides inatas originam-se todas de uma célula-tronco hematopoiética comum presente na medula óssea. As células tronco são multipotentes, ou seja, podem originar todos os diferentes tipos de células sanguíneas e imunes[23–25]. Na medula ainda existem células estromais não hematopoiéticas que fornecem sinais e fatores de crescimento (citocinas, por exemplo) requeridos para ciclagem contínua das próprias células tronco, que em uma etapa de diferenciação subsequente originam células progenitoras mieloides e/ou linfoides (Figura 1)[23–26,28].

Os progenitores mieloides originam as linhagens celulares eritroide, megacariocítica, granulocítica e monocítica, que originam, respectivamente, hemácias, plaquetas, granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), monócitos e células dendríticas (DCs). A maioria das células dendríticas surge da linhagem monocítica. Mastócitos imaturos surgem a partir de um precursor comum; estas células deixam a medula óssea e diferenciam-se em mastócitos nos tecidos periféricos.

No geral, o termo leucócitos (*leukos* = branco) refere-se às células do sistema imune ou glóbulos brancos. No sistema imune, o sistema linfoide é um componente que possui várias funções essenciais, dentre elas, o controle da homeostase

macromolecular, da função imunológica, controle dos fluidos teciduais e remoção de líquidos e proteínas dos espaços intersticiais[36].

Figura 1 – Medula óssea, células percussoras de células sanguíneas e imunológicas



Fonte: Cellular & Molecular Immunology – Nature (https://www.nature.com/cmi/)

Os leucócitos podem ser classificados em granulócitos; estes apresentam grânulos no citoplasma (que podem ser identificados pelas diferentes propriedades de coloração dos mesmos) e núcleo com formato irregular; são conhecidos nominalmente por neutrófilos, eosinófilos e basófilos[23,29–32]. Os neutrófilos são leucócitos polimorfonucleares mais abundantes no sangue periférico, têm um importante papel nas reações inflamatórias, defesa contra infecções e na função dos

mastócitos e basófilos. Os basófilos constituem menos de 1% dos leucócitos do sangue periférico e podem ser recrutados para os tecidos no caso de inflamação/infecção, juntamente com os eosinófilos. Os eosinófilos são células importantes no combate a infecções, sendo sua ação antiparasitária (antihelmíntica), uma das mais potentes e eficazes do organismo[29–31].

As células da linhagem mieloide desempenham diversas funções importantes na resposta imune inata, onde uma das principais funções é a fagocitose e destruição de patógenos dentro de vesículas intracelulares, realizadas pelos macrófagos/DCs e neutrófilos, principalmente. As DCs são fagocíticas e podem aprisionar patógenos. Após sua maturação (ativação), elas atuam como células apresentadoras de antígenos para as células T, iniciando a resposta imune adaptativa[23,29–32].

Os progenitores linfoides da medula óssea dão origem aos linfócitos (células que em princípio não possuem grânulos e apresentam núcleo com formato relativamente regular). Também originam um tipo de linfócito peculiar que responde à presença de infecções, sendo uma grande célula com um citoplasma granular distinto, chamado de célula matadora natural (célula *natural killer* ou NK)[33]. Estas células são capazes de reconhecer e matar algumas células anormais, como por exemplo, células cancerígenas ou células infectadas por vírus ou outros parasitas intracelulares[34]. Ainda em relação aos linfócitos, estas células diferenciam-se em várias subpopulações, das quais é possível distinguir em princípio, a linhagem de linfócitos B e T, que serão explicados em mais detalhes nas seções mais adiante[23,29–32].

Em nível molecular, o sistema imune conta com uma ampla variedade de constituintes. Os mais notáveis, além dos anticorpos, serão detalhados adiante; sendo eles: os receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados ao dano ou a patógenos (RRPs), as citocinas, as quimiocinas, as proteínas de fase aguda , tais como a proteína C reativa (PCR) e as proteínas do sistema do complemento, as moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), proteínas que constituem receptores complexos, como os receptores dos linfócitos, fatores de transcrição gênica, entre as principais[23,26,28,35].

1.1.2.2 Receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados ao dano e a patógenos

Toda vez que ocorre uma lesão ou trauma, surgem no local da lesão, padrões moleculares distintos, que podem ser padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) (no geral, endógenos) ou padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (exógenos). No geral, os DAMPs são relacionados com debris das células lesionadas ou mortas e assim como PAMPs, são reconhecidos pelos receptores de reconhecimento de padrões (RRPs). Geralmente, a ligação de DAMPs ou PAMPs com RRPs está entre os primeiros passos para a fagocitose, a qual na maioria das vezes inclui o papel de moléculas denominadas em conjunto como opsoninas (no geral, proteínas de fase aguda, como PCR, proteínas do sistema complemento ou anticorpos). Fagocitose é o nome dado a um processo de engolfamento, ingestão e destruição de partículas sólidas, como bactérias ou pedaços de tecido necrosado, por células ameboides chamadas de fagócitos. Os fagócitos ou células fagocíticas podem reconhecer patógenos através de diferentes receptores de membrana que possuem (RRPs ou receptores de opsoninas). Alguns fagócitos ligam-se diretamente aos microrganismos, enquanto outros, se ligam a microrganismos opsonizados, que são internalizados para dentro dos fagossomos (vesículas ou sistemas vesiculares de um fagócito formado pela invaginação da membrana celular e pelo material ingerido). Os fagossomos fundem-se aos lisossomos para formar fagolisossomos, onde os microrganismos são mortos por espécie reativa de oxigênio (ROS) e nitrogênio, além de enzimas líticas[23,26,32].

Hoje se sabe, que existem RRPs expressos na superfície das células em nível de membrana, em vesículas fagocíticas e solúveis no meio extracelular e no citosol de vários tipos celulares; ou seja, em todas as localizações onde PAMPs (ou DAMPs) podem estar presentes. Resumindo, existem RRPs associados as células e RRPs solúveis no plasma e mucosas. Quando RRPs ligam-se a PAMPs ou DAMPs, são ativadas vias de transdução de sinais que promovem funções antimicrobianas, pró-inflamatórias, entre outras respostas. No quadro a seguir estão relacionados os principais RRPs.

Quadro 1 - Moléculas do sistema imune de reconhecimento de padrões moleculares associados com patógenos ou ao dano celular

Receptores de reconhecimento de padrões moleculares (RRPs)		**Exemplos específicos**	**Ligantes (PAMPs/DAMPs)**
Associados às células			
Receptores do tipo Toll (TLRs)	Membrana plasmática endossomais das células dendríticas, fagócitos e células B, células endoteliais e muitos outros tipos celulares	TRLs 1-9	Várias moléculas microbianas, incluindo LPS bacteriano e peptidoglicanos, ácidos nucleicos virais
Receptores do tipo NOD (ou NLRs)	Citosol de fagócitos, células epiteliais e outras células	NOD1/2	Peptidoglicanos da parede celular bacteriana
Receptores do tipo RIG (RLRs)	Citosol de fagócitos e outras células	RIG-1, MDA-5	RNA viral
Sensores de DNA citosólico (CDSs)	Citosol de muitos tipos celulares	AIM2; CDSs associados a STING	DNA bacteriano e viral
Receptores de lectina tipo C (CLRs)	Membrana plasmática de fagócitos	Receptor de manose Dectina	Carboidratos da superfície microbiana com terminal de manose e frutose Glucanas presentes nas paredes celulares fúngicas
Receptores de *Scavenger*	Membrana plasmática de fagócitos	CD36	Diacilglicerídios microbianos
Receptores N-formil met-leo-phe	Membrana plasmática de fagócitos	FPR e FPRL1	Peptídios contendo resíduos de *N*-formilmetionil
Solúveis			
Pentraxinas	Plasma	Proteína C reativa	Fosforicolina e fosfatidilserina microbianas
Colectinas	Plasma	Lectina ligante de manose	Carboidrato com manose e frutose terminais
	Alvéolos	Proteínas surfactantes SP-A e SP-D	Várias estruturas microbianas
Ficolinas	Plasma	Ficolina	*N*-acetilglucosamina e ácido lipoteitoico componentes das paredes celulares das bactérias Gram-positivas
Complemento	Plasma	Várias proteínas do complemento	Superfícies microbianas

Fonte: Abbas et al[36].

No quadro 1, *NOD* ou *NLRs* = receptores similares ao domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo; *LPS* = lipopolissacarídeo; *RIG* = receptor do gene 1 induzível pelo ácido retinóico*; MDA* = receptor de gene associado à diferenciação do melanoma*; RNA* = ácido ribonucleico*; DNA* = ácido dexoxirribonucleico*; CDSs* = sensores de DNA citosólico*; AIM2* = proteína induzível por interferon ausente no melanoma*; CD36* = glicoproteína de plaquetas 4, translocase de ácidos graxos, membro 3

da classe B do receptor de sequestrador e glicoproteínas 88, IIIb ou IV*; FPR* = receptores de peptídeos formilados*; FPRL1* = receptores de peptídeos formilados do tipo 1*; SP-A* = proteína surfactante A e *SP-D* = proteína surfactante D.

1.1.2.3 Respostas imunes de primeira linha de defesa

Esta seção foi construída para explicar respostas imunes que, em princípio, apresentam padrão bastante semelhante e que ocorrem toda vez que o organismo sofre um trauma ou uma lesão. Os elementos, características e funções explicadas aqui têm relação principalmente com aquilo que se compreende como resposta inflamatória aguda, envolvendo elementos constituintes das primeiras linhas de defesa do organismo e principalmente constituintes inatos do sistema imune. Estas respostas incluem um papel de células fagocitárias, um movimento direcionado de células imunes do sangue para os tecidos e dentro dos tecidos lesionados (quimiotaxia), uma grande variedade de sinais que regulam esta migração e o recrutamento/ativação de células imunes[23,26,28,32].

Quando as barreiras que protegem o organismo são ultrapassadas (pele, mucosas, tosse, lágrimas, micção, entre outros), microrganismos ou padrões moleculares estranhos invadem o organismo causando respostas da primeira linha de defesa na tentativa de bloquear os microrganismos que são capazes de colonizar os tecidos ou eliminar o(s) corpo(s) estranhos[34,37]. Quando microrganismos são capazes de resistir as reações de defesa nos tecidos, elementos encontrados nos fluidos extracelulares e no sangue reconhecem os mesmos por meio de proteínas receptoras RRPs[38,39]. A resposta inflamatória aguda é marcadamente caracterizada pela atividade de DCs e saída de eletrólitos e pequenas moléculas de leitos capilares, constituindo o transudato e posteriormente saem moléculas como albumina e fibrinogênio que constituem o exsudato[29]. O influxo de neutrófilos é logo seguido por monócitos, que rapidamente diferenciam-se em macrófagos, reforçando e mantendo a resposta. Mais lentamente, os eosinófilos também migram para o tecido inflamado e também contribuem para a destruição do microrganismo invasor[29,34].

As respostas de primeira linha de defesa consistem em mecanismos celulares e bioquímicos/moleculares pré-existentes mesmo antes do trauma ou da infecção e que são preparados para responder rapidamente. Esses mecanismos reagem aos produtos dos microrganismos e células lesionadas e estas respondem essencialmente

da mesma forma para exposições repetidas. Os principais componentes que atuam neste momento são: barreiras físicas e químicas (epitélio e agentes antimicrobianos); células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos), DCs, células *NKs* e proteínas sanguíneas, incluindo membros do sistema complemento e outros mediadores da inflamação, como por exemplo, citocinas e quimiocinas de fase aguda[23,40].

A inflamação é uma resposta protetora do organismo que dilui, destrói ou neutraliza agentes nocivos que atacam as células do hospedeiro[41]. Em princípio, a inflamação é um conjunto de alterações normalmente controladas e autolimitadas[23,40,42,43]. A etapa inicial da inflamação é crucial para definir o curso do processo inflamatório, onde moléculas sinalizadoras determinam a síntese de diferentes mediadores, pró- e anti-inflamatórios. Ao conjunto de respostas que constitui esta fase inicial de respostas ao dano ou infecção é dado o nome de inflamação. Em alguns casos, a agressão é menor, ocorrendo um período breve de geração de mediadores pró-inflamatórios que rapidamente dão espaço à geração de mediadores anti-inflamatórios, que suprimem a fase inicial e o processo é resolvido. Porém, em muitos casos, a causa lesiva pode persistir[44]. Neste último caso, o resultado pode ser a inflamação crônica, que pode ter sérias consequências patológicas[41].

Na inflamação aguda, a resposta possui dois componentes principais: alterações vasculares, que alteram o calibre vascular e permitem um aumento do fluxo sanguíneo (vasodilatação). Fluidos contendo proteínas plasmáticas deixam a circulação devido ao aumento da permeabilidade vascular, pois as células endoteliais são ativadas, resultando na expressão de proteínas de adesão de leucócitos que migram através das paredes vasculares. Ocorre emigração dos leucócitos da microcirculação e seu acúmulo no foco da lesão. Os principais leucócitos que atuam nesta fase são fagócitos, como DCs, macrófagos e polimorfonucleares[23,27,42,45].

Os fenômenos vasculares são representados por modificações hemodinâmicas da microcirculação, comandadas por mediadores liberados durante a irritação por ação do agente inflamatório. As principais modificações são: vasodilatação arteriolar produzida por ação da histamina e mantidas por prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanas, vasoconstritores, entre outros, que promovem agregação plaquetaria e normalmente evoluem para um equilíbrio homeostático do sistema circulatório (dilatação das vênulas menores e constrição das vênulas maiores), aumentando a

pressão hidrostática na microcirculação e a permeabilidade vascular (ocorrendo hiperemia)[41]. A fase inicial da vasodilatação é mediada pela histamina, bradicinina e prostaglandinas; a fase tardia e sustentada depende principalmente de mediadores originados no plasma (derivados dos sistemas do complemento, da coagulação e de fibrinólise), além de derivados do ácido araquidônico, gerados principalmente no endotélio e em células do exsudato inflamatório. Logo no início da vasodilatação, quando se inicia a fase de fluxo mais lento, os leucócitos deixam a região central da corrente sanguínea e começam a deslocar-se na margem do fluxo[44].

Na primeira etapa do recrutamento celular, a selectina-P aparece na superfície das células endoteliais induzida por leucotrienos e histamina, a qual é liberada pelos mastócitos. Selectinas reconhecem a região de certas glicoproteínas dos leucócitos e a interação das selectinas P e E com essas glicoproteínas permite que os monócitos e os neutrófilos liguem-se de forma reversível à parede vascular, assim, os leucócitos circulantes rolam sobre o endotélio dirigidos por quimiocinas. Eles, então, penetram na membrana basal com o auxílio de enzimas proteolíticas (metaloproteinases) que degradam as proteínas da matriz extracelular da membrana e ocorre assim o que se chama de diapedese, permitindo que os fagócitos entrem nos tecidos subendoteliais e migrem para o foco da lesão[34,44].

Entre os DAMPs, vale destacar o ácido araquidônico que é um derivado das membranas das células destruídas[46]. O ácido araquidônico serve de substrato para uma família de enzimas mediadoras de inflamação. Entre elas, destacam-se as cicloxigenases (COX 1,2,3) e lipoxigenases. Essas enzimas são consideradas chaves na biossíntese de prostanoides (prostaglandinas, prostaciclinas), que são substâncias envolvidas em diversos processos fisiológicos, assim como em processos patológicos da inflamação. As enzimas mencionadas catalisam reações que derivam eicosanoides que exercem uma variedade de efeitos sobre os vasos sanguíneos e as células envolvidas na inflamação, nociceptores e células da vizinhança[47]. As prostaglandinas aumentam a sensibilidade dos receptores de dor e sua lenta liberação associada ao processo de dano tecidual pode explicar a sensação relacionada à dor tardia. As prostaglandinas liberadas sensibilizam os receptores locais de dor, intensificando a estimulação dolorosa[48].

As isoformas das cicloxigenases (COX-1 e COX-2) levaram aos conceitos de que a isoforma COX -1 é constituitiva e tende a desepenhar uma função homeostática,

enquanto a COX-2 é induzida durante a inflamação e tende a medear a resposta inflamatória. Por meio destas isoformas, descobriu-se inibidores altamente seletivos da COX-2[42,49]. A COX-2 especificamente é uma forma induzível da enzima, sendo expressa principalmente por células e tecidos envolvidos em processos inflamatórios; pode ser induzida por citocinas IL-1, IL-2 e família de citocinas do fator de necrose tumoral (TNF), como também podem ser inibidas por outras citocinas IL-4, IL10 e IL-13. Uma terceira isoforma já foi sugerida, a COX-3, mas essa ainda não possui seu mecanismo de ação bem esclarecido[26,28,47,50–53]

Durante a inflamação ocorre a liberação de enzimas lissossômicas pelos leucócitos. Rapidamente ocorre uma resposta que se expressa através de sinais cardinais como o calor, dor, rubor e edema, causados por efeitos de mediadores inflamatórios nos vasos sanguíneos locais. Estes sinais foram descritos há mais de 2.000 anos por um enciclopedista romano, Celsus, que escreveu o famoso texto “De medicina”. No século XIX, um quinto sinal cardinal foi adicionado por Rudolf Virchow, conhecido como “pai da patologia moderna”, que descreveu que as manifestações da inflamação são consequência de alterações vasculares, recrutamento e ativação dos leucócitos e alterações dos tecidos lesionados[34,41].

Durante a fagocitose, fagócitos chegam no local da lesão e secretam grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS), juntamente com as citocinas pró-inflamatórias, enzimas proteolíticas (metaloproteinases de matriz), etc. Uma família de enzimas presente nas células fagocíticas, conhecida como complexo das NADPH-oxidase (ou fagócito oxidase), cuja atividade inclui a produção de ROS em níveis elevados. Entre os principais tipos de ROS, podem ser citados os radicais ânions superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio e intermediários reativos do nitrogênio, cujo principal representante é o óxido nítrico (NO)[29]. Estes eventos são incluídos em um processo conhecido como *burst* (explosão) respiratória. As ROS geradas atacam os patógenos atuando junto com a fagocitose. No entanto, se ROS são produzidas em excesso, de forma sustentada, elas podem causar danos nos tecidos circundantes, o que aparece nos processos crônicos[29,54,55].

O sistema complemento foi descoberto há muitos anos como um componente termolábil presente no plasma normal que aumenta a opsonização de patógenos por anticorpos e que permite que anticorpos matem ou neutralizem alguns destes patógenos. Esta atividade 'complementa' a atividade dos anticorpos, daí o nome das

proteínas “’sistema do complemento”’. Embora tenha sido descoberto pela primeira vez como membros efetores da resposta por anticorpos, o sistema do complemento também pode ser ativado no início da infecção na ausência de anticorpos e, de fato, agora parece claro que o complemento evoluiu primeiro como parte do sistema imunológico inato, onde também desempenha um papel importante[29,54,55].

O sistema complemento (Figura 2) é composto por um grande número de proteínas plasmáticas distintas que reagem entre si para opsonizar patógenos e induzir uma série de respostas que ajudam a combater patógenos. Uma série de proteínas do complemento são proteases que são ativadas por clivagem proteolítica. Tais enzimas são sintetizadas pelo fígado e por macrófagos, em princípio, na forma de zimogênios. No caso do sistema complemento, os zimógenos precursores estão amplamente distribuídos pelos fluidos e tecidos do corpo. Nos locais de lesão, no entanto, eles são ativados localmente e desencadeiam uma série de eventos pró-inflamatórios potentes. O sistema do complemento é ativado através de uma cascata de enzimas ativadas sequencialmente. Nestas cascatas, uma enzima ativa gerada pela clivagem de seu precursor zimogênio, cliva então seu substrato, outro zimogênio do complemento, para sua forma enzimática ativa. Por sua vez, isso cliva e ativa o próximo zimogênio na via do complemento. Desta forma, a ativação de um pequeno número de proteínas do complemento no início da via é enormemente amplificada por cada reação enzimática sucessiva, resultando na geração rápida de uma resposta do complemento desproporcionalmente grande. Existem muitos mecanismos reguladores para impedir a ativação descontrolada do complemento[56].

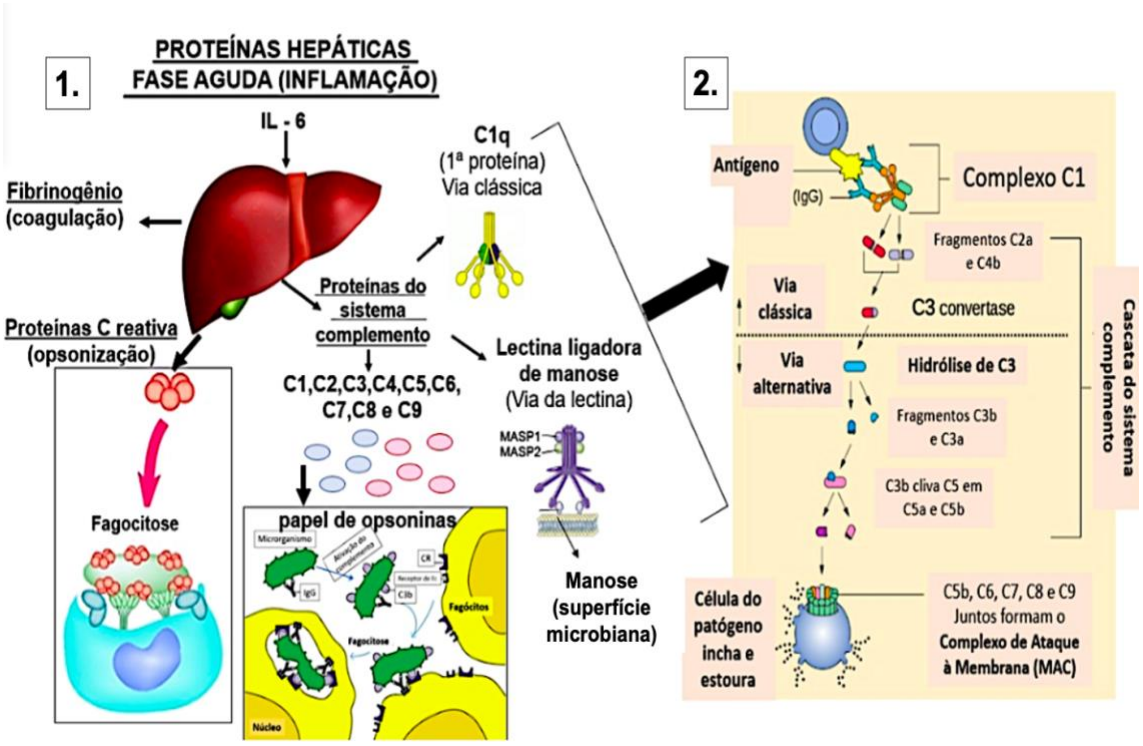
Existem três maneiras pelas quais o sistema de complemento protege contra patógenos. Primeiro, gera um grande número de proteínas do complemento ativadas que se ligam covalentemente aos patógenos, opsonizando-os para serem engolfados pelos fagócitos dotados de receptores do complemento. Segundo, os pequenos fragmentos de algumas proteínas do complemento atuam como agentes quimiotáticos que recrutam mais fagócitos para o local de ativação do complemento e também para ativam os fagócitos. Terceiro, os componentes do complemento terminal danificam certos patógenos, criando poros na membrana dos mesmos[34] (Figura 2.2).

Proteínas de fase aguda são proteínas cuja concentração plasmática aumenta (proteínas de fase aguda positivas) ou diminui (proteínas de fase aguda negativas) em resposta à inflamação. Principais exemplos de proteínas de fase aguda positivas

incluem: PCR, lectina ligadora de manose, fibrinogênio, proteínas do complemento, entre outros. A PCR é uma proteína plasmática reagente de fase aguda produzida pelo fígado. É um dos membros da família de proteínas pentraxina. Sua função fisiológica é ligar-se à fosfocolina expressa na superfície de células mortas ou lesionadas (e alguns tipos de bactérias), para iniciar sua eliminação ao ativar o sistema complemento e células que fazem fagocitose, funcionando como uma opsonina. É um indicador extremamente sensível de inflamação[57].

Exemplos de proteínas de fase aguda negativas incluem: albumina, transferrina, transtiretina, proteína ligadora de retinol, antitrombina, transcortina, entre outras. Tais proteínas podem ser usadas como marcadores de inflamação[58,59].

Figura 2 – Principais proteínas de fase aguda: Proteína C reativa, fibrinogênio e proteínas do sistema complemento



Fonte: Adaptado de https://pt.slideshare.net/ e http://www.niaid.nih.gov/publications/immune/the_immune_system.pdf

À medida que o processo inflamatório evolui, são liberados mediadores anti-inflamatórios que favorecem os fenômenos de resolução da inflamação, processo regulado por uma série de mediadores como citocinas, quimiocinas e receptores distintos. Esses mediadores de reparo são representados por fatores de crescimento,

na sua maioria produzidos por leucócitos, entre outros. A remodelação tecidual acontece também através da atividade de enzimas como a elastase e fatores de crescimento como fator de transformação do crescimento beta (TGF-β), fator de crescimento derivado de plaquetas e fator de crescimento de vasos endoteliais (VEGF), moléculas de adesão (integrinas), antígeno leucocitário cutâneo e células reguladoras $CD4^{+}Foxp3^{+}$. Neutrófilos e macrófagos interagem com plaquetas e células endoteliais ou epiteliais para produzir lipoxinas e resolvinas, potentes mediadores anti-inflamatórios[29,40]. A liberação de citocinas também torna-se distinta[60,61].

O estudo de Charles Dudley Mills[62] sobre macrófagos M1 e M2 demonstrou que as respostas M1 estão ligadas à produção de IL-12 e IL-8 e à expressão da superfície celular de correceptor de diferenciação (CD) 80 ou 86 que atraem ou matam células como neutrófilos e/ou estimulam respostas Th1. As respostas M2 estão mais associadas ao TGF-β e à produção do VEGF[62]. Os macrófagos M2 podem ainda se subdividirem em macrófagos M2a, M2b, M2c e M2d, e mais recentemente foi demonstrado que os macrófagos conseguem se diferenciar e formar mais seis subpopulações, conhecidas por macrófagos reguladores, macrófagos associados à hemorragia, macrófagos oxidativos, M3, M4 e M17. O subgrupo de macrófagos M2 ativado pela IL-4, estaria mais envolvido no reparo tecidual e especula-se que também tenham um papel na manutenção da tolerância imunológica[45,63]. Os macrófagos M3 são conhecidos como macrófagos de comutação (transformação) entre os marcadores que compõe a via dos macrófagos M1 e M2. Sobre os macrófagos M4, estes se diferenciam na presença do fator estimulador de colônia e de quimiocina CXCL4. Já o macrófagos M17 suspeita-se que possa estar envolvido na indução de corticosteróides, fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos ou IL-10 e um aspecto importante é que a célula, ao responder a IL-17, torna-se resistente a apoptose[45,63]. Sendo assim, os macrófagos potencializam a ativação de linfócitos T e B pela expressão de moléculas coestimuladoras e liberam mais citocinas pro-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12, TNF e quimiocinas[23,27,45,63].

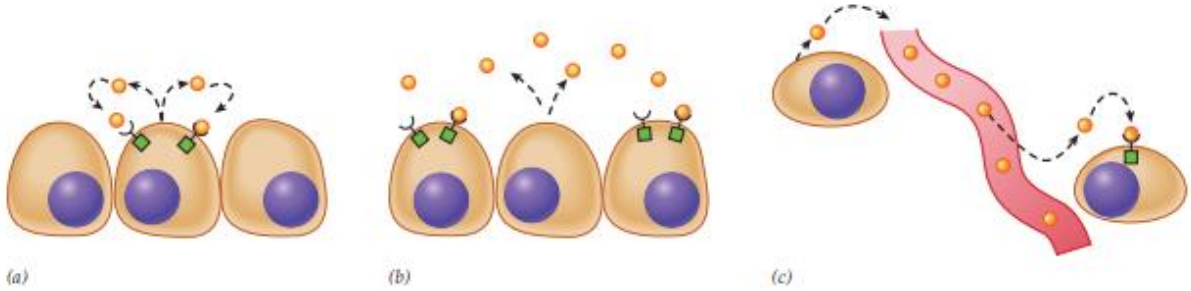
Vale reforçar a ideia que a atividade das células da imunidade inata e adaptativa são complementares e reguladas principalmente por citocinas, quimiocinas e outros fatores reguladores[23,26,28,41]. A resposta imune inclui respostas que vão desde reações imediatas a reações tardias[53]. Por meio destas respostas é possível verificar

que existem dois tipos distintos de respostas imunes, conhecidas nominalmente por imunidade inata e imunidade adaptativa (ou adquirida). Ambas comunicam-se entre si através de moléculas e receptores[34,39]. As respostas diferenciam-se pela velocidade e especificidade das reações. A imunidade inata abrange elementos do sistema imunológico já presentes no nascimento do indivíduo, que fornecem defesa imediata ao hospedeiro (neutrófilos, monócitos, macrófagos, complemento, citocinas e proteínas de fase aguda)[29–31]. Ao discorrer por este texto, em vários trechos são realizadas associações com a imunidade inata e adaptativa.

1.1.2.4 Citocinas e quimiocinas: química e função

No princípio, acreditava-se que citocinas eram secretadas somente por células do sistema imune. Atualmente, é reconhecido que uma variedade de células são secretoras de citocinas, o que inclui todas as células epiteliais, células do sistema nervoso, entre outras. Na verdade, é possível afirmar que dia após dia, novas células secretoras de citocinas têm sido identificadas. Citocinas são proteínas sinalizadoras secretadas que possuem atividade autócrina, parácrina ou endócrina (Figura 3). As citocinas são secretadas e irão agir em receptores específicos presentes nas células-alvo. O que acontece a partir da ligação de citocinas em seus receptores é ativação de vias de transdução de sinais e modulação da expressão gênica[23,26,28,32].

Figura 3 – Comunicação celular: (a) autócrina, (b) parácrina e (c) endócrina



Fonte: Karp e Iwasa[64]

Citocinas e quimiocinas representam um grande grupo de proteínas/peptídeos secretadas (os) com estruturas e funções diversas. Estas moléculas medeiam comunicação celular (biossinalização), ativando vias de transdução de sinais que regulam e coordenam muitas atividades das células. Todas as células do sistema

imune secretam algumas citocinas e também expressam receptores específicos para citocinas e ou quimiocinas. O termo quimiocinas refere-se a um grupo de citocinas com funções mais relacionadas à quimiotaxia, ou seja, atração/movimento de células em resposta a sinais químicos secretados no ambiente circundante[65,66].

As citocinas podem ter atividade autócrina (ocorre quando uma célula secreta uma citocina que atua em seus próprios receptores); parácrina (ocorre quando uma célula secreta uma citocina que age sobre células vizinhas) ou endócrina (menos comum; ocorre quando uma célula secreta uma citocina que irá circular na corrente sanguínea e influenciar a atividade de célula(s) localizadas a alguma distância; células dotada(s) de receptores para a respectiva citocina secretada[65,66].

Citocinas e quimiocinas têm funções relacionadas ao crescimento, diferenciação e ativação de células, regulando e determinando a natureza das respostas imunes; controlando o tráfego das células e o arranjo celular dos órgãos imunológicos. A depender de quais citocinas são produzidas em resposta a um insulto imunológico, respostas imunes específicas desenvolvem-se, podendo estas ter caráter citotóxico, humoral, mediado por células, reações de hipersensibilidade, entre outras. Uma cascata de respostas pode ser vista como resultado da ligação de uma citocina ao seu receptor e muitas vezes são necessárias várias citocinas para sinergizar a expressão gênica e elicitar a(s) resposta(s) imune(s) ideal(ais). Uma variável de confusão adicional no entendimento da função das citocinas é que cada citocina pode ter uma função completamente diferente, dependendo da fonte celular, alvo e, mais importante, fase específica da resposta imune durante a qual é secretada. Numerosas citocinas têm potencial pró-inflamatório e anti-inflamatório; isto é, a atividade elicitada depende das células imunológicas presentes e de seu estado de resposta à citocina[65,66].

Sabe-se que certas células que participam em respostas imunes se polarizam de acordo com a produção de citocinas. Postula-se que, após a polarização inicial no local do reconhecimento antigênico, diferentes tipos de células podem ser ativadas e chegar ao local das lesões sob influência de citocinas. Ainda, ao chegar ao local das lesões, as células imunes precisam se adaptar às citocinas no campo local, o que implica que estas células imunes sofrem influência de circuitos reguladores de citocinas e quimiocinas. À medida que migram, essas células podem, por sua vez, influenciar a secreção das citocinas[66].

1.1.2.5 Comunicação celular (biossinalização) e transdução de sinais

Em um organismo complexo como o dos seres humanos, composto de trilhares de células, a vida só é possível porque as células com diferentes funções comunicam-se (trocam vários sinais entre si) e assim as funções fisiológicas são ordenadas, o que não é diferente para o sistema imunológico. A capacidade que as células possuem de receber e responder a sinais, que vem de locais à alguma distância e são reconhecidos por elementos denominados receptores (ou transdutores de sinais); é fundamental à vida. De modo constante, as células recebem informações do meio extracelular por meio de moléculas sinalizadoras, ou simplesmente chamadas de sinais (ligantes). Os sinais ligam-se com os respectivos receptores. Os sinais têm natureza química diversa, mas em todos os casos, representam a informação que é detectada por receptores específicos, sendo convertidos em resposta(s) celular(es) e, esta(s) sempre envolve(m) processos bioquímicos. À conversão de informações em alteração(ões) bioquímica(s) é dado o nome de transdução de sinal, uma propriedade universal das células vivas. No caso do sistema imunológico, as citocinas estão entre as principais moléculas que representam tais sinais[17,23,28,64].

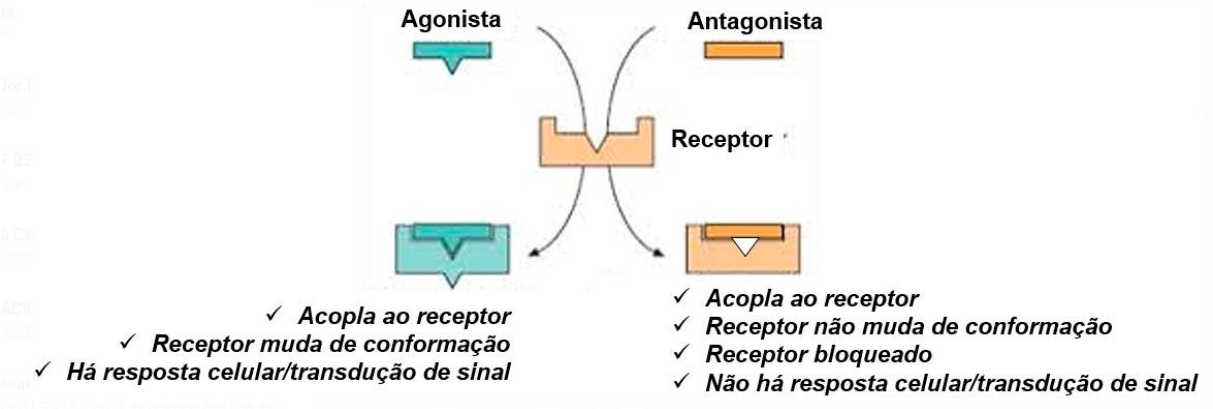
Na área da Imunologia, é possível exemplificar de várias formas os processos nos quais a comunicação celular e as vias intracelulares de transdução de sinais modulam a expressão de genes em processos cruciais fisiológicos ou patológicos. Por exemplo:

- A ativação por citocinas de células, a partir dos receptores que elas possuem, pode induzir expressão gênica relacionada à produção de mais citocinas (as mesmas ou outras);
- A ativação pode induzir expressão gênica relacionada à diferenciação, aquisição de novo fenótipo celular, maturação e aquisição de novas funções;
- A ativação de receptores em granulócitos pode induzir os mesmos à exocitose dos grânulos pré-existentes no citoplasma deles;
- A ativação pode iniciar respostas de crescimento (geração de novas células/ciclagem celular) e proliferação celular (expansão clonal);
- Quimiocinas podem ativar receptores em células que expressam proteínas que dirigem a motilidade celular, modulam a adesão célula-célula ou célula-matriz extracelular;

- Indução de fagocitose de moléculas ou outras células;
- Indução ou proteção contra morte celular programada (apoptose);
- A ativação de receptores tipo imunoglobulina presentes em linfócitos B pode instruir estas células à expressão gênica relacionada à secreção de mais anticorpos[23,26,32].

Os sinais ao se ligarem aos seus receptivos receptores podem agir de diversas formas, uma das maneiras de classificar suas ações é como agonista ou antagonista. Como mostrado na Figura 4, os agonistas acoplam ao receptor, alteram sua conformação e causam respostas celulares. Por outro lado, os antagonistas acoplam ao receptor, mas não mudam sua conformação e assim não causam respostas celulares. A produção de moléculas agonistas e antagonistas sintéticas é uma estratégia comum na área da farmacologia para corrigir distúrbios fisiopatológicos[17,23,28,64].

Figura 4 – Classificação dos sinais ou ligantes



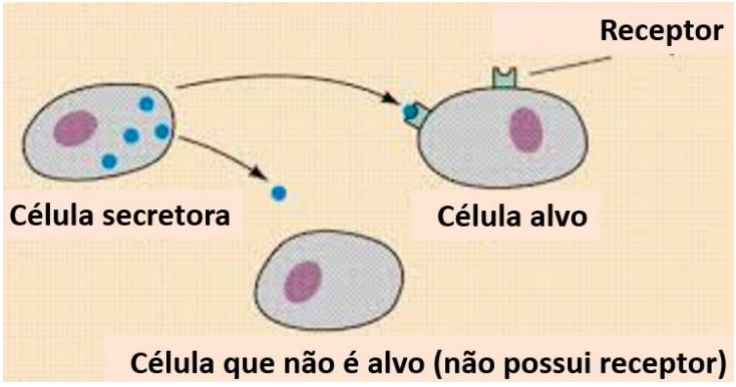
Fonte: http://plantandociencia.blogspot.com/2019/09/farmacodinamica-i.html

Tanto agonistas quanto antagonistas podem ser ainda subclassificados. Por exemplo, os agonistas podem ser ditos: a) agonista total: ativa seu receptor em sua eficácia máxima; b) agonista parcial: ativa o receptor, mas não em sua eficácia máxima, c) agonista inverso: inativa o receptor constitutivamente ativo, entre outros. Os antagonistas podem ser subclassificados em: a) antagonista de sítio competitivo: ligam-se reversivelmente ao sítio ativo do receptor, competindo com a ligação do agonista a esse sítio; b) antagonista de sítio não competitivo: liga-se de forma não competitiva ao sítio de ação onde o agonista se ligará, diminuindo a eficácia do agonista; c) antagonistas alostéricos não-competitivos: ligam-se em outros sítios alostéricos do receptor que não o do agonista e diminuem o efeito do mesmo, de

maneira reversível ou irreversível. As ligações podem ser reversíveis ou irreversíveis, dependendo da forma da interação entre as moléculas[17,23,28,64].

Os receptores (transdutores de sinais) que iniciam as respostas de sinalização são geralmente proteínas integrais presentes na membrana citoplasmática, onde seus domínios extracelulares reconhecem ligantes solúveis secretados ou estruturas ligadas à membrana citoplasmática de uma célula vizinha ou à matriz extracelular[23]. Os receptores são impressionantemente específicos e extremamente sensíveis. Esta especificidade é alcançada por uma complementariedade molecular precisa entre as moléculas sinalizadoras e receptoras. Os organismos multicelulares, tem um nível de especificidade adicional, visto que os receptores de um dado sinal, ou os alvos intracelulares de uma dada via de sinalização, estão presentes em apenas alguns tipos celulares. Sendo assim, um sinal pode desencadear respostas em um determinado tipo de células, ao passo que este mesmo sinal pode não gerar resposta alguma em outra linhagem celular. Neste caso, o que determina se as células irão responder ou não a um determinado sinal, é a presença ou não do receptor nas células-alvo[17,23,28,64] (Figura 5).

Figura 5 - A expressão do receptor é determinante para especificidade das respostas celulares



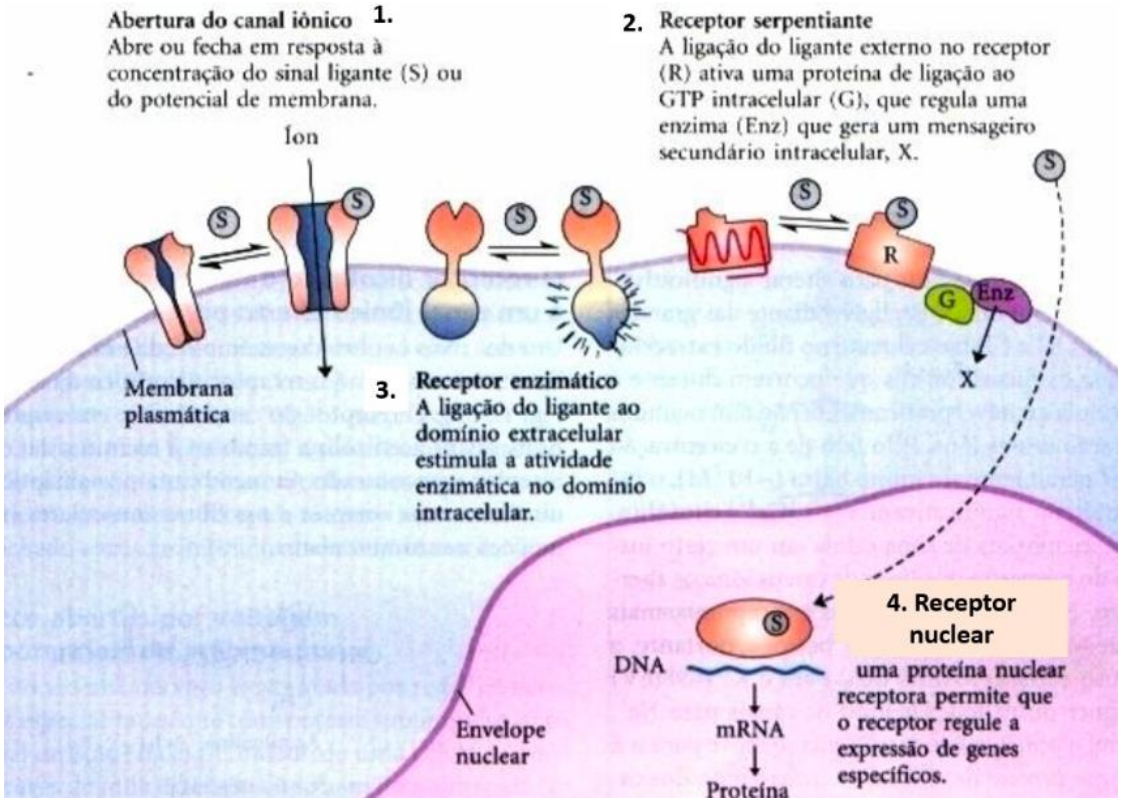
Fonte: Adaptado de https://www2.estrellamountain.edu/faculty/farabee/biobk/BioBookENDOCR.html

Os receptores de sinais são classificados em quatro principais tipos (como ilustrado na Figura 6): 1. canais iônicos (ou receptores ionotrópicos), 2. receptores acoplados à proteína G (metabotrópicos ou serpentiniformes), 3. receptor enzimáticos e 4. receptores nucleares. Os receptores do tipo canal iônico são proteínas localizadas na membrana citoplasmática das células; possuem estrutura semelhante a outros canais iônicos, mas incorporam um sítio de ligação (receptor) de ligante, geralmente

no domínio extracelular. Tipicamente, são receptores sobre os quais atuam neurotransmissores de atividade rápida[17,23,28,64].

Os receptores acoplados à proteína G ou serpentiniformes são metabotrópicos (consistem em uma cadeia de aminoácidos que atravessa sete vezes a membrana em formato de serpentina com domínio extracelular, transmembrana e intracelular). Estes receptores são um tipo de receptor de membrana de células eucarióticas que atua através de um mensageiro secundário e sua atividade é frequente em vias do metabolismo energético em humanos. A ligação do sinal no domínio extracelular deste tipo de receptor altera a conformação do receptor que assim é capaz de interagir com a proteína G (chamada assim por sua afinidade e ligação com nucleotídeos de guanosina trifosfato - GTP e guanosina difosfato - GDP). As proteínas G estão na camada interna da membrana e consistem em três subunidades: α, β e γ. A ligação do sinal ao receptor, ativa a proteína G levando, por sua vez, a ativação de outra proteína (enzima ou canal iônico). Este também é um típico exemplo de receptor de quimiocinas. Na forma inativada, a porção citoplasmática do receptor está ligada de forma não covalente à proteína G. No processo de ativação, a subunidade α troca o GDP por GTP e dissocia-se, ficando livre. As subunidades α-GTP, β e γ passam a circular no citoplasma e interagir com diversas moléculas efetoras, atuando como segundos mensageiros, por exemplo: adenilil-ciclase, a proteína cinase C, diversos canais iônicos, entre outras. O efeito é interrompido com a hidrólise do GTP a GDP, pela enzima GTPase, fazendo com que as ligações da proteína G retornem ao estado inativado[17,23,28,64].

Figura 6 - Quatro tipos de transdutores de sinais

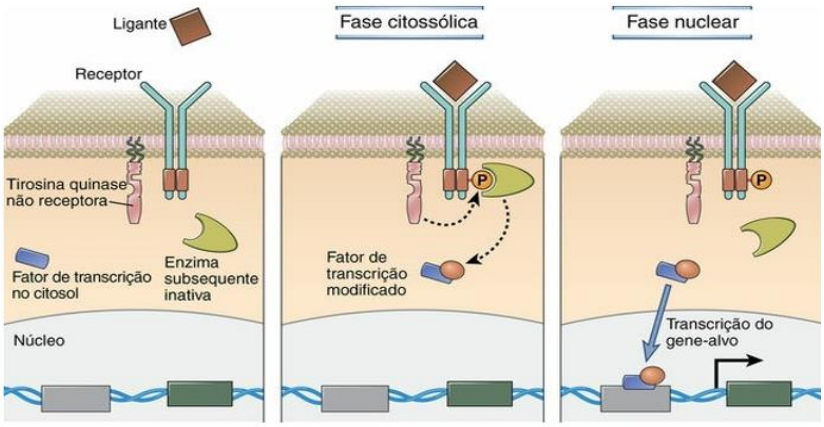


Fonte: Adaptado de Nelson e Cox[17].

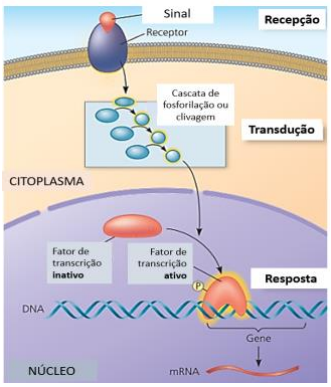
Os receptores enzimáticos são geralmente relacionados com fosforilações, atividade fosfotransferase ou cinases - transferidores de grupamentos fosfato e/ou ainda clivagens. Representam um grupo heterogêneo de receptores de membrana que respondem a sinais peptídicos, como as citocinas das famílias TNF e IL-17, fatores de crescimento, entre outros. Apresentam um domínio extracelular de ligação de sinais conectado a um domínio intracelular por uma hélice transmembrana. Em muitos casos, o domínio intracelular possui natureza enzimática intrínseca (atividade de cinase ou de guanilato ciclase). Muitos dos receptores com domínios citosólicos enzimáticos modificam proteínas pela adição ou remoção de grupos de fosfato em resíduos de aminoácidos específicos. A fosforilação é um mecanismo de sinalização proteica, pois a elevada carga negativa dos grupos fosfato tem a capacidade modificar a estrutura tridimensional de qualquer proteína e consequentemente a atividade da mesma, além disso, é um processo facilmente revertido pela ação de fosfatases[17,23,28,64].

Figura 7 – Etapas da biossinalização e transdução de sinais

A.



B.



Fonte: Adaptado de Campbell readings for M2 – Cell signalling <notsaem.wordpress.com>

Os receptores nucleares podem ser localizados no núcleo ou citoplasma das células (estes quando ativados migram para o compartimento nuclear na presença do ligante). Exemplos: receptores dos hormônios esteroides, do hormônio da tireoide, receptor do ácido retinóico, receptor da vitamina D[17,23,28,64].

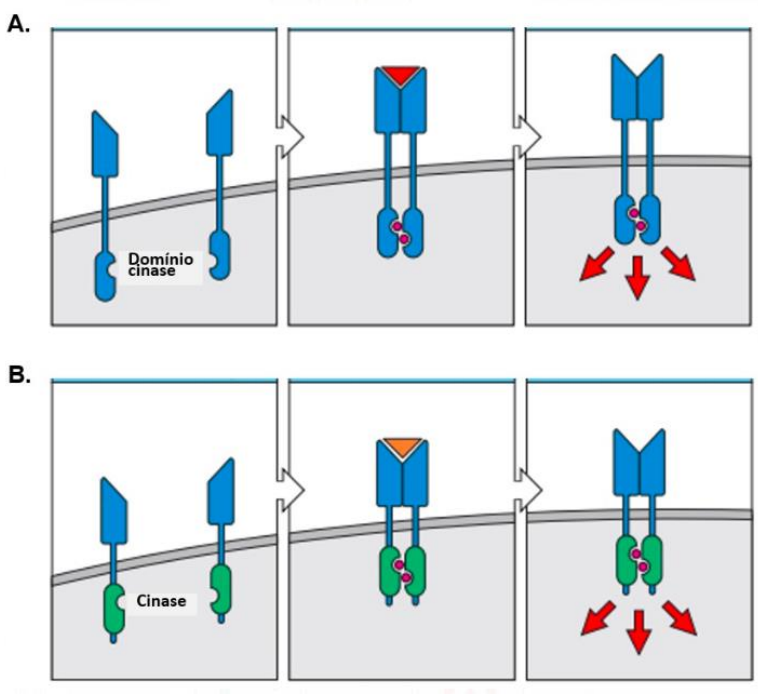
As etapas da biossinalização foram mostradas na Figura 7 e no geral, envolvem: primeiro, a ligação do sinal ao receptor (geralmente encontrado na superfície junto à membrana citoplasmática das células). Depois, uma fase citosólica que geralmente envolve a ativação de enzimas pré-existentes que são ativadas quase que sempre por meio de atividade proteolítica (clivagem) ou atividade de cinases (fosforilações). Por último, o processo geralmente culmina em uma fase nuclear, na qual ocorre a ativação ou translocação nuclear de fatores de transcrição que estão, em princípio, latentes nas células em repouso. No núcleo das células, os fatores de

transcrição orquestram alterações da expressão gênica, ativando ou inibindo a expressão de uma infinidade de genes[23].

No caso dos receptores com papel no sistema imunológico, entre eles os receptores de citocinas, praticamente todos consistem em uma ou mais proteínas (cadeias polipeptídicas) de membrana que possuem porções extracelulares de ligação para ligantes e porções citoplasmáticas (responsáveis pela iniciação das vias de transdução de sinais intracelulares). Uma vez que o sinal (a citocina, por exemplo) liga- se ao receptor, isto geralmente causa aproximação de subunidades citoplasmáticas de duas ou mais moléculas do receptor. Frequentemente, o receptor tem característica de receptor enzimático, descrito anteriormente. A maioria destes receptores são associados à atividade enzimática tipo tirosina cinase, seja esta uma atividade intrínseca do receptor ou de uma molécula associada ao receptor. O receptor é conformado por mais de uma cadeia polipeptídica (Figura 8)[23,26].

A Figura 8 ilustra dois tipos principais de receptores que sinalizam por meio de proteínas cinases e são usados pelo sistema imune. Em ambos os receptores, a informação de que um ligante se ligou à porção extracelular é convertida na ativação da atividade de proteína cinase na porção citoplasmática da membrana.

Figura 8 – Dois protótipos representando os principais tipos de receptores usados no sistema imune



Fonte: Murphy et al[34]

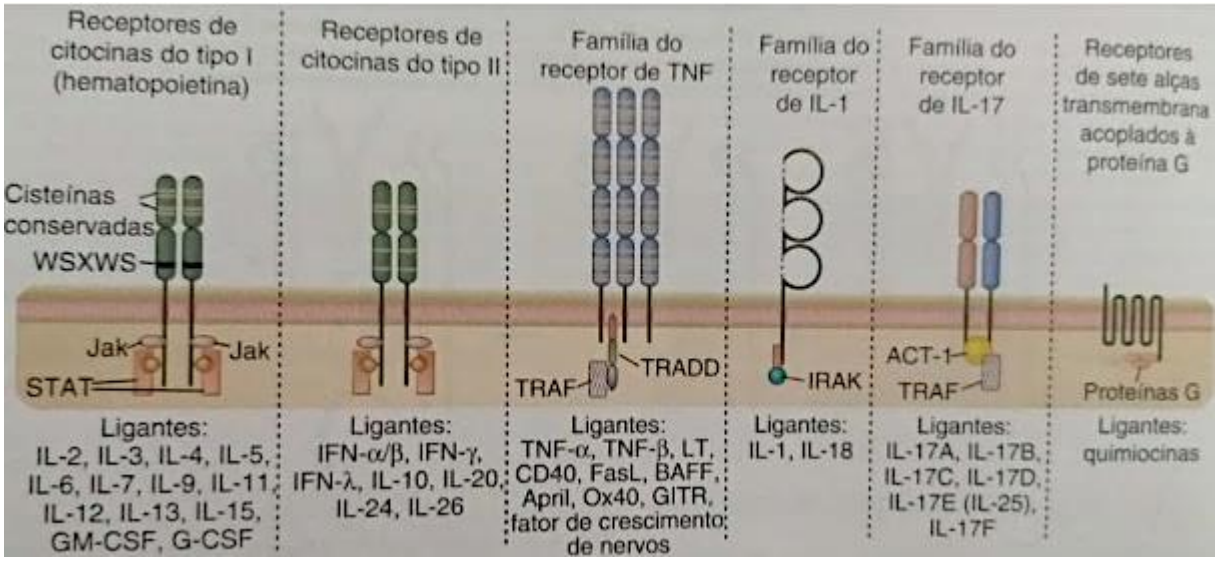
Em uma classe de receptor (Figura 8A), a atividade da cinase é parte do próprio receptor. A ligação do ligante resulta na agregação do receptor, na ativação da atividade catalítica e, consequentemente, na fosforilação da cauda do receptor e de outros substratos, transmitindo o sinal adiante. Na segunda classe de receptores (Figura 8B), o próprio receptor não tem qualquer atividade enzimática. Ao invés disso, enzimas citoplasmáticas estão constitutivamente associadas à porção citoplasmática do receptor ou são induzidas a se associarem ao receptor após sua ligação na porção extracelular com o ligante. A dimerização (ou oligomerização das subunidades do receptor) ativa as enzimas associadas. A enzima geralmente é tipo tirosina cinase, encontrada em todos os receptores desse tipo e o que acontece a seguir é a ativação de proteínas/enzimas por fosforilação e cascata abaixo[26].

Os receptores de citocinas são subclassificados com base na homologia estrutural dos domínios extracelulares de ligação à citocina e nos mecanismos de transdução intracelulares que compartilham[23].

Para efeitos desta tese, cujo objetivo geral/principal está relacionado ao desenvolvimento de um novo fármaco para tratar psoríase, vale a pena aproveitar o ensejo desta seção para detalhar a biossinalização mediada por três famílias de citocinas, juntamente com seus receptores, pois os estudos mais recentes têm considerado as mesmas elementos-chave na patogenia da psoríase. São elas: a) família de IFN do tipo II (interferon gama – IFN-γ), superfamília do fator de necrose tumoral (TNF) e família da interleucina (IL) – 17[13,17,18]. Ao fazer esta descrição é importante sensibilizar para o fato de que, em princípio, a sinalização mediada por estas citocinas tem papel importante relacionado a defesa do organismo[67–69].

A Figura 9 apresenta as estruturas dos receptores da maioria das citocinas que atualmente já foram elucidados. Outro aspecto que precisa ser levado em conta é que toda vez que se faz referência ao IFN, TNF e IL-17 e seus receptores, na verdade está sendo feita referência a famílias ou até superfamílias de citocinas e receptores[23,26,32,67,69]. A seguir, será feito primeiro um detalhamento da sinalização mediada por IFNγ, família do TNF (enfatizando a sinalização mediada pelo TNF) e IL17. Na sequência, a revisão apresenta o processo de ontogenia de linfócitos e a sinalização a partir de seus receptores.

Figura 9 – Famílias de receptores de citocinas



Fonte: Abbas et al [23]

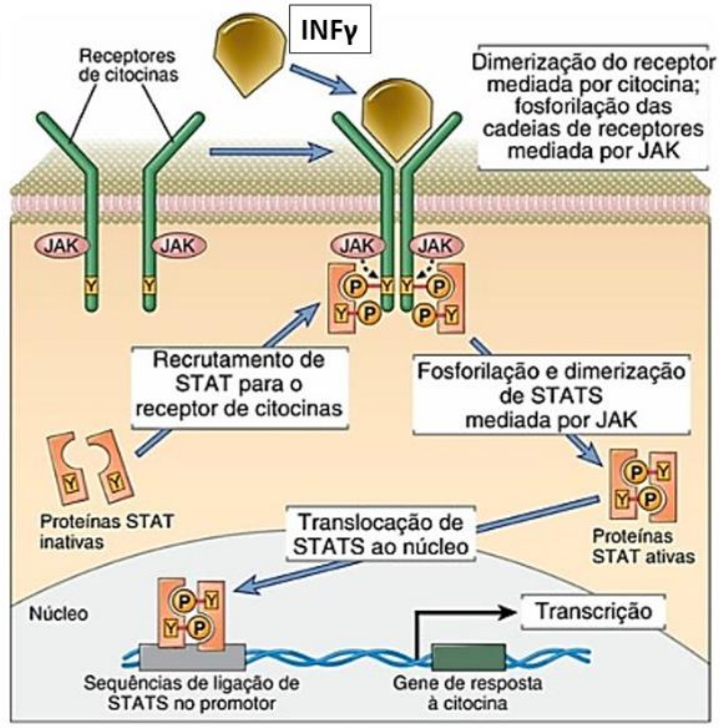
1.1.2.6 Biossinalização por interferon gama

Como monstra a Figura 9, os receptores do tipo II, que correspondem aos receptores de ligação do IFN-γ, são semelhantes aos receptores do tipo I, por terem dois domínios extracelulares com cisteínas conservadas; entretanto, os receptores do tipo II não contêm o motivo WSXWS (triptofano – serina - aminoácido variável - triptofano – serina). No geral, estes receptores são dímeros que consistem em cadeias de ligação às citocinas, sendo frequentemente compartilhados por diversas citocinas mostradas na Figura 9, incluindo a IL-10, outra citocina de interesse no presente estudo. Todos os receptores de citocinas do tipo II, assim como os receptores do tipo I recrutam vias de sinalização da Janus cinase (JAK) – STAT (transdutores de sinal e ativadores de transcrição, do inglês *signal transducers and activators of transcription*)[23].

O IFN-γ é o único interferon do tipo II identificado. É uma citocina solúvel homodimérica secretada principalmente por linfócitos T auxiliares tipo 1 (Th1), linfócitos T CD8, células B, células *natural killers* e células apresentadoras de antígenos (APCs), tais como monócitos, macrófagos e células dendríticas, entre outras. As citocinas IL-12 e IL-18 induzem a produção de IFN-γ, enquanto IL-4, IL-10, TGFβ e glicocorticoides são reguladores negativos da produção de IFN-γ. O gene que codifica a proteína IFN-γ está localizado no cromossomo 12q15 em seres humanos e

no genoma de camundongos é encontrado no cromossomo 10D2. O gene humano para IFN-γ consiste em quatro éxons e três regiões intervenientes, cobrindo 5,4 kb[70].

Figura 10 - Transdução de sinal por interferon gama



Fonte: Abbas et al.[23]

Os receptores de citocinas do tipo II não possuem atividade enzimática intrínseca, mas quando ocupados por seus ligantes, como por exemplo o IFN-γ, ligam-se a um tipo de tirosina – cinase solúvel, as JAKs. Esta ligação ativa JAKs, que fosforilam vários resíduos de tirosina das cadeias receptoras dimerizadas. Uma família de fatores de transcrição, coletivamente chamados de STATs também são alvos da atividade das JAKs, sendo fosforilados. Quando STAT é fosforilado, ele também dimeriza, o que sinaliza para sua translocação para no núcleo da célula como ilustra a Figura 9. Sabe-se que vários outros fatores de transcrição podem ser ativados também, como por exemplo os fatores 1 e 9 de resposta ao INFγ[23,70]. No núcleo, ativa expressão de genes alvos das citocinas do tipo I e II[17,23].

Os principais alvos celulares e efeitos biológicos do IFN-γ são (Figura 10): Células Th0 sob ação do IFN-γ diferenciam-se em célula Th1 (secretoras de citocinas pró-inflamatórias IFN-γ, TNF e IL-2). O IFN-γ é tipicamente secretado por células Th1, tendo como principal alvo os macrófagos, que sob sua ação são ativados, desempenhando funções fagocíticas/microbicidas[23]. A sinalização IFN-γ regula vários

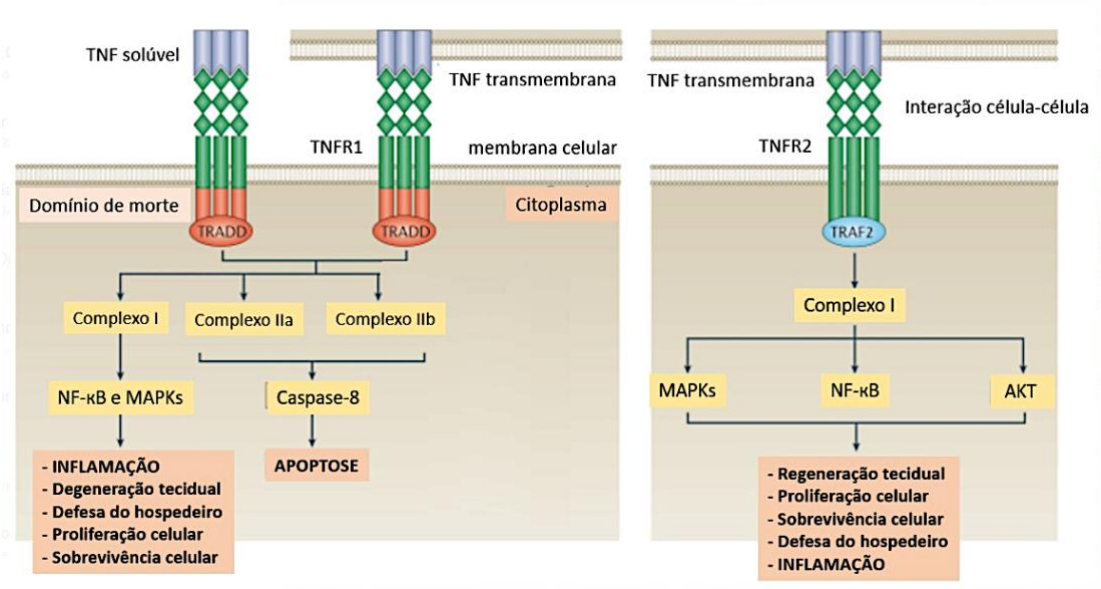
processos fisiopatológicos que são conhecidos principalmente por regular a inflamação e as respostas imunes mediadas por células, incluindo a regulação da resposta imune inata e adquirida, apoptose e ciclo celular. IFN-γ também ativa macrófagos, o que induz a produção citocinas para facilitar o acúmulo de células imunológicas no local da inflamação. O IFN-γ medeia a ativação e a diferenciação de células imunes. Especificamente, o IFN-γ é envolvido na regulação positiva de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade do tipo I e II (MHC I e MHC II), aumentando o processamento e apresentação de antígenos para as células T[23,26,70], promovem a atividade de células *natural killers*, regulam o desenvolvimento e a ativação de células Th1, a expressão de moléculas MHC de classe II e regulação das funções das células B. Sabe-se que a expressão diminuída de IFN-γ torna um indivíduo suscetível a infecções por micobactérias e fungos, destaca-se o papel indispensável do IFN-γ na manutenção do sistema de defesa do hospedeiro. O IFN-γ é um modulador chave da hematopoiese, sua superexpressão pode mediar a supressão da medula óssea e vários distúrbios relacionados à medula óssea, como síndromes mielodisplásicas e anemia aplástica[71]. Estudos têm mostrado IFN-γ medeia o processo de neurogênese e diferenciação neuronal via ativação da via das cinases ativadas por sinais extracelulares (ERK1/2). O IFN-γ desempenha um papel vital no metabolismo de macrófagos. Devido a ativação de uma gama diversificada de moléculas efetoras, a sinalização de IFN-γ regula diversas funções biológicas relacionados ao sistema de defesa antiviral e antibacteriano. Estudos indicam que a sinalização de IFN-γ tem significantes impactos em vários processos fisiopatológicos, tais como a progressão ou regressão tumoral[23,26,70].

1.1.2.7 Biossinalização pela família do fator de necrose tumoral

O termo TNF representa uma superfamília de citocinas pleiotrópicas com importantes funções na homeostase e na patogênese de doenças. Já foram feitas descobertas sobre a biologia do TNF, que apresentaram novos conceitos que têm servido para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas para doenças nas quais o TNF desempenha papel importante. O modelo de sinalização por meio dos receptores de TNF tem sido cada vez mais bem esclarecido sendo relacionado à formação de complexos de sinalização distintos (Figura 11) que podem estar ligados

a diferentes resultados funcionais e até paradoxais, como indução de apoptose (de células infectadas ou em transformação maligna) ou ativação de vias de sobrevivência, proliferação, diferenciação celular, expressão de mediadores de inflamação, outras citocinas, entre outros (muitas vezes relacionadas com processos patogênicos)[23,67,72,73].

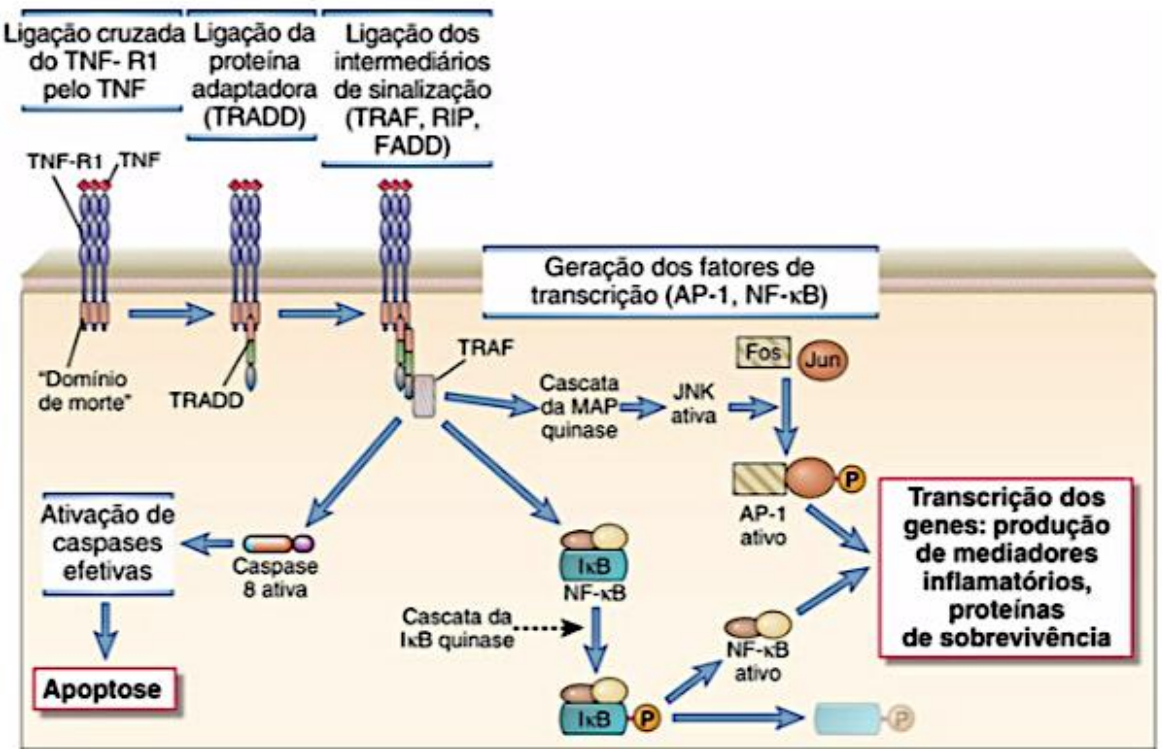
Figura 11 – Principais modalidades de sinalização intracelular e bioatividades causadas a partir da ativação de receptores do fator de necrose tumoral (TNFRs)



Fonte: Adaptado de Kalliolias e Ivashkiv[67]

TNF refere-se à uma superfamília de citocinas que sabidamente podem, por uma lado, medear morte celular (apoptose) e/ou por outro lado, ativação do fator de transcrição nuclear κappa B (NF-κB), via das cinases ativadas por mitógenos (MAPKs), via da fosfoinusitol-3-cinase/proteína cinase B (PI3K/AkT), entre outras (Figura 11 - 16). Cerca de dezenove proteínas já foram identificadas como parte da família TNF com base na sequência, função e semelhança estrutural. O conjunto de todos os receptores da superfamília TNF (TNFRSF) é grande e complexo, o que levou ao desenvolvimento de um sistema de nomenclatura e numeração da superfamília dos receptores do fator de necrose tumoral, que atualmente conta com cerca de 30 membros ou mais[23,67,72–74].

Figura 12 – Vias de transdução de sinais induzidas a partir da ativação da família do receptor do fator de necrose tumoral (TNF)



Fonte: Abbas et al[23]

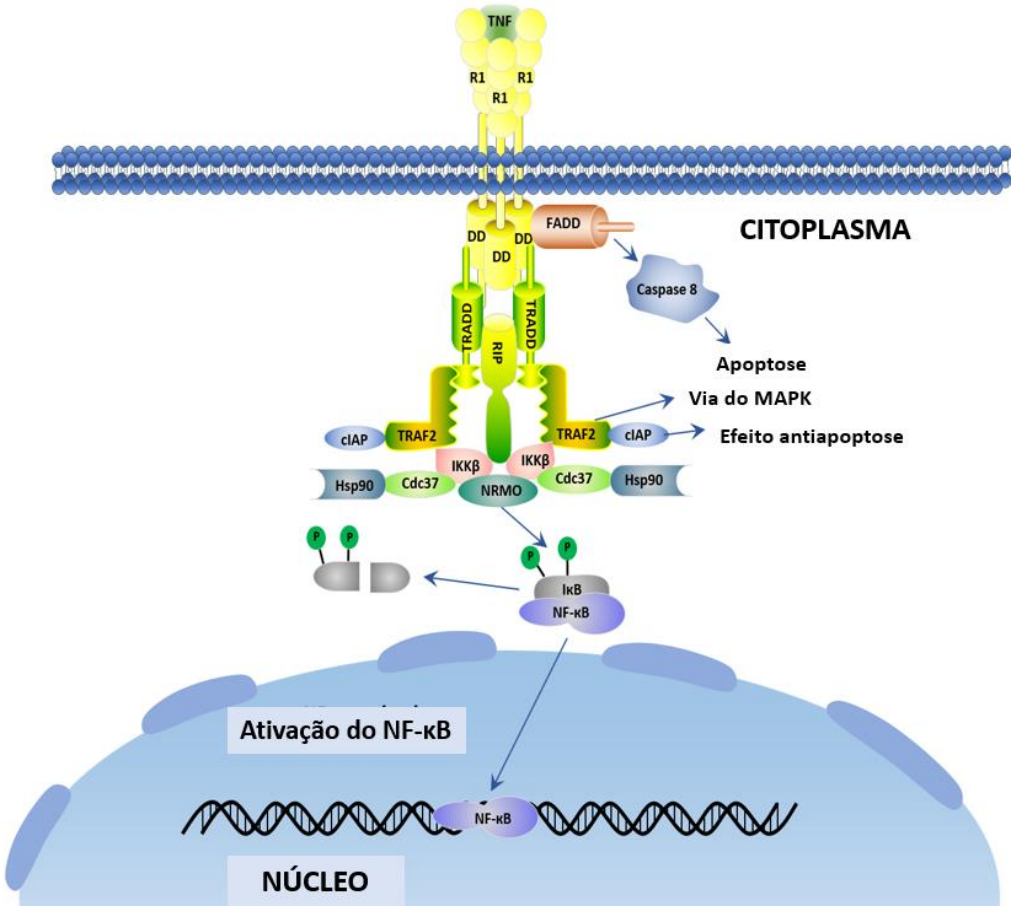
O entendimento sobre a expressão gênica controlada por TNF tem sido aprofundado, incluindo mecanismos epigenéticos e conceitos relacionados à ativação celular, tolerância imunológica, entre outros. A identificação de vias de sinalização homeostáticas e patogênicas induzidas por TNF levou ao desenvolvimento de uma teoria ou conceito que se refere à possibilidade de inibir seletivamente TNF com efeitos deletérios, preservando TNF com bioatividades homeostáticas para fins terapêuticos. Atualmente, este conceito tem sido foco de atenção de muitas pesquisas[23,67,72,73].

O TNF é expresso principalmente por macrófagos e monócitos. No entanto, outras células, como alguns subconjuntos de células T, células *NKs*, DCs, células B, cardiomiócitos, fibroblastos e astrócitos, também são produtores desta citocina em nível baixo mais baixo[72,73]. Os principais alvos celulares (e efeitos biológicos) incluem: a) células endoteliais (ativação, inflamação, coagulação, etc); b) neutrófilos (ativação, degranulação, fagocitose, etc); c) hipotálamo (febre); d) tecido muscular e adiposo

(catabolismo, caquexia, etc), entre outros (como explicado, as citocinas que compõem esta superfamília são pleiotrópicas)[23,67,72,73].

A família do receptor de TNF inclui receptores que são parte de uma grande família de trímeros pré-formados (Figura 12 e 14); alguns dos quais reconhecem ligantes associados à membrana, com domínios extracelulares conservados ricos em cisteína e mecanismos de sinalização intracelular compartilhados que normalmente estimulam a expressão gênica, mas em alguns casos induzem à apoptose (Figura 11, 13 e 16). Como explicado, os receptores desta família são vários. Dois receptores de TNF são considerados principais TNFR1 e TNFR2. Como mostra a Figura 11, os ligantes para estes receptores também formam trímeros; alguns desses estão ligados à membrana (mTNF), ao passo que outros, são solúveis (sTNF)[23,67,72,73].

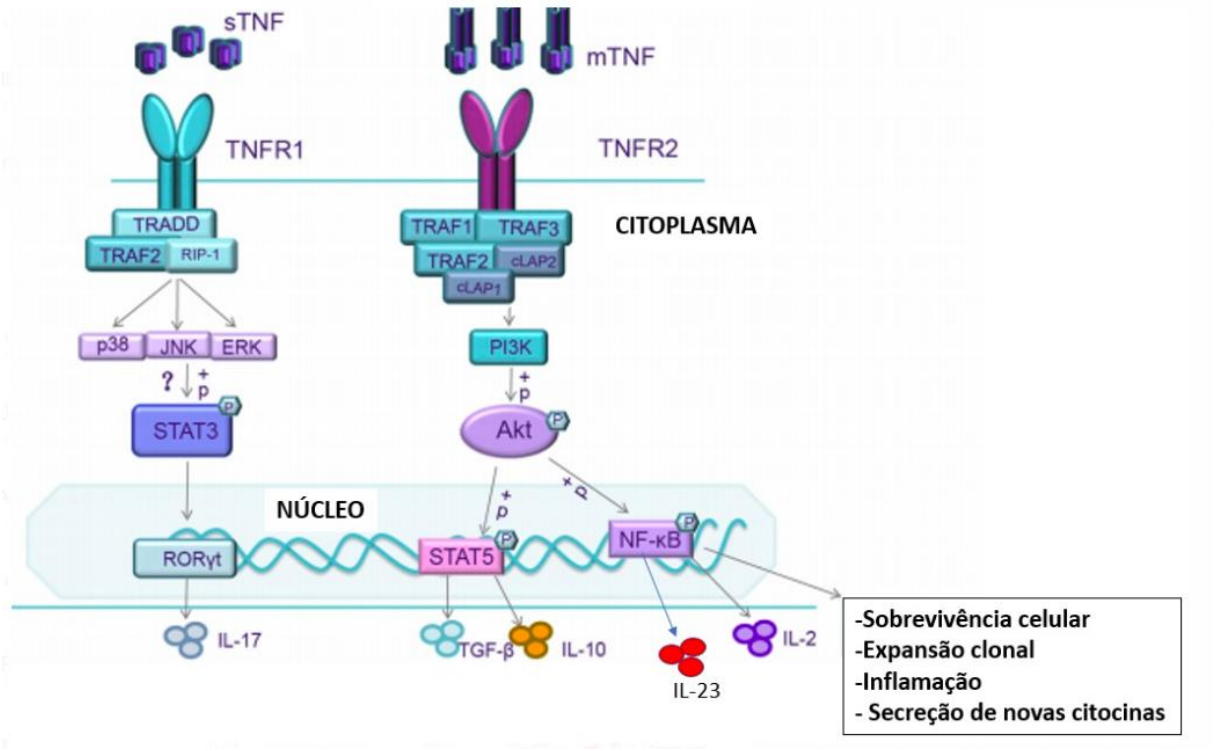
Figura 13 – Ativação de receptores do fator de necrose tumoral (TNFR) possui papel paradoxal: podem induzir à apoptose, por outro lado, em certas circunstâncias podem induzir sobrevivência, proliferação, diferenciação celular, além da expressão gênica de proteínas mediadoras de inflamação e outras citocinas



Fonte: Adaptado de Cusabio®[69] (https://www.cusabio.com/c-20809.html)

A ligação dos ligantes aos receptores triméricos pré-formados do TNF induz tipicamente uma alteração conformacional do receptor e causa recrutamento de proteínas intracelulares adaptadoras para o complexo receptor (Figura 12, 14, 15 e 19). Esses adaptadores, por sua vez, podem recrutar enzimas que incluem tanto ubiquitina ligases E3, mediadoras de poliubquitinação; quanto proteínas cinases, que iniciam sinalização cascata abaixo (*downstream*). Este contexto, no qual a família de TNFRs pode recrutar a proteína adaptadora domínio de morte associado ao receptor de TNF (TRADD, do inglês *TNF receptor-associated death domain* ou domínio de morte associado ao receptor de TNF) que, por sua vez, pode recrutar proteínas chamadas TRAFs (do inglês *TNF receptor associated factors* ou fatores associados ao receptor de TNF) foi mostrado na Figura 12.

Figura 14 – O fator de necrose tumoral solúvel (sTNF) pode ativar a via das cinases ativadas por mitógenos (p38, Jun cinase - JNK e ERK) a partir do receptor TNFR1. O TNF associado à membrana (mTNF) pode ativar a via da fosfoinusitol-3-cinase (PI3K) – proteína cinase B (Akt) a partir do receptor TNFR2



Fonte: Adaptado de Yang et al. [72]

Caso, o receptor de TNF seja ativado por um sinal da superfamília TNF chamado Fas (antígeno 1 de apoptose ou agregado proteico de diferenciação 95,

CD95), costuma-se chamar TRADD de FADD, que significa proteína associada ao Fas com domínio de morte. Isto é, TRADD e FADD possuem papeis praticamente idênticos (veja Figura 15). Sabe-se que a proteína RIP1 cinase (do inglês *receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1* ou proteína cinase que interage com receptores em resíduos de serina/treonina) também pode ser recrutada a partir da ativação do receptor (Figura 13 e 15). Estas proteínas possuem um tipo único de atividade ligase E3 (de ubiquitinação) que serve para causar proteólise e ativação do NF-κB[23,67,72,73].

O receptor de TNF do tipo I (existem duas categorias de receptores diferentes para o TNF, TNFR1 e TNFR2) (Figura 14) e o receptor Fas (ou CD95) (outro receptor da superfamília TNFR) podem recrutar adaptadores que levam à ativação da caspase-8 e dessa maneira, esses receptores podem induzir apoptose em certas células e circunstâncias. Este é um papel importante na eliminação de células infectadas ou mutantes. Contudo, por outro lado, em circunstâncias diferentes, a sinalização a partir de receptor de TNF pode resultar na ativação de NF-κB, das MAPKs, via PI3K-Akt, entre outras (Figura 12, 14 e 15), o que parece depender de circunstâncias especiais, como acontece em processos de inflamação crônica, na presença de coestimuladores que normalmente não estariam presentes e/ou no tipo de receptor que foi ativado[23,72,73].

O TNF é uma citocina pleiotrópica da família TNF que pode sinalizar através do receptor 1 de TNF (TNFR1) e do receptor 2 de TNF (TNFR2). Evidências emergentes demonstraram que o TNFR1 é onipresente em quase todas as células, enquanto o TNFR2 exibe uma expressão limitada, predominantemente nas células T regulatórias (Tregs). Além disso, a via de sinalização por sTNF via TNFR1 desencadeia principalmente vias pró-inflamatórias, ao passo que a ligação do mTNF ao TNFR2 geralmente inicia a modulação imune e a regeneração tecidual.

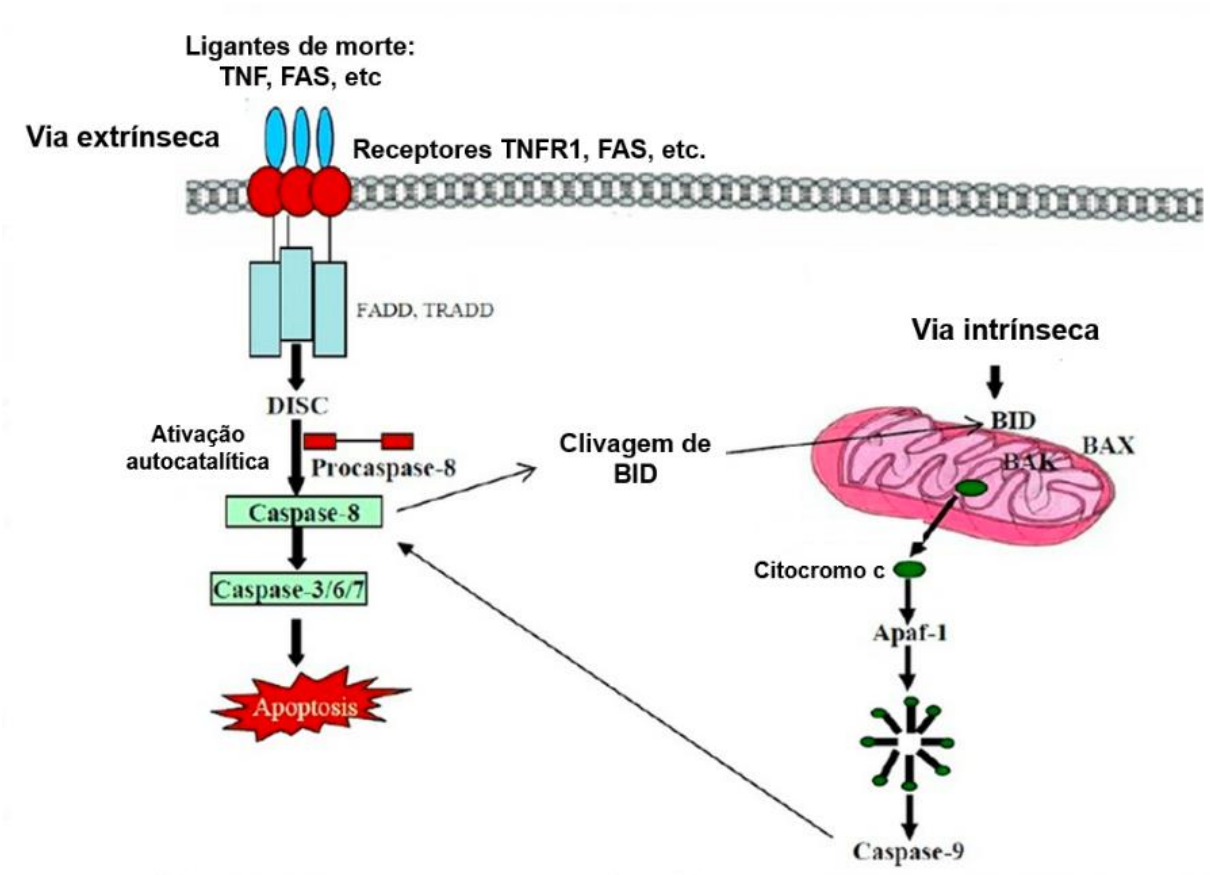
O TNF desempenha um papel crítico na regulação positiva ou negativa da atividade de Tregs. Um desequilíbrio desta atividade pode ser causa de hipersensibilidade/autoimunidade. Uma estratégia terapêutica ideal para doenças autoimunes seria bloquear seletivamente o sinal sTNF/TNFR1 através da administração de inibidores de sTNF ou usar antagonistas do TNFR1, mantendo intacta a via de sinalização do TNFR2. Outra estratégia promissora seria desenvolver agonistas do TNFR2 que poderiam estimular a expansão de Tregs e promover a

regeneração tecidual. A concepção destas estratégias terapêuticas visando as vias de sinalização TNFR1 ou TNFR2 tem sido considerada promissora para o tratamento de diversas doenças inflamatórias e degenerativas[72].

Os ligantes dos receptores da família TNFR podem induzir apoptose por via extrínseca e intrínseca. Na via extrínseca, os ligantes extracelulares ligam-se aos receptores presentes na célula destinada à morte. A ligação na célula alvo desencadeia agregação e recrutamento de proteínas adaptadoras no local citoplasmático dos receptores, formando o complexo de sinalização indutora de morte (DISC). A formação do DISC aproxima as moléculas de pró-caspase, o que facilita sua ativação autocatalítica e liberação no citoplasma, onde elas ativam a cascata de caspases. A caspase-8 ativa também a clivagem da proteína pró-apoptótica, BID (família de proteínas Bcl2), que posteriormente libera fatores pró-apoptóticos mitocondriais (citocromo c) no citosol, o que causa recrutamento de proteína chamada fator de ativação 1 de protease apoptótica (Apaf-1), que forma um apoptossoma que desencadeia a ativação da pró-caspase-9. A caspase-9 ativada inicia ainda mais a cascata da caspases, levando à apoptose[75]. A Figura 15 ilustra o mecanismo de indução de apoptose por ativação do receptor de TNF e da caspase-8[75].

O tratamento com inibidores de TNF tem sido uma estratégia de sucesso para várias doenças, incluindo psoríase. As terapias anti-TNF recentes têm como objetivo a ligação direta do ligante ao TNF. Cinco drogas anti-TNF estão atualmente aprovadas para a terapia de doenças autoimunes humanas, incluindo psoríase em placas e artrite psoriática. Um novo mecanismo de ação de um fármaco moderno (o adalimumabe) prefere a ligação ao mTNF em monócitos e aumenta sua expressão de mTNF, seguido pelo aumento da expressão de Treg TNFR2 e sua ligação ao mTNF. Como consequência, as Tregs funcionais expandidas pelo adalimumabe suprimem mais células Th17.

Figura 15 – Mecanismos de indução de apoptose a partir de ativação de receptores da família do fator de necrose tumoral (TNFRs)

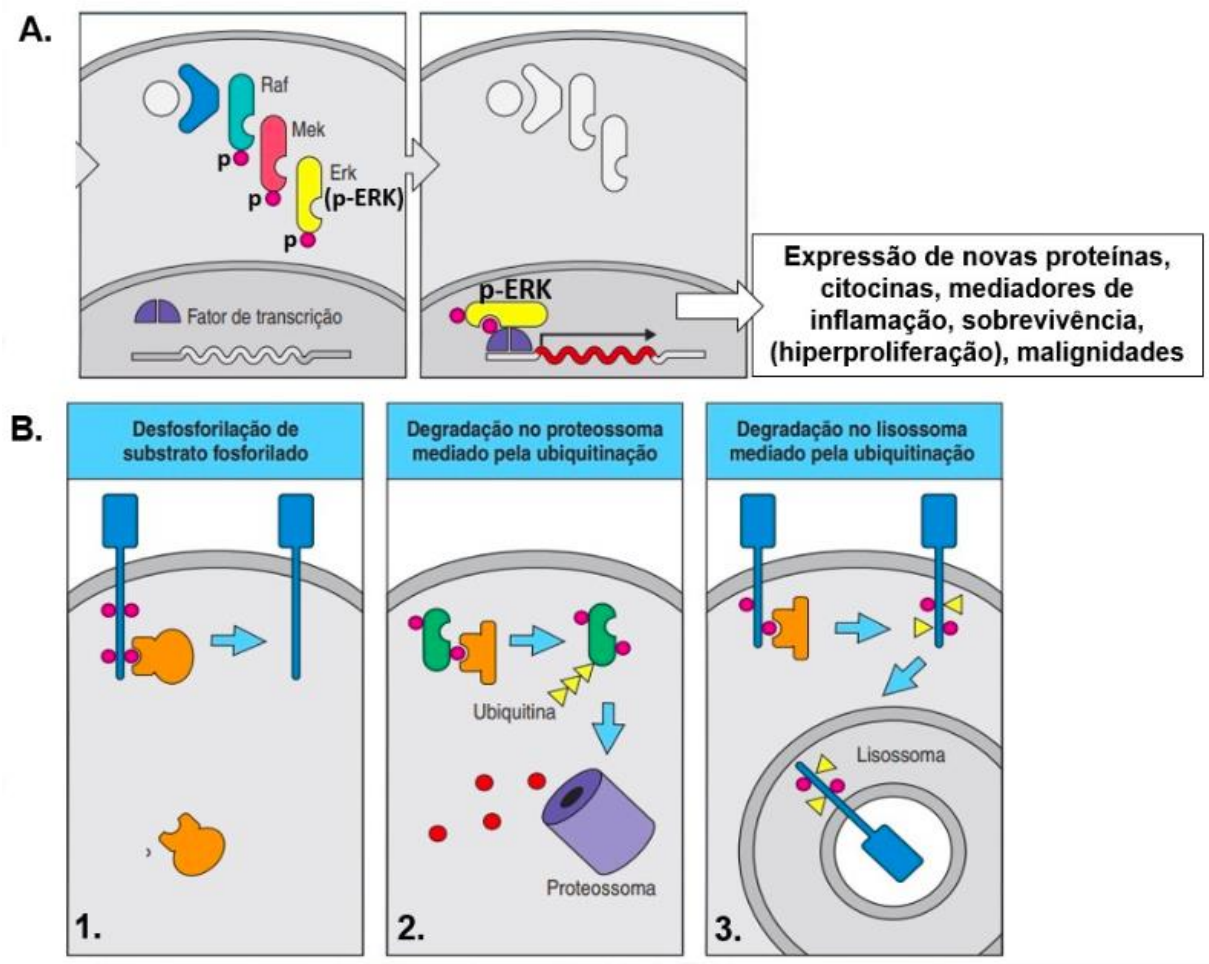


Fonte: Adaptado de Rampal et al.[75]

Como mencionado, a sinalização por TNF pode ativar a via das MAPKs (também conhecida como via da proteína cinase proto-oncogene serina/treonina (Raf)/ da cinase da cinase ativada por mitógeno (MEK) e ERK), que é uma cadeia de proteínas encontradas nas células que traduzem um sinal a partir de um receptor até o ácido desoxirribonucleico (DNA) no núcleo das células, resultando em expressão gênica relacionada com sobrevivência, proliferação e diferenciação celular. Esta via ilustrada na Figura 16(A) também é envolvida tanto com processos fisiológicos, assim como patológicos e o mais marcante na mesma é a atividade de três proteínas-cinase: Raf, MEK e ERK, que formam uma cascata na qual cada cinase ativa a próxima por fosforilações. Quando ativada (fosforilada), a fosfo-ERK (p-ERK) controla alguns dos efeitos biológicos da via, entrando no núcleo e fosforilando fatores de transcrição como a proteína semelhante aos fatores de transcrição da família de fatores específicos da transformação de eritroblastos (Elk1), que modula a transcrição de

mais de 100 genes. As proteínas Raf-MEK-ERK são membros de três famílias maiores, para as quais têm sido utilizadas diversas nomenclaturas[17,23,76].

Figura 16 – Via das cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) (A) e modelos de desativação de vias de biossinalização (B)



Fonte: Adaptado de Murphy et al.[34]

Outro processo importante ilustrado na Figura 16(B) refere-se à desativação das vias de biossinalização, um processo fundamental para homeostase. Pelo menos três protótipos podem representar como uma via de biossinalização pode ser desativada: b1) o receptor e as proteínas cascata abaixo podem ser desfosforilados pela atividade de enzimas fosfatases; b2) os aglomerados proteicos podem ser ubiquitinados e encaminhados ao sistema de degradação proteolítica do proteossoma e b3) o complexo receptor pode ser internalizado através de um sistema de vesículas autofágicas, sendo degradados via lisossoma. É sabido que falhas nesses mecanismos estão diretamente envolvidas com processos patogênicos,

autoimunidade e câncer. Vários estudos têm encontrado a via das MAPKs como componente frequente de processos patológicos associados à inflamação, autoimunidade e malignidades[26,77,78].

Outro fator de transcrição importante que pode ser ativado a partir da ativação de TNFRs é o NF-κB. O NF-κB corresponde a um complexo proteico que controla a transcrição do DNA, regulando várias respostas biológicas e uma variedade de estímulos relacionados a doenças inflamatórias, autoimunes, câncer, entre outras. Desempenha um papel fundamental na resposta imune inata e adaptativa e na inflamação através da regulação de genes que codificam citocinas, moléculas de adesão, quimiocinas, fatores de crescimento e enzimas induzíveis, atuando na regulação da proliferação celular, diferenciação, migração, sobrevivência (apoptose) e outros eventos celulares[79–81].

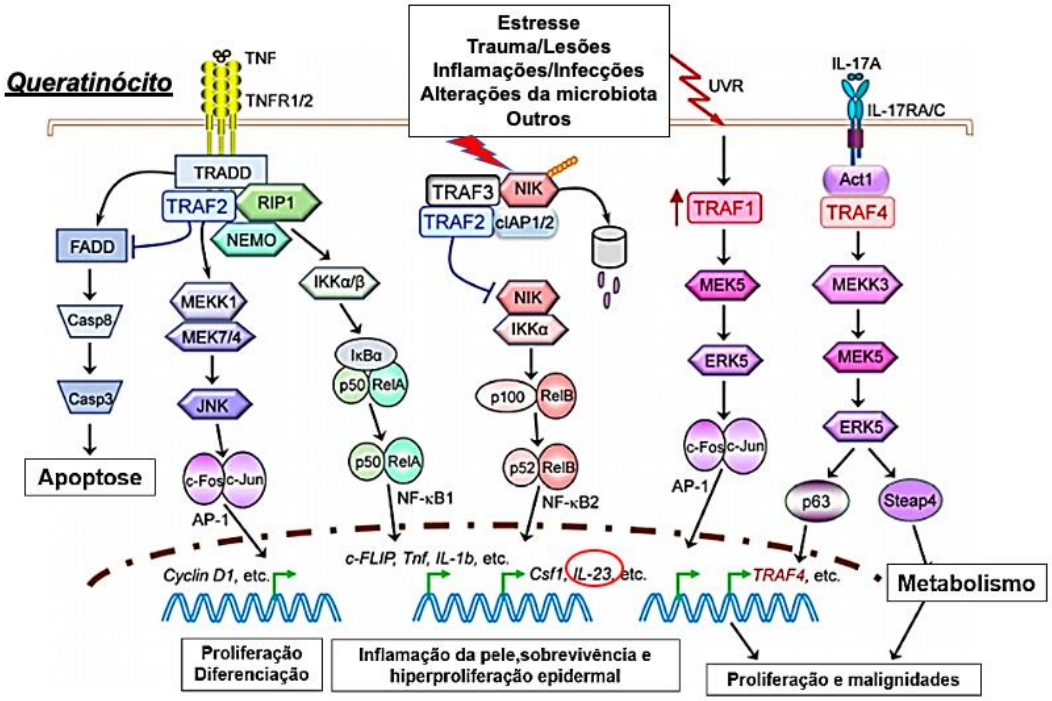
A via NF-κB anormal levará a muitas alterações celulares, como um excesso de estímulo antiapoptótico e ao estímulo descontrolado da divisão celular. O NF-κB é um heterodímero constituído pelas subunidades p65 (também chamada RelA), RelB, c-REL, p50 e p52, podendo formar diferentes complexos diméricos. As moléculas inativas p105 e p100, precursoras das subunidades p50 e p52, respectivamente, formam homodímeros inibitórios da transcrição. Elas possuem uma porção terminal que se liga a um inibidor do κB (IκB), impedindo a ação dos dímeros ativos. As subunidades p105 e p100 precisam ser metabolizadas através da mediação dos proteossomas para se transformarem em p50 e p52[80,81].

O NF-κB é estimulado por uma ampla variedade de estímulos: neurotransmissores (tais como o glutamato), neurotrofinas, proteínas neurotóxicas (como a α-amilóide), citocinas (como o TNF e a IL-1β), glicocorticóides, ésteres de forbol, peptídeo natriurético atrial, ceramidas, produtos provenientes de vírus e bactérias, irradiação ultravioleta, produtos de reações de enzimas, como a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e a COX-2. Independente do estímulo, parece haver participação de ROS e o aumento de cálcio intracelular para a ativação do NF-κB. Quando não estimulado, o fator NF-κB encontra-se no citoplasma ligado à IκB. Esse complexo NF-κB/IκB impede a translocação do NF-κB para o núcleo[82,83].

Avia canônica de ativação da via do NF-κB é realizada por uma grande variedade de estímulos que ativam a proteína sinalizadora chamada TRAF. A TRAF ativada reage com as enzimas do complexo IκB quinase (IKK), um complexo trimérico

composto por 3 subunidades: KK1/IKKα ou IKK2/IKKβ e proteína moduladora chamada NEMO (modulador essencial do NF-κB ou IKKβ/ α). A ação final resulta na fosforilação, poliubiquinização e posterior degradação no proteossoma da IkB, principalmente a IκBα. As IκBα fosforiladas convertem NF-κB inativo na sua forma ativa (predominantemente o dímero RelA/p50) que se dirige para o núcleo da célula. Assim, a fosforilação e a degradação do IκB são necessárias para que ocorra a translocação do NF-κB para o núcleo da célula. A via não canônica do NF-κB ativa o dímero RelB/p52 através de um mecanismo que depende do processamento induzível do p100 no proteossoma ao invés da degradação do IκBα[81].

Figura 17 – Vias de biossinalização com papel na transformação patogênica de queratinócitos da pele



Fonte: Adaptado de Zhu et al.[86]

O NF-κB interage ainda com outros fatores de transcrição envolvidos proliferação celular e inflamação, como o transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3) e o fator induzível por hipóxia (HIF-1). O STAT3 e o NF-κB corregulam numerosos genes que dirigem inflamação, influenciando o crescimento de tecidos através do controle da vascularização, regulando positivamente VEGF e seus receptores. Ele também aumenta a expressão de um dos constituintes dos fatores de transcrição de dedo de zinco (SNAIL), que é essencial para a indução da transição

epitélio-mesenquimal pelo TNF, de componentes de matriz extracelular (EMT) e fatores de crescimento e diferenciação, como o TGF-β. A EMT é caracterizada pela mudança do fenótipo epitelial para mesenquimal que leva à perda ou expressão reduzida dos marcadores de células epiteliais e favorece a progressão, recrutamento e mobilização de células inflamatórias e cancerosas[84,85].

Muito do que foi explicado até aqui com relação à biossinalização que sabidamente tem papel na patogenia da psoríase foi ilustrado na Figura 17. A Figura 17 mostra as vias de biossinalização com papel na transformação patogênica em queratinócitos. A Figura 17 introduz a via da IL-17 e mostra que a ativação do receptor de IL-17 (IL-17R) pode ativar a via das MAPKs (mais detalhes a seguir). A Figura 17 ilustra também que já se sabe que além das citocinas, fatores de estresse tais como as radiações UV, traumas/lesões, inflamações/infecções, alterações da microbiota, entre outros podem induzir a transcrição gênica de outras citocinas, entre elas a IL-23, que sabidamente tem sido envolvida na casuística da psoríase, o que será discutido melhor mais adiante[8,68,86]

1.1.2.8 Biossinalização pela família da interleucina 17

Em 1986, um artigo inovador de autoria de Coffman, Mosmann et al[87] postulou a existência de subpopulações de linfócitos auxiliadores/*helpers* (Ths) caracterizados pela secreção de citocinas distintas que foram designados Th1 e Th2. Este paradigma predominou por aproximadamente duas décadas, até que discrepâncias começaram a aparecer em detalhes do desenvolvimento das células Th, os quais começaram a ser mais refinados. Por exemplo, foi percebido que a deficiência da IL-12 que dirige o desenvolvimento da linhagem de células Th1, normalmente não causava deficiência de IFNγ; citocina assinatura da linhagem de células Th1. A base para este paradoxo tornou-se mais evidente quando foi reconhecido que IL-12p40 que é um componente da IL-23 (junto com IL-23p19) e que em camundongos deficientes de IL-12p40, as citocinas IL-12 e IL-23 também faltavam[88]. Mais tarde, os estudos demonstraram que a IL-23 pode estimular a produção de IL-17A por subpopulações de células $TCD4^+$ (Th17) e que animais deficientes de IL-23p19, mas não deficientes de IL-12p35, eram susceptíveis a certas doenças autoimunes. Esses estudos, revelaram mais uma subpopulação de células Th, atualmente conhecidas como células Th17[89].

Fisiologicamente, já foi demonstrado que a diferenciação de linfócitos Th *naïve* em Th17 pode ser induzida pelas citocinas: TGF-β, IL-6 (que pode ser secretada por macrófagos, células endoteliais e células T), IL-1 (que pode ser secretada por macrófagos, células dendríticas, fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos e hepatócitos) e IL-23 (que pode ser secretada por macrófagos e DCs, mais frequentemente em condições patológicas)[90,91]. Estas citocinas ligam em seus receptores na célula Th *naïve* e ativam os fatores de transcrição, principalmente o fator do receptor órfão relacionado ao receptor de ácido retinóico gama-t (do inglês *retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma-t* - RORγt) e STAT3 e induzem um rearranjo genômico para aquisição do fenótipo Th17. Neste cenário, a citocina IL-23 produzida por macrófagos e DCs parece estar mais relacionada à expansão clonal de células Th17 (Figura 20)[23,89,91].

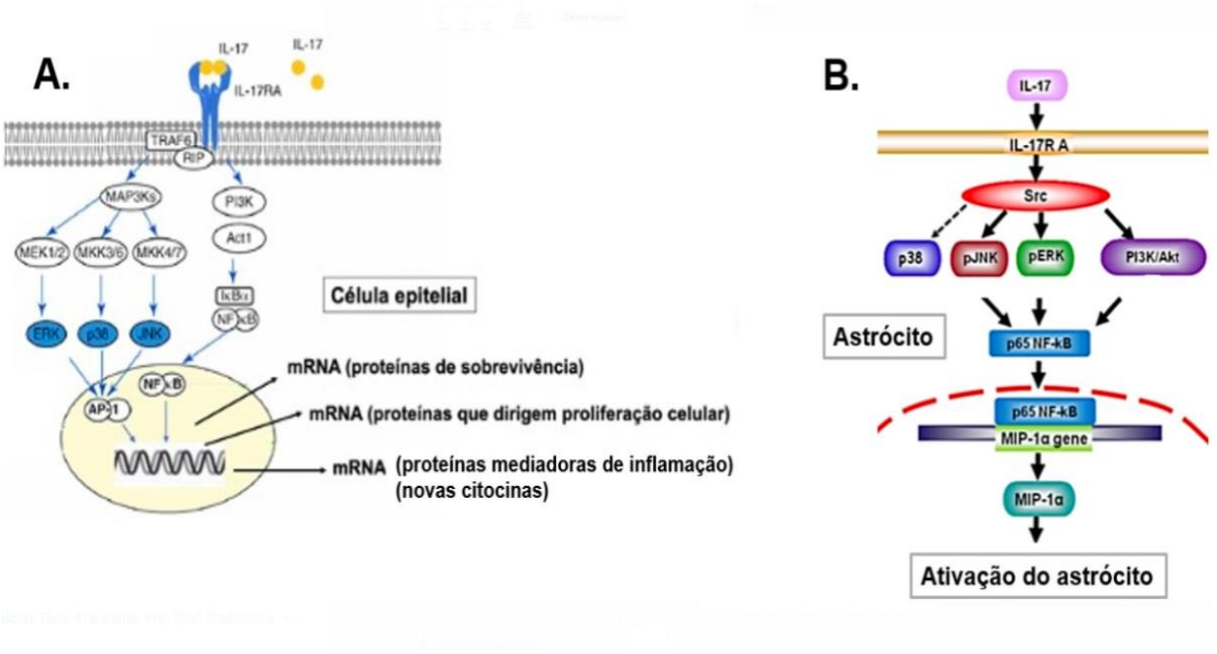
Uma vez ativada, Th17 secreta uma família de citocinas, coletivamente chamadas de IL-17 (A-F), que atua sobre outros leucócitos (notavelmente, recruta neutrófilos em resposta a infecção por certas bactérias e fungos e induz a expressão de peptídeos antimicrobianos; defensinas) e IL-22 que atua em células teciduais aumentando a função de barreira, provavelmente por ação sobre as proteínas de adesão celular. A IL-21 também pode ser secretada a partir de Th17 ativada. Os principais alvos celulares são alvos da IL-17A e são células epiteliais, macrófagos e outros tipos celulares, tipo DCs (Figura 20)[23,89,92].

A IL-17 é uma família de citocinas incomum, porque nem ela nem seu receptor são homólogos a nenhum outro par citocina-receptor conhecido. A família da IL-17 inclui seis proteínas estruturalmente relacionadas, dentre as quais a IL-17A e a IL-17F são as mais similares. As funções imunológicas desta família de citocinas são mediadas principalmente pela IL-17A, que é produzida pela célula Th17, bem como por células linfoides inatas e algumas células $TCD8^{+}\gamma\delta$. A IL-17A e IL-17F são as citocinas da família IL-17 mais bem caracterizadas no contexto da autoimunidade e inflamação [23,89,92].

Os receptores da família da IL-17 foram ilustrados na Figura 9. Eles são oligômeros pré-formados que incluem várias combinações de cadeias A, B, C, D e E que conformam o IL-17R. Os oligômeros do receptor incluem pelo menos uma molécula da cadeia IL-17RA. Cada cadeia do receptor é uma proteína integral de membrana do tipo I, que contém dois domínios extracelulares de fibronectina do tipo

III e um motivo intracelular SEFIR, com estrutura única. O motivo SEFIR encontrado nas cadeias do receptor de IL-17 liga-se ao proteína adaptadora do receptor IL17R (ACT-1) que também contém um motivo SEFIR e que contribui para o recrutamento da proteína TRAF[23]. A Figura 18 ilustra a transdução de sinal através de receptores IL-17R em célula epitelial e astrócito.

Figura 18 - Vias de sinalização intracelular da IL-17A e IL17-F

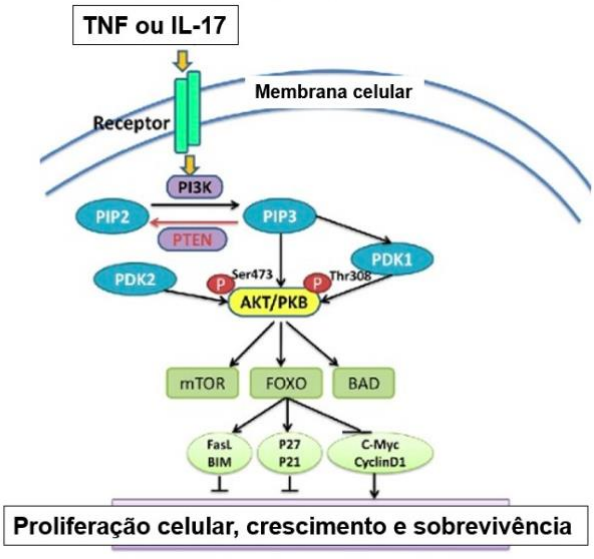


Fonte: Adaptado de Eyerich et al[93](A) e Yi et al.[94](B)

Sabe-se que a ligação da IL-17 com seu receptor provoca a secreção de fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e do fator estimulador de colônias granulocitárias (G-CSF). Estas citocinas fazem progenitores imaturos diferenciarem-se em granulócitos maduros e macrófagos. O G-CSF parece ter um papel no câncer ainda não muito bem compreendido[90,91]. O receptor de IL-17 (IL-17R) possui uma subunidade TRAF e, a partir da ativação do receptor, esta subunidade pode ativar a via do NFκB, JAK-STAT, MAPKs e/ou Akt. Assim, uma quantidade enorme de genes pode ser modulados pela IL-17, o que pode ser utilizado para avaliar a atividade desta via[95–97]. A ligação de IL-17A e IL-17F ao receptor IL17AR ou IL-17FR ativa os receptores como homodímeros ou heterodímeros. Isto resulta na ativação de ACT1 o que leva a formação de um agregado junto com a proteína TRAF e consecutivamente causa ativação do fator NF-κB, adicionalmente, IL-17 induz as vias das MAPKs[93,94].

Na Figura 18(A), a IL-17 está representada por pequenas esferas amarelas. Como é possível observar, quando a IL-17 atinge as células-alvo que possuem receptores de IL-17 (IL-17Rs), os mesmos são ativados. Os receptores que têm forma dimérica e são do tipo tirosina-cinase possuem domínios extracelulares (sítios de ligação da IL-17) e, uma vez ativados, iniciam cascatas de transdução de sinais. Os domínios do receptor localizados em nível das membranas das células autofoforilam e assim ativam outras enzimas (RIP cinase e TRAF, uma classe de ubiquitina ligases). No caso dos astrócitos (Figura 18B), este papel parece ser desempenhado pela proteína Src[94]. As consequências cascata abaixo incluem a ativação MAPKs e da Akt e do NF-κB. Como mostra a figura, a ativação dessas vias leva a translocação de fatores de transcrição do citoplasma ao núcleo das células, onde regulam a expressão de uma variedade de genes relacionados à síntese de proteínas que regulam a sobrevivência, a proliferação celular e inflamação. A IL-17 tem sido relacionada à patogênese de doenças autoimunes e câncer[97].

Figura 19 – Ativação da via da fosfatidilinusitol-3-fosfato (PI3K) – proteína cinase B (Akt) pela família TNF e IL-17



Fonte: Adaptado de Zhang e Zhang[98]

Da mesma maneira que ocorre na ativação da via das MAPKs, a via da PI3K ou Akt também pode ser ativada a partir da interação de algum fator de crescimento com um receptor do tipo tirosina-cinase. No caso da psoríase, isto pode ocorrer tanto na biossinalização mediada por TNF, assim como na via de biossinalização mediada

pela IL-17[98]. O que ocorre é que após a interação ligante - receptor, na sequência destas vias, uma proteína acopladora, alternativamente liga-se a PI3K que converte fosfatidilinusitol 4, 5 bifosfato (PIP2) na membrana em fosfatidilinusitol 3, 4, 5-trifosfato (PIP3). A partir daí a proteína cinase dependente de fosfoinositida 1 e 2 (PDK-1 e PDK-2, respectivamente) ativa uma segunda proteína, a proteína cinase efetora B, também conhecida como Akt. Os alvos da Akt são proteínas que têm papel central na regulação geral da função celular, tais como: sobrevivência, proliferação e mediadores de inflamação[99–101]. Assim, muitos pesquisadores têm investido esforços na identificação de inibidores da via da Akt. Pesquisadores da indústria farmacêutica Abbot já relataram o desenvolvimento de uma série inovadora de análogos de piridina que podem ligar-se ao sítio ligante de adenosina trifosfato (ATP) da Akt e inativá-la. Eles pretendem testar estes compostos no tratamento de algumas doenças, incluindo a psoríase[102].

1.1.2.9 A ativação de células apresentadoras de antígenos (APCs) é o primeiro passo para a indução da imunidade adaptativa: moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC I e MHC II)

Historicamente, a imunidade adaptativa foi dividida em imunidade humoral, que pode ser transferida de um doador imunizado a um hospedeiro virgem através de anticorpos e imunidade celular, que pode ser transferida por linfócitos T. A imunidade humoral mediada por anticorpos elimina microrganismos extracelulares e toxinas acessíveis aos anticorpos; estes que intensificam a fagocitose por opsonização auxiliando na destruição dos patógenos no interior dos fagócitos. Entretanto, os anticorpos não podem atacar microrganismos que vivem dentro dos fagócitos e de outras células. Assim, a imunidade mediada por células T evoluiu para conferir defesa contra este tipo de ameaça[23,26,32].

A ativação de APCs é o primeiro passo para a indução da imunidade adaptativa. As células especializadas que capturam, apresentam antígenos e ativam linfócitos T são chamadas de APCs. Estas células são altamente especializadas e no geral podem fagocitar e/ou processar os antígenos para depois exibir seus fragmentos imunogênicos na superfície celular, com o auxílio de outras moléculas coestimuladoras, as proteínas necessárias à ativação das células T virgens (as

moléculas do MHC I e II). As principais APCs são as DCs, os macrófagos e as células B[26]. Os receptores das células T $CD4^+$ e $CD8^+$ são específicos para antígenos que são apresentados por MHCII-antígeno e MHCI antígeno, respectivamente[23,26].

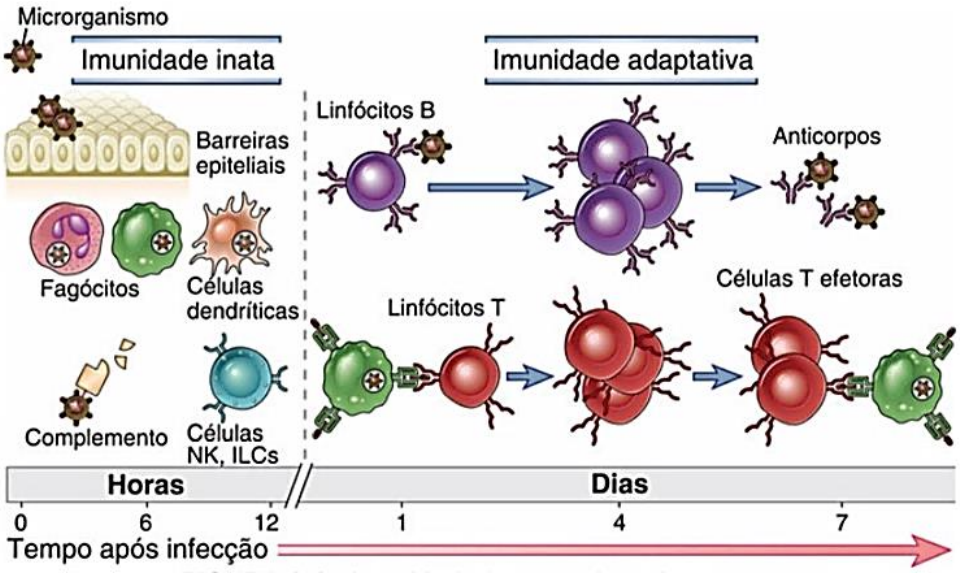
A descoberta do papel fundamental das moléculas do MHC na apresentação de antígenos para as células linfócitos T $CD8^+$ (efetores citotóxicos – Tc), linfócitos T $CD4^+$ (auxiliares ou Th) revolucionou o campo da imunologia e abriu caminho para a nossa atual compreensão da ativação e funções dos linfócitos[23,28,34,38]. Elas são glicoproteínas de membranas codificadas em um grupo de genes chamado de complexo de histocompatibilidade principal ou sistema antígeno leucocitário humano, ou HLA (sigla em inglês: *human leukocyte antigen*). A abreviação mais utilizada para se referir a estas macromoléculas é MHC e elas são expressas em sistemas de membranas, culminando na superfície das células. Células APC expressam MHC I e MHC II. MHC I é expresso por todas as células do organismo, ao passo que MHC II é restrito às células APC[26,28,36]. Desta forma, antígenos associados com moléculas MHC de classe II ativam células T $CD4^+$ e levam à produção de citocinas que, por sua vez, podem ativar uma ampla gama de células ao seu redor e polarizar as respostas imunes mais adequadas para defesa contra um determinado patógeno (Figura 23B e 30). Em contra partida, os antígenos apresentados em associação com moléculas MHC de classe I ativam células T citotóxicas $CD8^+$[23,26,28,103,104]. Os receptores e a biossinalização mediada a partir da ativação de receptores de linfócitos serão mais bem detalhados adiante.

A indução de uma resposta imune adaptativa inicia quando um patógeno é fagocitado por DCs imaturas no tecido infectado. Estas células fagocíticas especializadas residem na maioria dos tecidos (também na circulação) e, como os macrófagos, são de longa duração comparadas a outras células sanguíneas brancas. Elas originam-se na medula óssea, e, enquanto imaturas, migram através da corrente sanguínea para suas estações periféricas, onde monitoram o ambiente para a presença de patógenos. Como os macrófagos e neutrófilos, as DCs imaturas também possuem receptores em suas superfícies (RRPs - Quadro 1), que reconhecem características comuns de muitos patógenos, como os lipopolissacarídeos bacterianos. Os componentes microbianos ligados a estes receptores estimulam as DCs a engolfar o patógeno e degradá-lo intracelularmente[26]

As DCs imaturas também recolhem material extracelular continuamente, incluindo partículas virais e bactérias, debris celulares, pelo mecanismo de macropinocitose independente de receptor e são, dessa forma, capazes de internalizar e degradar patógenos que seus receptores da superfície celular não detectam necessariamente. A função das DCs, contudo, não é primeiramente destruir os patógenos, mas sim levar antígenos patogênicos aos órgãos linfoides periféricos e lá apresentá-los aos linfócitos T[105–107].

Existe uma população de linfócitos T na circulação, mas seu principal sítio de localização são os linfonodos periféricos. Capturando os patógenos e seus componentes, as DCs são ativadas, tornando-se células apresentadoras de antígeno altamente efetivas, guiadas por quimiocinas são drenadas pelo sistema vascular linfático e migram para os órgãos linfoides periféricos na vizinhança, (Figura 23A). Elas apresentam fragmentos de antígenos patogênicos em sua superfície (por meio de MHC I/II para os linfócitos), simultaneamente ocorre expressão de proteínas de superfície celular conhecidas como moléculas coestimuladoras, que, como o nome sugere, fornecem sinais gerados a partir da interação com os antígenos (uma variedade de citocinas e quimiocinas) para estimular os linfócitos T a proliferar e diferenciar-se em sua forma completamente funcional. Estas células podem retornar à circulação sanguínea sistêmica até alcançarem o sítio de ação através do ducto torácico ilustrado na Figura 23C. Pelo fato de as células B não serem ativadas pela maioria dos antígenos sem o “auxílio” das células T auxiliares ativadas, a ativação de linfócitos T virgens é um estágio inicial essencial em virtualmente todas as respostas imunes adaptativas. As DCs ativadas também secretam citocinas que influenciam as respostas imunes inata e adaptativa, tornando essas células vigilantes essenciais que determinam se e como o sistema imune irá responder à presença de agentes infecciosos[26,107].

Figura 20 - As células apresentadoras de antígenos (APCs): a ativação de APCs é o primeiro passo para a indução da imunidade adaptativa



Fonte: Abbas et al[23]

A Figura 20 apresenta os constituintes primários e secundários do sistema imune, responsáveis pelas respostas imunes inata e adaptativa respectivamente. Por meio da Figura 20, é possível observar que a defesa contra microrganismos é mediada primeiro pelas reações iniciais da imunidade inata e posteriormente pela imunidade adaptativa. A imunidade adaptativa possui habilidades de distinguir diferentes padrões moleculares (estas respostas apresentam marcadamente alto nível de especificidade) e respondem mais vigorosamente a exposições repetidas ao mesmo microrganismo devido a um fenômeno conhecido como memória imunológica. São protagonistas da imunidade adaptativa, as respostas mediadas por linfócitos T e B[34,36,40].

De forma resumida, vale considerar a diferenciação de pelo menos três das principais linhagens linfocíticas: Linfócitos T $CD8^+$, linfócitos T $CD4^+$ e linfócitos B. Todas estas subpopulações possuem receptores altamente específicos e, em princípio, antes de terem o primeiro contato com o antígeno (acontecer o primeiro reconhecimento/a sensibilização), todas as três linhagens são consideradas *naïves* ou virgens[28,30].

1.1.2.10 Ontogenia de linfócitos

No começo, uma célula progenitora compromete-se com a linhagem linfoide (derivada de uma célula tronco presente na medula óssea), em resposta a estímulos químicos (principalmente fatores de crescimento e citocinas) que ativam vias de transdução de sinais que levam a um rearranjo da expressão de genes do sistema V, D, J e C; o que dirige a expressão dos complexos receptores dos linfócitos altamente específicos. Esta especificidade coloca os linfócitos à parte das demais células do sistema imune apresentadas até agora. Estes receptores possuem cadeias polipeptídicas principais e mais uma série de proteínas (cadeias polipeptídicas) que são correceptores (CDs, do inglês *cluster of differentiation*) ou marcadores de superfície (muitos não mostrados na Figura 21 com o objetivo de resumir o processo). Atualmente, na era pós-genômica, a possibilidade de detectar a expressão de tais marcadores é utilizada para determinar cada estágio da maturação dos linfócitos, normalmente por citometria de fluxo com fluorescência[23,26,30,32].

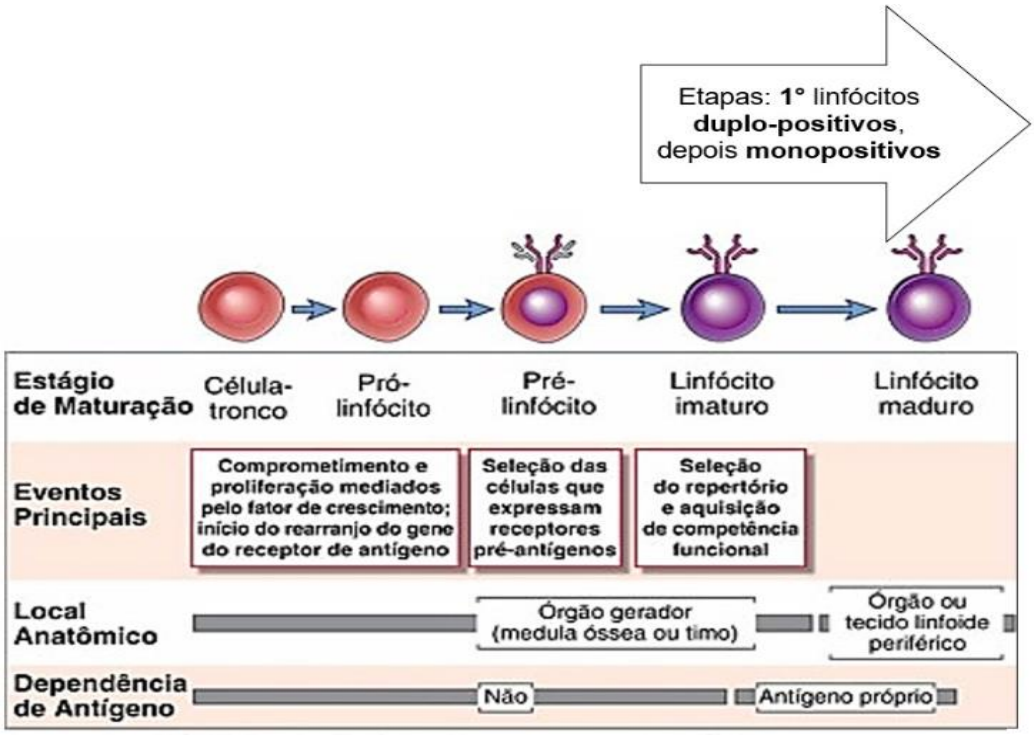
1.1.2.10.1 Ontogenia dos linfócitos T

No que se refere à diferenciação dos linfócitos T, as células precursoras em princípio são encontradas na medula óssea, de onde saem e seguem pela corrente sanguínea até o timo. Os linfócitos imaturos no timo, recém-chegados da medula óssea, contêm os genes para expressão das proteínas que compõem os receptores das células T (TCRs), mas ainda em configuração de linhagem germinativa, ou seja, ainda em estágio de maturação de pró-linfócitos, como mostra a Figura 21[23,26,32,108,109].

No timo, na fase inicial, os progenitores das células T são chamados de timócitos. Em uma etapa subsequente de diferenciação (pré-linfócito, Figura 21) inicia a expressão do receptor da célula T complexo, primeiro duplo positivo (com correceptores CD4 e CD8), incluindo a expressão de proteínas CD3, cadeias ζ, entre outros correceptores (CD44, CD25, etc). As etapas finais de diferenciação evolvem uma etapa (ponto de checagem) de seleção positiva de timócitos, na qual são mantidos repertórios de células T restritos ao MHC próprio. A etapa de ponto de checagem de seleção positiva refere-se a um processo no qual os timócitos, cujo os TCRs que se ligam com baixa avidez (com fraca afinidade) com complexos peptídeo próprio - MHC próprio, são estimulados a sobreviverem e se diferenciarem em células

T CD4^{+} ou TCD8^{+}; uma etapa da diferenciação subsequente, na qual os timócitos são chamados de simples – positivos (ou monopositivo). Assim são gerados os linfócitos T CD4^{+} e T CD8^{+}[23,36,108–111].

Figura 21 – Ontogenia de linfócitos.



Fonte: Abbas et al[36]

A etapa (ponto de checagem) de seleção negativa de linfócitos está entre os processos cruciais ao desenvolvimento de tolerância imunológica, que começa primeiro em nível central (no timo), selecionando células T úteis e eliminando células T potencialmente danosas. No ambiente tímico, autoantígenos são apresentados para os linfócitos em maturação por meio de moléculas MHC. Os linfócitos que apresentarem hiperreatividade serão eliminados por apoptose ou, alternativamente, também no timo, uma célula T hiperreativa em relação a um autoantígeno pode sofrer rearranjo genético de seu receptor e ser convertida em uma célula Treg. As Tregs são células geradas principalmente pelo reconhecimento de autoantígenos no timo e reconhecimento de antígenos estranhos pelos órgãos linfoides periféricos. A geração de Tregs necessita do fator de transformação do crescimento beta (TGF-β) e sua sobrevivência e competência funcional depende da IL-2. As Tregs suprimem respostas imunológicas em múltiplos estágios, tais como: durante a indução da

ativação das células T nos órgãos linfoides, na fase efetora da resposta destas células nos tecidos. Também pode suprimir a ativação de células B e inibir células NKs. Para isso, as Tregs secretam citocinas imunossupressoras IL-10 e TGF-β, ou interferem na ligação de moléculas B7 nas células APCs com coestimulador CD28 nos linfócitos. Acredita-se ainda que devido as Tregs expressarem altos níveis de receptores para IL-2, dessa maneira essas células podem consumir IL-2 privando outras populações celulares da interação com essa citocina[112]. As Tregs desempenham uma das principais funções responsáveis pela manutenção da tolerância imunológica. A falha neste processo pode explicar em parte as desordens autoimunes[30,36,110].

No córtex tímico, os timócitos expressam primeiramente TCRs γδ ou αβ (mostrados na Figura 22). As células T αβ irão se diferenciar em células T $CD4^+$ auxiliares (T *helpers* ou Ths) que se ligam a receptores do MHC de classe II presentes em APCs, tais como macrófagos e DCs por exemplo; ou células T $CD8^+$ que reconhecem MHC I presentes em praticamente todas as células[110,113].

Uma vez diferenciadas, as células T $CD4^+$ ou $CD8^+$ *naïves* saem do timo pela circulação, passando a povoar principalmente linfonodos na periferia, onde o processo de seleção é consolidado. Nos linfonodos, também acontecem etapas de pontos de checagem, nas quais os linfonodos continuam por meio de moléculas MHC a apresentar autoantígenos inexistentes em nível central e novamente, células T que apresentarem hiperreatividade frente a autoantígenos serão eliminados por apoptose ou, alternativamente, serem convertidos em Tregs. Os pontos de checagem que ocorrem nos linfonodos periféricos também são cruciais para homeostase e geração de tolerância imunológica. Todavia, os linfonodos representam também os sítios principais onde iniciam os processos que levam à defesa contra patógenos e, eventualmente, à imunidade[30,36].

Os receptores antigênicos das células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ restritos ao MHC (Figura 22) são heterodímeros que consistem principalmente em duas cadeias polipeptídicas transmembrana, designadas cadeias α e β do TCR, covalentemente ligadas uma à outra por uma ponte dissulfeto entre resíduos de cisteínas extracelulares. As células T que expressam esta forma de TCR são chamadas de células Tαβ. Um tipo menos comum de TCR é composto por cadeias γδ e as células nas quais são expressas são chamadas células Tγδ. Cada cadeia do TCR α e β consiste em um domínio N- terminal variável (V) e um domínio constante (C) do tipo

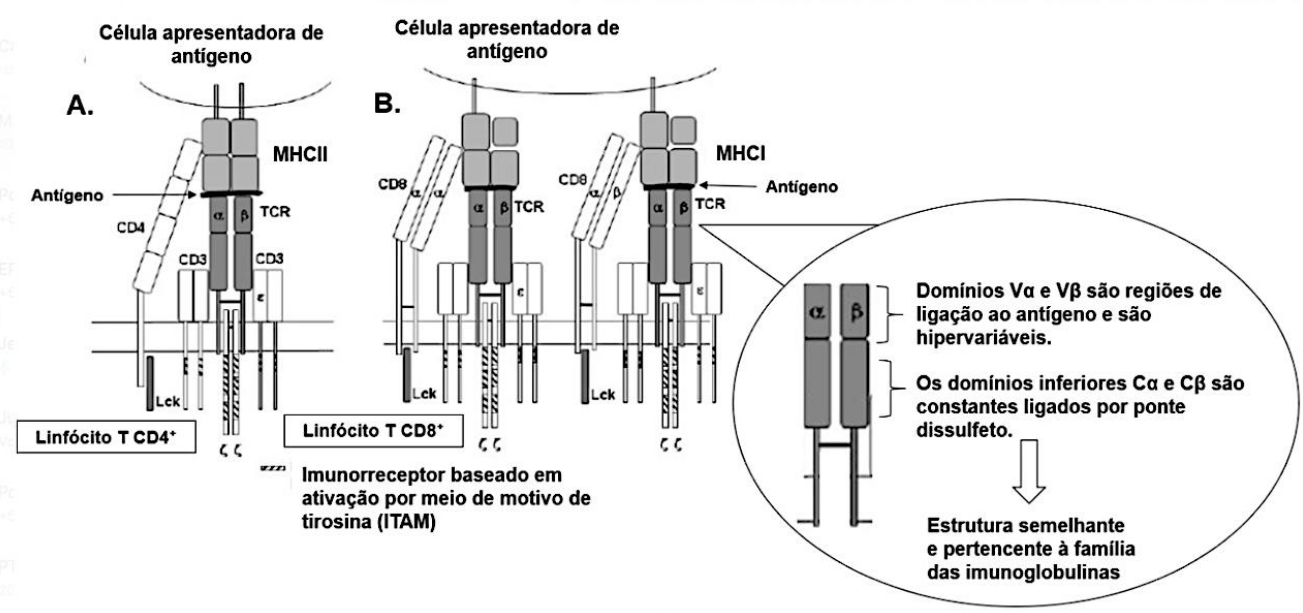
imunoglobulina (Ig). O domínio C é uma região hidrofóbica transmembrana com uma curta região citoplasmática. Assim, a porção extracelular do heterodímero TCR αβ é estruturalmente semelhante ao fragmento de ligação ao antígeno (Fab) de uma molécula de Ig, o qual é composto por região variável (V) e constante (C) em cada cadeia leve e por uma região V e uma região C em cada cadeia pesada[23,26,32].

As regiões V das cadeias do TCR α e β contêm trechos curtos de aminoácidos nos quais a variabilidade entre diferentes TCRs está concentrada, formando as regiões hipervariáveis ou regiões determinantes de complementariedade aos antígenos. Juntos, esta porção do TCR é quem reconhece especificamente os complexos antígeno-MHC. As proteínas CD3 e ζ estão associadas de forma não covalente ao heterodímeros TCR αβ para formar o complexo TCR e quando o TCR reconhece o antígeno, estas proteínas associadas transduzem os sinais que resultam na ativação da célula T[23].

A sinalização pelo receptor das células T inicia com a ligação de complexo MHC-antígeno ao TCR e resulta em um agrupamento dos correceptores com o receptor αβ; ocorre fosforilação de resíduos de tirosina nos motivos de ativação de imunoreceptores baseado em tirosina (ITAM) ilustrados na Figura 22 por cinases chamadas Lck da família Src. Primeiro, a cinase Lck associa-se seja a calda citoplasmática do CD4 ou CD8 e depois fosforilam os motivos ITAM de CD3 e cadeias ζ. Estes sítios tornam-se sítios de ancoragem de outra tirosina cinase chamada ZAP-70 (proteína de 70 kDa associada a ζ, que fosforila outras proteínas adaptadoras, incluindo a proteína adaptadora associada a linfócito T (LAT). LAT serve para recrutar uma variedade de componentes sequenciais da cascata de sinalização (*downstream*). As vias de sinalização *downstream* do TCR incluem a via das MAPKs, Akt, NFkB, entre outras, que levam às respostas funcionais das células T: ativação, expansão clonal, desenvolvimento de células de memória; produção de citocinas no caso dos linfócitos T $CD4^+$ e atividade citotóxica no caso de linfócitos T $CD8^+$ pela liberação de perforinas e granzimas. Também pode ocorrer ativação pela proteína ativadora 1 (AP-1) que é um fator de transcrição que regula a expressão gênica em resposta a uma variedade de estímulos, incluindo citocinas, fatores de crescimento, estresse e infecções bacterianas e virais. O AP-1 controla vários processos celulares, incluindo diferenciação, proliferação e apoptose[23,26,32].

Durante a diferenciação (maturação) do linfócito B, as células da linhagem linfóide comprometidas com a célula B passam por estágios distinguíveis, cada um dos quais caracterizados também por marcadores de superfície celular distintos e um padrão específico de genes de Ig. Os principais estágios e pontos de checagem da maturação dos linfócitos B e mais detalhados adiante[23,110,114,115].

Figura 22 – Constituição dos complexos receptores de linfócito T CD4⁺ e CD8⁺ (TCRs)



Fonte: Adaptado de Janeway[116]

1.1.2.11 Ativação de linfócitos T

A partir de um pequeno conjunto de linfócitos virgens específicos para um antígeno, o processo de ativação das célula T gera um grande número de células efetoras (processo chamado de expansão clonal), com a mesma especificidade, que atuam para eliminar aquele antígeno. Nesse processo também é gerada uma população de células de memória de longa vida, capazes de reagir mais rapidamente contra o antígeno caso ele seja reintroduzido. Como já explicado, uma característica fundamental destas respostas é que a ativação inicial é desencadeada pelo reconhecimento do antígeno via TCR. A ativação inicial de linfócitos T virgens ocorre principalmente em órgãos linfoides periféricos (secundários), nos quais essas células

circulam normalmente e onde devem encontrar antígenos apresentados por DCs maduras[23,117].

O reconhecimento do antígeno, junto com outros estímulos de ativação, induz várias respostas biológicas nas células T: expressão de citocinas, coestimuladores; expansão clonal e diferenciação de células virgens em linfócitos efetores e de memória. As células T efetoras reconhecem os antígenos tanto em órgãos linfoides, assim como em tecido não linfoide periféricos. A ativação dos linfócitos T, proliferação e diferenciação em células efetoras e de memória requer reconhecimentos dos antígenos pelos TCRs, coestimulação e citocinas. A coestimulação refere-se a sinais fornecidos por APCs, por meio de moléculas denominadas coestimuladores, além dos sinais induzidos pelos antígenos. Entre as vias de coestimulação mais bem caracterizadas envolvidas com a ativação das células T está uma via que envolve um coreceptor de superfície (das células T) chamado CD28, que se liga a moléculas coestimuladoras B7-1 (CD80) ou B7-2 (CD86) que são expressam na superfície das APCs ativadas. Sabe-se que a inibição da expressão/função da interação CD28 e B7-1 e 2 é um mecanismo que regula a homeostase (tolerância imunológica) que protege a integridade dos tecidos[23,118–120].

Após a ativação pelo reconhecimento do antígeno e coestimulação, ocorrem alterações características de várias moléculas de superfície nas células T (CD69, CD25, ligante de CD40, CTLA-4), expressão de moléculas de adesão e receptores de quimiocinas, além de secreção de numerosas citocinas que desempenham papeis cruciais nas respostas imunes adaptativas. As células Th produzem a maior quantidade e variedade de citocinas (mais detalhes adiante), mas células T $CD8^+$ e APCs também secretam citocinas especialmente importantes para diferenciação da célula T virgem em efetora. A maioria dessas citocinas tem ação autócrina ou parácrina. Aqui vale destacar o papel da IL-2 que estimula as respostas de células T. A IL-2 é um fator de crescimento, sobrevivência, diferenciação e proliferação de células T. Sua secreção é estimulada por antígenos e ela tem papel na manutenção de células Tregs e tem papel na polarização das respostas imunes para defesa do organismo ou tolerância imunológica (Figura 24)[23,121,122]. Em infecções agudas as células T $CD8^+$ são ativadas e eliminam as células infectadas. Em situações de exposição antigênica crônica, sabe-se que os linfócitos T $CD8^+$ podem começar expressar receptores de inibição, tais como o inibidor indutor de morte celular

programada-1, uma proteína de ponto de checagem das células do sistema imune (PD-1), que é expressa em situações de exaustão da célula, na qual ela é incapaz de responder à célula infectada[123]. PD-1 é um receptor da família CD28 que também tem papel na não responsividade funcional das células T (anergia) induzida em situações onde se desenvolve tolerância imunológica e falhas ou mutações de PD-1 já foram relacionados à patogênese de doenças autoimunes[124].

1.1.2.11.1 Funções de células Th CD4⁺ efetoras e polarização das respostas imunes

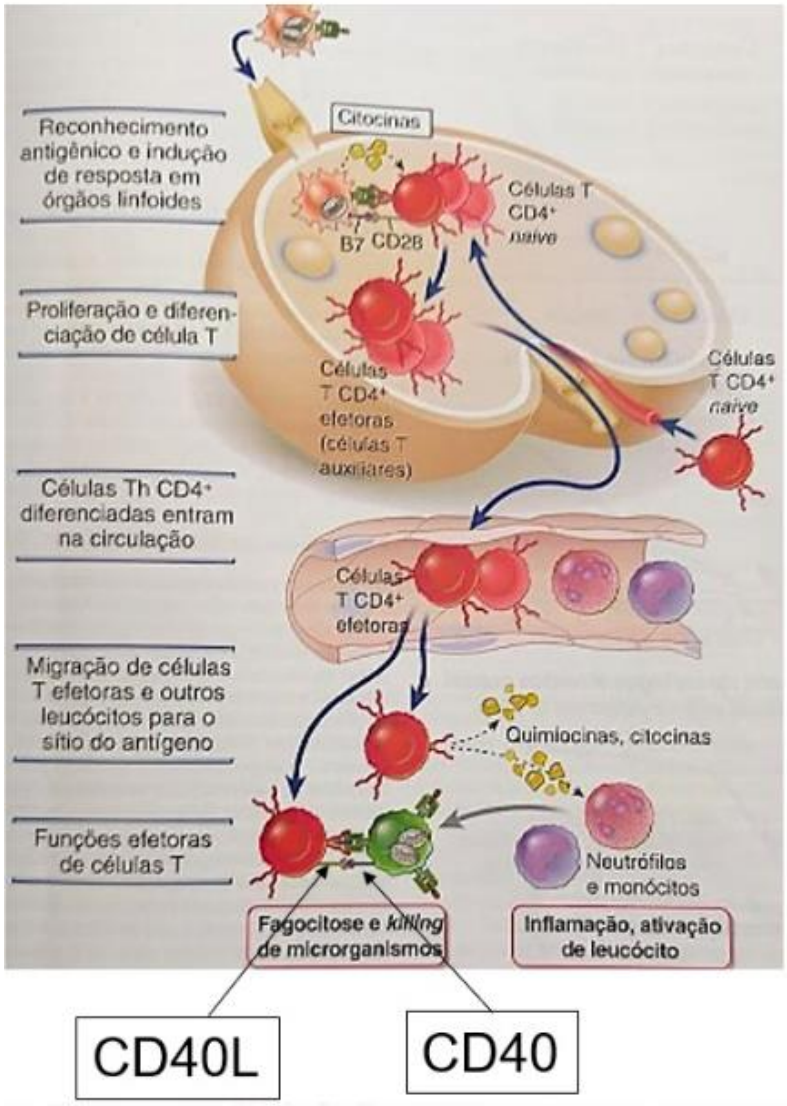
Os linfócitos T CD4⁺ são chamados de auxiliares (Ths). Eles atuam como verdadeiros maestros das respostas imunes, agindo principalmente pela secreção de citocinas com ação autócrina e parácrina principalmente, que elicitam, amplificam e polarizam as respostas imunes mais adequadas a depender de cada tipo de patógeno/imunógeno, dos coestimuladores expressos/ativados e das citocinas secretadas[125].

Caracteristicamente, os linfócitos T CD4⁺ efetores produzem citocinas que medeiam as suas funções. Eles também têm papel decisivo na eliminação de microrganismos, mediada por fagocitose, que é a definição histórica da imunidade celular. As células T CD4⁺ ativam outros leucócitos, entre os principais: os neutrófilos, eosinófilos, além de linfócitos, como os linfócitos B, os quais são estimulados a produzir anticorpos (Figuras 29 e 30)[23,26,32,125].

As Figuras 29 e 30 fornecem uma ilustração relacionada às respostas mediadas por linfócitos T CD4⁺. Inicialmente, essas células são ativadas nos órgãos linfoides secundários, quando acontece apresentação de antígenos para linfócitos por APCs, expansão clonal, gerando células Ths efetoras e de memória. A maioria dessas células deixam os órgãos linfoides periféricos e migram para os sítios periféricos. Dentre as células Ths, uma subpopulação entre as mais bem definidas são as chamadas células T auxiliares foliculares (Tfh, do inglês, *T folicular helper*), que são encontradas na periferia dos órgãos linfóides secundários, como linfonodos, baço e placas de Peyer, nas regiões foliculares junto às células B. As células Tfh desencadeiam a formação e manutenção de centros germinativos nos órgãos linfoides periféricos através da expressão do ligante CD40 (CD40L) e da secreção de IL-21 e

IL-4 (Figura 23). Elas desempenham um papel crítico na imunidade protetora, ajudando as células B a produzir anticorpos contra patógenos estranhos[126].

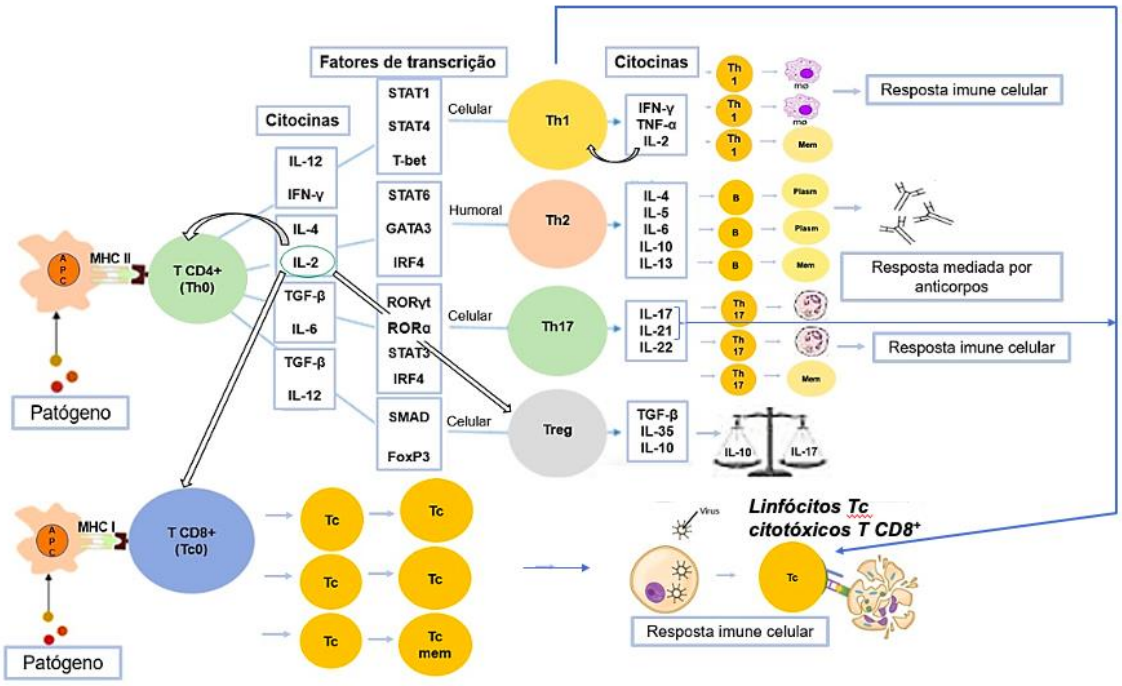
Figura 23 – Etapas das respostas imunes mediadas por células T CD4$^+$



Fonte: Adaptado de Abbas et al.[23]

A ingestão e eliminação de microrganismos pelos fagócitos é uma das principais reações da imunidade inata. Sabe-se que as células Ths intensificam significativamente esta atividade dos fagócitos, como ilustrado na Figura 23. As células Ths efetoras ativam fagócitos via moléculas de superfície, principalmente moléculas CD40-ligante (CD40L) que se ligam à proteína CD40 expressa pelas APCs neste momento, além de secretarem outras citocinas. A inflamação, que consiste no recrutamento e ativação de leucócitos, acompanha muitas reações de linfócitos TCD4$^+$[127].

Figura 24 - Diferenciação e atividade das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ (Ths) e T CD8⁺ citotóxicos (Tcs) efetores e de memória



Fonte: Adaptado de Park et al.[128]; Annunziato et al[129] e www.cusabio.com/c-20858.html e https://en.wikipedia.org/wiki/T_helper_cell

Clones de linfócitos virgens com diferentes especificidades estão presentes em indivíduos não imunizados e estes são capazes de reconhecer e responder aos antígenos estranhos. Antígenos exógenos associados com moléculas MHC classe II ativam células T CD4⁺ e levam à produção de citocinas que, por sua vez, podem ativar uma ampla gama de células, principalmente nos centros germinativos dos linfonodos [23,26,28,103,104,130,131].

Como mostrado na Figura 24, quando um antígeno é apresentado por APCs para células Th virgens (Th0), ocorre secreção de IL-2 que ativa Th0 e Tc0. Aqui existe um papel determinado pelo tipo de patógeno sendo apresentado, dos coestimuladores presentes/ativados e das citocinas geradas pelas células APCs e células T. A Figura 24 resume, entre suas primeiras colunas, a variedade de citocinas que podem ser secretadas neste momento, no geral de ação autócrina, que ativam vias de biossinalização e transdução de sinais e na próxima coluna são dados exemplos de fatores de transcrição que podem ser ativados neste momento para aquisição de fenótipos celulares efetores; principalmente células TCD8⁺ e Th1, Th2, Th17, Tfh e Tregs. A Figura 24 fornece um esquema sobre as citocinas secretadas por essas

células, os alvos celulares e as principais reações e funções imunes induzidas. As linhagens celulares derivadas de Th0 elicitam e regulam respostas imunes que podem ser proeminentemente celulares ou humorais (produção de anticorpos). A diferença entre essas células está nos marcadores de superfície, nas citocinas secretadas e no(s) fator(es) de transcrição ativado(s). Sabe-se que a diferenciação de uma célula Th0 em Th1 inclui um papel das citocinas IL-12 e IFN-γ (Figura 24). Uma vez diferenciadas, as células Th1 secretarão IL-2 (com papel autócrino), o IFN-γ e TNF (ação parácrina) ativam notavelmente macrófagos e DCs (ação parácrina) que produzirão respostas imunes celulares caracteristicamente contra patógenos intracelulares. Este tipo de resposta ativada de forma anormal já foi associada com autoimunidade e inflamação crônica[17,125,132].

A diferenciação de células Th0 em Th2 também envolve um papel da IL-2 de ação autócrina e IL-4. Uma vez diferenciada/ativada, as células Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 (Figuras 24), ocorre a ativação de linfócitos B, expansão clonal, diferenciação em plasmócitos que secretam diferentes classes de anticorpos com funções distintas na defesa contra patógenos[125,132]. Os linfócitos B funcionam também como células apresentadoras de antígeno, após interiorizarem e processarem o antígeno ligado ao receptor de antígeno da célula B (BCR). Os peptídeos gerados pelo processamento são expressos na membrana dos linfócitos B ligados a MHC II, para apresentação aos linfócitos T $CD4^+$. A interação do complexo peptídeo/MHCII com o receptor TCR inicia uma cadeia de eventos que levam os linfócitos Th à expansão clonal e produção de citocinas que estimulam a proliferação e diferenciação dos linfócitos B (Figura 26B)[30,125,132].

Hoje, sabe-se que tanto a diferenciação de Th0 em Th17, assim como em Tregs requer TGF- β. Ainda existe um papel da IL-6 na diferenciação das células Th17 e da IL-12 para as Treg. As células Th17 secretam uma família de citocinas IL-17 e IL-22 que recrutam principalmente neutrófilos produzindo respostas proeminentemente celulares contra certos tipos de bactérias e fungos extracelulares[23,90,133].

Estas citocinas também agem sobre epitélios, estimulando a produção local de quimiocinas que recrutam outros leucócitos, aumentam a produção de peptídeos antimicrobianos (defensinas) e regulam as funções das barreiras epiteliais[23,90]. Sabe-se ainda que as células Th17 secretam IL-21. As células Tregs produzem um número de citocinas inibidoras, o que inclui a IL-10. Parece também que as células Tregs

podem induzir outros tipos de células a expressar IL-10[133]. Falhas na regulação da atividade destas células são sabidamente envolvidas às doenças de autoimunidade e outras doenças inflamatórias crônicas[134–136].

É muito importante explicar que, conforme ilustrado na Figura 24, a resposta imune pode ser polarizada. Realmente, o sistema imune é constituído por elementos de ramificações ou “braços” diferentes. Todavia, ao avaliar a Figura 24, o leitor precisa ter noções claras que os elementos destas ramificações se comunicam (trocam sinais) a todo o momento. Dessa forma, é fato que elementos da resposta imune inata e adaptativa trocam sinais o tempo todo, assim como, as ramificações de células efetoras ativadas pelas citocinas das células T $CD4^+$ também produzem citocinas que medeiam a comunicação que dirige/regula ou influencia as respostas de outras ramificações.

No geral, a eliminação dos antígenos leva à contração da resposta das células T e este declínio é responsável pela homeostasia no sistema imune, no entanto, respostas imunes mediadas por células T resultam na geração de células T de memória específicas para aqueles antígenos, as quais podem persistir por anos ou mesmo por toda a vida. As células de memória são capazes de sobreviver em estado quiescente após a eliminação do antígeno e iniciar respostas maiores e mais rápidas no caso da reintrodução do antígeno, do que aquelas geradas pelas células virgens. As células de memória expressam níveis aumentados de proteínas antiapoptóticas, as quais são responsáveis por sua sobrevivência prolongada. Estas células podem migrar para o tecido periférico e responder a antígenos nesses locais, apresentam padrão de proliferação lenta e capacidade de autorenovação que pode contribuir para no longo tempo de vida. A manutenção das células T de memória é dependente e citocinas, notavelmente IL-7 e IL-15 e podem não requerer reconhecimento do antígeno[23,137].

1.1.2.12 Ontogenia dos linfócitos B

A diferenciação dos linfócitos B ocorre na medula óssea. O complexo receptor antigênico do linfócito B (BCR) é uma forma transmembrana de molécula tipo imunoglobulina (IgM monomérica) associada com duas cadeias de sinalização Igβ e Igα. O BCR é constituído por duas cadeias pesadas (μ) e duas cadeias leves (λ ou κ).

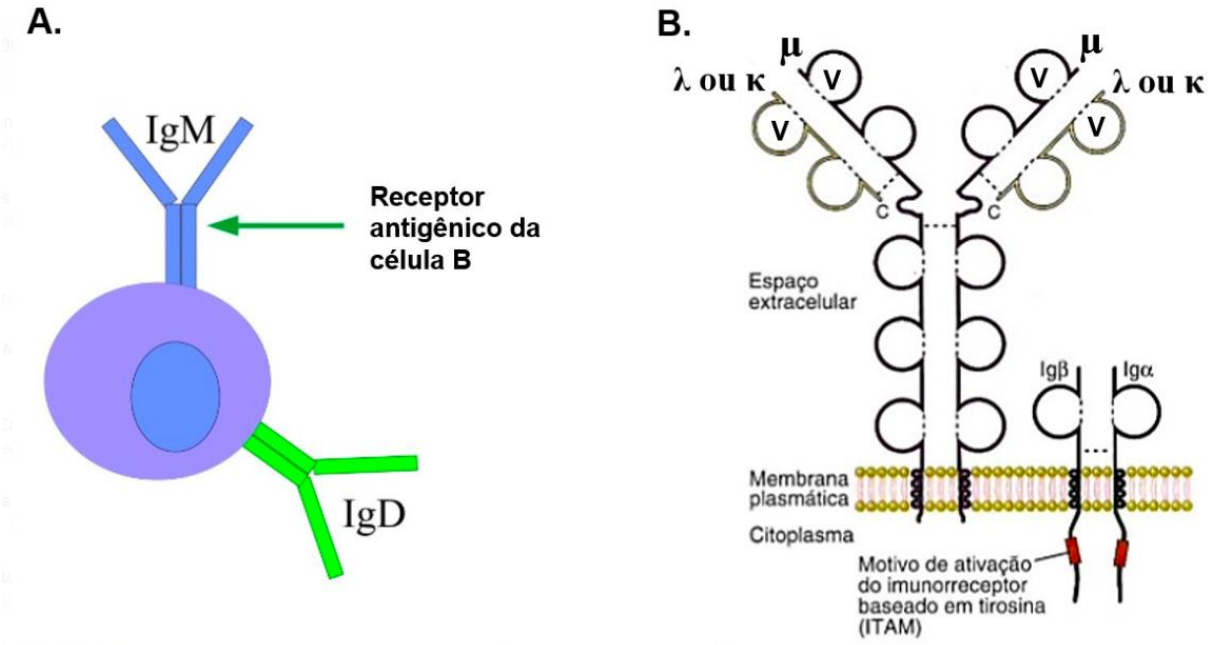
A especificidade de ligação ao antígeno é definida pela porção variável (V) da molécula, constituída pela união das regiões variáveis das cadeias leves e pesadas da imunoglobulina (Figura 25B)[23,30].

A primeira célula da medula óssea a se comprometer com a linguagem de células B é chamada de célula pró-B. A célula pró-B ainda não produzem Ig; é distinta de outras células imaturas pela expressão de moléculas de superfície restritas à linguagem B, tais como CD19 e CD10[23]. A maturação dos linfócitos B tem início a partir das células pró-B que expressam três genes, o gene da desoxinucleotidiltransferase terminal (TdT) e os genes indutores de recombinação 1 e 2 (RAG1 e RAG2, respectivamente) que comandam uma recombinação gênica necessária para a produção de imunoglobulinas. A montagem das cadeias pesadas (μ) inicia-se com a combinação aleatória de um segmento gênico D e um segmento gênico J, que a seguir se unem a um segmento V, definindo a alta especificidade de reconhecimento antigênico. As cadeias pesadas associam-se a cadeias invariáveis que são expressas na superfície dos linfócitos em maturação no estágio de célula pré-linfócito B, juntamente com as moléculas assessórias Igα e Igβ (Figura 25B). Em seguida, ocorre um rearranjo da cadeia leve k e, na falha desta, da cadeia λ. Cada linfócito B apresenta, portanto, um único tipo de cadeia leve associado à cadeia pesada. O sucesso na expressão de uma IgM completa na superfície do linfócito B leva à progressão da maturação com subsequente produção de IgD de membrana (Figura 25A)[23,26,30]. Sabe-se que o IgD na superfície das célula B tem papel na ativação de mastócitos e basófilos, imunoamplificação, proteção e homeostase em mucosas[138].

É importante ressaltar que todo rearranjo genético ocorre no início da maturação do linfócito B, no estágio pré-B, ainda na medula óssea e de modo totalmente independente de qualquer contato com antígeno[26,30]. O processo combinatório dos diferentes segmentos que compõem as porções variáveis das cadeias pesadas e leves e as diferentes possibilidades de associação entre elas resultam em cerca de 10^{11} especificidades diferentes de reconhecimento pelas imunoglobulinas[23]. A fim de restringir esse repertório, também para as células B existem pontos de checagem de seleção positiva e negativa que atuam durante a maturação dos mesmos para garantir homeostase e reatividade regulada, assim como acontece com os linfócitos T. Isso serve para gerar imunidade ou também tolerância

por parte dos linfócitos B, necessária para manter a não responsividade à autoantígenos timo-independentes, como polissacarídeos, lipídios e proteínas próprias do organismo. Da mesma forma que ocorre com os linfócitos T autorreativos, sabe-se que falhas nestes mecanismos da ontogenia dos linfócitos B podem estar diretamente relacionados à casuística de várias doenças autoimunes[23,110,139,140].

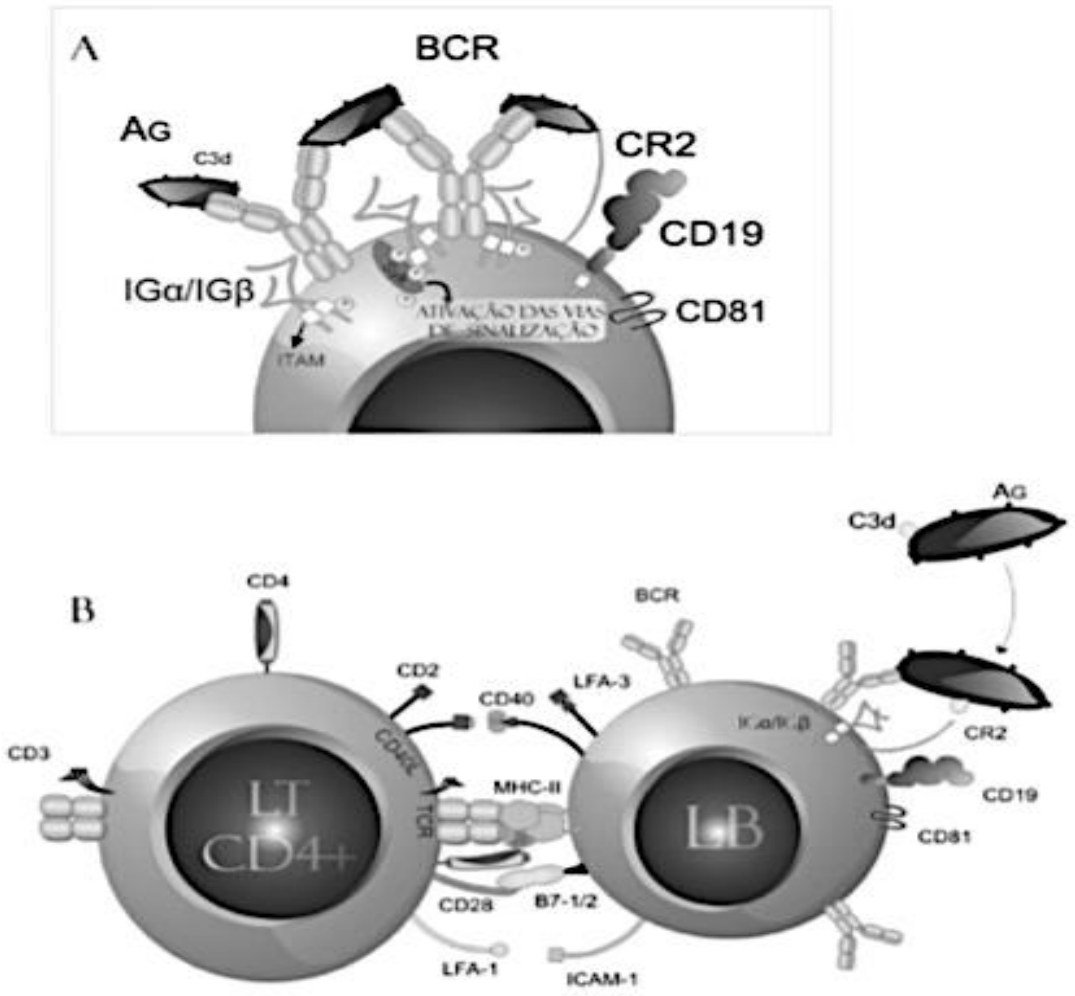
Figura 25 – Célula B madura (A) e o complexo receptor de antígeno da célula B (B)



Fonte: Adaptado de https://www.labpedia.net/immunoglobulin-m-igm/(A) e Abbas et al.[23]

Em nível de tolerância central, os linfócitos B imaturos que reconhecem autoantígenos na medula óssea com alta afinidade são sujeitos, alternativamente, à mudança de sua especificidade ou deletados. No ponto de checagem de seleção positiva, se as células B em desenvolvimento reconhecerem autoantígenos somente fracamente (o antígeno é solúvel e não induz muitas ligações cruzadas entre os receptores antigênicos do BCR, ou os BCRs reconhecem o antígeno com baixa afinidade); nesse caso, os linfócitos irão se tornar funcionalmente não responsivos (anérgicos) e sairão da medula óssea neste estado. A anergia decorre de uma regulação negativa da expressão do receptor antigênico, assim como de um bloqueio nos mecanismos de biossinalização. Já o processo de deleção ocorre se a edição do receptor ou seleção celular falharem; as células B imaturas serão induzidas a morrer por apoptose por mecanismos ainda não bem esclarecidos[23,110,139].

Figura 26 – Ativação do linfócito B Th independente (A) e Th dependente (B)



Fonte: Mesquita Junior et al[30]. *AG = antígeno.

O ponto de checagem que garante geração de tolerância periférica por parte das células B acontece quando linfócitos B maduros que reconhecem autoantígenos em tecidos periféricos na ausência de células Ths específicas acabam sendo considerados funcionalmente não responsivos ou morrem por apoptose. Isto pode acontecer porque os sinais das células Ths, no geral, são necessários para ativar os linfócitos B. Esses sinais podem estar ausentes devido à anergia das células Ths ou se as mesmas tiverem sido deletadas[23,110,141]. A tolerância periférica das células B também pode ser mediada por sinalização de receptores de inibição. As células B que reconhecem autoantígenos podem ser impedidas de responder por meio do acoplamento de vários receptores de inibição. A função desses receptores inibidores é definir um limiar para ativação da célula B e assim permitir respostas a antígenos

estranhos, porque estes tipicamente elicitam sinais fortes provenientes de combinações cruzadas com BCRs, correceptores, mais receptores da imunidade inata e células Ths. Isto não acontece nas respostas onde os autoantígenos acoplam apenas com o BCR. Anormalidades nestes mecanismos também podem gerar hipersensibilidade/autoimunidade[23,110,141].

A ativação da célula B inicia a partir de ligações cruzadas das imunoglobulinas na superfície do linfócito B, quando são desencadeados eventos bioquímicos que iniciam com a fosforilação dos ITAMS nas cadeias de Igα e Igβ com consequente ativação de enzimas e intermediários bioquímicos que culminarão na ativação de fatores de transcrição que promovem a ativação celular B. Interação do linfócito B com linfócito T auxiliar após processamento antigênico pelas células B. A produção de citocinas pelos linfócitos T auxiliares resultará na ativação da resposta imune humoral. Destaque para as moléculas de superfície envolvidas no processo de ativação (Figura 26). A resposta dos linfócitos B a antígenos peptídicos requer a ajuda dos linfócitos Th e esses antígenos são, por isso, denominados “antígenos T dependentes”. Muitos antígenos não proteicos, com epítopos repetitivos, não necessitam da cooperação dos linfócitos Th e são denominados “antígenos T independentes”[23,26,30,142].

No geral, a resposta humoral frente a antígenos requer o reconhecimento do antígeno pelos linfócitos Ths e sua cooperação com os linfócitos B antígeno-específicos, estimulando a expansão clonal dos linfócitos B, a mudança de classe da imunoglobulina, a maturação de afinidade e a diferenciação em linfócitos B de memória. Os linfócitos Ths expressam na sua superfície moléculas CD40L, que interagem com seu ligante, CD40, presente na superfície de linfócitos B, e expressam também CD28 que se liga às moléculas B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), cuja expressão na membrana dos linfócitos B ativados é significantemente aumentada. Esses dois pares de moléculas, CD40/CD40-L e CD28/B7, permitem a transmissão dos sinais de estímulo e induzem a produção de enorme variedade de citocinas que contribuem para no desenvolvimento de anticorpos. Como explicado anteriormente, uma sinalização mais fraca neste ponto, ou a inibição de B7 e/ou CD28 é um mecanismo utilizado para regular respostas imunes indesejadas e falhas neste mecanismo inibitório já foram associadas com o desenvolvimento de hipersensibilidade/autoimunidade[23,26,30,120,142].

Antígenos T independentes podem estimular a produção de anticorpos na ausência total ou relativa de Ths. Esses antígenos são usualmente moléculas não proteicas, poliméricas, que estimulam a produção de Ig de baixa afinidade pertencentes, na sua maioria, à classe IgM. Como, geralmente, não há ativação de Ths, não serão geradas as citocinas necessárias para a mudança de classe, maturação de afinidade ou formação de linfócitos B de memória (processos detalhados mais adiante). Raramente na resposta a antígenos T independentes ocorre mudança para outros isotipos de linfócitos B e imunoglobulinas[23,26,30,142].

Um exemplo da importância da resposta a antígenos Ths independentes é a imunidade humoral frente a polissacarídeos bacterianos, um mecanismo decisivo na defesa do hospedeiro contra infecções por bactérias encapsuladas. Por essa razão, indivíduos com deficiências congênitas ou adquiridas que prejudiquem a resposta humoral são especialmente suscetíveis a infecções, muitas vezes fatais, por bactérias encapsuladas. Outro exemplo de resposta aos antígenos Ths independentes são os anticorpos naturais, presentes na circulação de indivíduos normais e produzidos aparentemente sem exposição antigênica. Muitos destes anticorpos naturais reconhecem carboidratos com baixa afinidade e acredita-se que sejam produzidos por linfócitos B peritoneais, isto é, células B1, estimuladas por bactérias que colonizam o trato gastrointestinal, e por linfócitos B da zona marginal dos órgãos linfoides. Anticorpos contra antígenos glicolipídicos A e B do grupo sanguíneo são outro exemplo de anticorpos naturais[23,26,30,142].

Uma etapa de diferenciação dos linfócitos B caracteriza-se por alterações significativas na morfologia dos mesmos e também pela troca da porção constante da cadeia pesada de IgM ou IgD para IgG, IgA ou IgE, processo conhecido como mudança de classe. Esta etapa envolve eventos moleculares complexos como rearranjo ao nível do DNA genômico e *splicing* (edição) alternativa em nível do RNA mensageiro. Neste processo as porções variáveis das cadeias pesadas e leves permanecem as mesmas e consequentemente a especificidade antigênica do anticorpo não é alterada, mas a resposta imune torna-se mais diversificada e eficaz, uma vez que as diferentes classes de Ig apresentam diferentes características funcionais[23,26,30,142].

1.1.2.13 Respostas imunes de defesa (imunidade) e desenvolvimento de tolerância imunológica que garantem homeostase

O sistema imune estrutura-se e funciona de maneira tal que pode elicitar respostas de defesa contra patógenos, podendo eventualmente levar a um estado de imunidade. Por outro lado, ele pode também elicitar respostas associadas com um estado de tolerância imunológica, seja ela frente a antígenos exógenos ou padrões moleculares próprios do organismo (autoantígenos) (capacidade de reconhecer o próprio do não próprio)[23–25].

A tolerância imunológica é definida como a não responsividade a um antígeno (anergia), que atualmente se sabe que é induzida por um processo ativo que requer exposição prévia a este mesmo padrão molecular considerado estranho, mas não patogênico. A expressão tolerância imunológica surgiu com base em observações experimentais de que animais que já haviam entrado em contato com um antígeno em condições particulares (como por exemplo: ausência de inflamação, ausência de coestimuladores inflamatórios, ausência de expressão de determinadas citocinas, ou papel de citocinas expressas com funções regulatórias, ausência de infecção, entre outros), não respondiam, ou seja, acabavam tolerando o referido padrão molecular em exposições subsequentes[110,143–145].

Atualmente, sabe-se que em circunstâncias particulares, quando os linfócitos específicos são ativados pelas APCs, estes linfócitos podem ser eliminados ou inativados, para garantir homeostase, e destaca a importância dos mecanismos de tolerância imunológica. Inclusive foi provado que o mesmo antígeno, pode induzir resposta imune ou tolerância e que as condições determinantes para isso, tem a ver com as ditas circunstâncias particulares, ou seja, os outros estímulos concomitantes, tais como expressão e função de coestimuladores (correceptores e citocinas), expressão de proteínas inibidoras, entre outras[120,124,145,146]. A tolerância imunológica é adquirida por vias semelhantes da imunidade adquirida (ou adaptativa), mas é determinada por uma série de fatores que incluem: baixa avidez aos receptores TCR ou BCR, ausência de resposta por Ths, ausência de coestimuladores/citocinas pró-inflamatórias (inflamação), expressão de receptores inibidores, citocinas anti-inflamatórias, inibição da expressão de coestimuladores pró-inflamatórios, entre outros. Os antígenos que induzem tolerância são chamados de tolerógenos, ou antígenos tolerogênicos, para distingui-los dos imunógenos que elicitam respostas de defesa e eventualmente levam à imunidade[105,147,148].

Por princípio, o termo antígeno sempre foi usado para se referir a uma variedade molecular, microbiana ou não microbiana, estranha e capaz de elicitar respostas imunes de defesa. Atualmente, a moderna tecnologia de última geração de sequenciamento de ácidos nucleicos e proteínas levou a expandir o conceito de antígeno. O termo imunógeno tem sido usado para se referir a qualquer padrão molecular que pode ligar-se especificamente a um componente como RRPs, anticorpos, receptores de linfócitos, proteínas do sistema complemento, entre outros; e elicitar respostas de defesa por parte do sistema imune, que são intensificadas pelo papel de vários correceptores e citocinas pró-inflamatórias (junto com evidentes sintomas e sinais de uma resposta inflamatória). Muitas vezes, as moléculas imunógenas são constituintes de patógenos exógenos, mas cabe destacar também o conceito de alérgeno que tem sido utilizado para se referir a padrões moleculares, geralmente exógenos e inofensivos para a maioria das pessoas, mas que para um determinado indivíduo, devido a características de um genoma único, é reconhecido como estranho pelo sistema imune, que responde com respostas indesejadas (de hipersensibilidade ou atopia, com produção de IgE, ativação de mastócitos, liberação de histamina, entre tantos outros autacoides. Estes indivíduos são hipersensíveis (alérgicos). O termo tolerógeno tem sido utilizado para se referir a antígenos que induzem tolerância, ou antígenos tolerogênicos, para distingui-los dos imunógenos, que elicitam respostas de defesa/imunidade[23,149].

Foram sugeridos também os conceitos de autoantígenos e superantígenos. Autoantígenos são moléculas próprias do hospedeiro. Às vezes, os autoantígenos sofreram alguma mutação ou erro na expressão gênica e, nestes casos, podem elicitar respostas de autoimunidade. Superantígenos referem-se à uma classe de antígenos que causam ativação inespecífica das células T, resultando em ativação policlonal de células T e liberação maciça de citocinas. Em áreas mais específicas foram definidos ainda, conceitos como neoantígenos[23,26,28,150]. No passado, o termo antígeno tumoral era usado para abranger muitas moléculas diferentes expressas por células tumorais, quer estimulassem ou não respostas imunes de defesa. Atualmente, o termo neoantígeno é utilizado para se referir a uma variedade de moléculas produzidas por células tumorais que elicitam respostas imunes que ainda não são completamente compreendidas, sendo foco de intensa pesquisa[23,150].

1.1.2.14 Resposta imunes anormais: hipersensibilidade

Houve um tempo em que se acreditava que a não responsividade por parte do sistema imune às moléculas estranhas comuns do meio ambiente fosse determinada de uma forma passiva, a partir de informações genéticas herdadas. Acreditava-se que através dos milhares de anos de evolução, o genoma humano teria absorvido uma capacidade de diferenciar os elementos inócuos dos perigosos presentes no meio ambiente. Os estudos de imunologia moderna demonstraram que a tolerância imunológica é definida como a não responsividade a um antígeno induzida pela exposição prévia a esse mesmo antígeno; isto é, através de um processo ativo, assim como é induzida a imunidade, porém em sítios e circunstâncias especiais. As respostas de defesa que visam à imunidade, desenvolve-se quando antígenos são apresentados por células APCs juntamente processos inflamatórios nos quais ocorre secreção das citocinas pró-inflamatórias ou aumento dos níveis normais das mesmas, ou na presença de coestimuladores que em circunstâncias normais não estariam presentes; no caso de mutações em proteínas ou enzimas que atuam nas cascatas de transdução de sinal intracelulares; as vias induzidas pelas referidas citocinas podem assumir papeis importantes em processos patogênicos[105,151].

Estudos em modelos experimentais comprovaram a existência de células com capacidade reguladora (Bregs) entre as subpopulações de linfócitos B que, em um ambiente cronicamente inflamado, se diferenciam em um fenótipo com alta expressão de CD1d, com capacidade de produção de IL-10 e habilidade para suprimir a resposta inflamatória. Os Bregs dependem de interação antigênica e estimulação via molécula CD40L e B7, mas, uma vez ativadas, produzem IL-10 e TGF-β suprimindo a ativação e diferenciação de linfócitos T $CD4^+$, linfócitos T $CD8^+$ e células *NKs*, inibem a ativação de DCs e estimulam a diferenciação de Tregs. Mediante contato dos Bregs com linfócitos T virgens há inibição da ativação do linfócito T e da diferenciação em Th1. O estudo dos Bregs em modelos animais deixa claro o papel regulador dessas células em diferentes enfermidades. A comprovação da existência dessas células no homem tem sido de grande relevância para a compreensão das doenças autoimunes. Mais do que entender a diversidade de efeitos das citocinas anti-inflamatórias que asseguram as funções dos Bregs, os estudos reforçam as evidências da produção de autoanticorpos de modo fisiológico com finalidade protetora[30,152–154].

Os distúrbios causados por respostas imunes anormais são coletivamente chamados doenças de hipersensibilidade. Este termo surgiu da definição clínica de imunidade, como sendo uma sensibilidade, observada em um indivíduo exposto a um antígeno que exibe uma reação detectável (ou torna-se sensível) a encontros subsequentes com este antígeno. Normalmente, as respostas imunes erradicam os patógenos infecciosos sem provocar lesões graves aos tecidos do hospedeiro. No entanto, essas respostas algumas vezes não são controladas de maneira adequada e tornam-se inapropriadamente direcionadas aos tecidos do hospedeiro ou desencadeadas por microrganismos comensais, ou antígenos ambientais inofensivos, ou até mesmo macromoléculas próprias do hospedeiro. Nessas situações, a resposta imune, torna-se causa de doença. Convencionalmente, essas doenças foram classificadas em quatro tipos de doenças de hipersensibilidade (I, II, III e IV) referindo-se a quatro mecanismos patológicos principais[23]. Em algumas doenças mais que um desses mecanismos pode ser observado e é fato que na clínica o termo hipersensibilidade geralmente é utilizado para doenças alérgicas ou atópicas e o termo autoimunidade é utilizado para reações contra moléculas próprias do hospedeiro[155].

A hipersensibilidade do tipo I é causada por anticorpos IgE, sendo o tipo mais prevalente de hipersensibilidade e conhecida popularmente por alergia. Esta doença é resultante da ativação de células Ths produtoras de IL- 4, IL-5 e IL-13, sendo geralmente células Th2 que estimulam a produção de anticorpos IgE, ativação de mastócitos e inflamação. A hipersensibilidade do tipo II é causada pela ativação do sistema complemento pelos anticorpos IgG e IgM citotóxicos. A hipersensibilidade do tipo III é mediada por imunocomplexos e a hipersensibilidade causada pela células Ths $CD4^+$, as quais secretam citocinas que promovem a inflamação e ativam os leucócitos, especialmente neutrófilos e macrófagos, são denominadas hipersensibilidade do tipo IV, sendo este tipo de hipersensibilidade mais relevante para este estudo, pois agrupa os principais tipos de respostas observadas na autoimunidade[23,40,155].

1.1.2.15 Autoimunidade

A possibilidade de o sistema imune de um indivíduo reagir contra moléculas próprias (autólogas) e causar dano tecidual começou a ser avaliada por imunologistas na mesma época em que a especificidade do sistema imune para antígenos estranhos foi reconhecida. No início do século XX (década de 1900), Paul Ehrlich cunhou uma expressão dramática “horror autotóxico”, para descrever o temor da autodestruição do organismo por seu próprio sistema imunológico[23].

As autoimunidade afeta pelo menos 2 a 5% da população nos países desenvolvidos, aparecendo principalmente entre os 20 a 40 anos de idade dos indivíduos. São mais comuns em mulheres do que em homens e consideradas debilitantes[36]. O termo autoimunidade é com frequência usado erroneamente para qualquer doença em que reações imunes são acompanhadas de dano tecidual, embora seja difícil ou até impossível estabelecer um papel para as respostas imunes contra autoantígenos particulares como causa destes distúrbios. A maioria é causada pela interação de linfócitos autorreativos com autoantígenos, o que leva à liberação de citocinas e marcadamente a inflamação, um componente presente em praticamente todos os casos e por isso considera-se mais adequado agrupar estas doenças como doenças inflamatórias imunomediadas. Entre os principais exemplos estão: artrite reumatoide, a esclerose múltipla, enteropatia inflamatória (doença de Crohn) diabetes melito do tipo 1, lúpus eritematoso sistêmico, anemia hemolítica autoimune, psoríase, entre outros[155].

As questões mais importantes a respeito da autoimunidade são: a) como os mecanismos de autotolerância falham? e b) como os linfócitos autorreativos são ativados? A resposta para ambas as perguntas ainda não são bem esclarecidas e atualmente são foco de intensa pesquisa científica, no sentido de compreender a patogênese das doenças autoimunes, o que é considerado um dos principais desafios da imunologia na atualidade[23,155].

Já é consenso que os fatores que contribuem para o desenvolvimento da autoimunidade são suscetibilidade genética e desencadeadores ambientais, como infeções e lesões locais. Genes de suscetibilidade podem interferir sobre os mecanismos de autotolerância, enquanto a infecção ou a necrose nos tecidos pode

ativar linfócitos autorreativos; o influxo dessas células no local da lesão pode resultar em dano tecidual[23,156,157].

Já é sabido, que como características gerais, as doenças autoimunes tendem a ser crônicas, progressivas e de autoperpetuação, pois os autoantígenos após seu surgimento são persistentes e a resposta imunológica iniciada é amplificada. As lesões podem liberar outros antígenos teciduais que na ausência de lesão não estariam presentes; um fenômeno conhecido como propagação de epítopo. As doenças autoimunes podem ser sistêmicas, como por exemplo a psoríase, cuja a natureza sistêmica é evidenciada pelo aumento dos níveis séricos de múltiplas citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF, IFN γ, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17A e IL-18, em pacientes com psoríase em comparação com controles saudáveis[158]. Ao contrário, respostas de autoanticorpos ou de células T contra autoantígenos com distribuição tecidual restrita levam a doenças autoimunes órgão-especificas, como no diabetes tipo I[159] ou na esclerose múltipla[23,160], entre outros.

Várias anormalidades imunológicas podem levar a autoimunidade. Neste sentido, alguns mecanismos que levam a autotolerância defeituosa foram detalhados nas seções da ontogenia dos linfócitos T e B, são eles a) defeitos da deleção (seleção negativa) de células T ou B durante a maturação dessas células nos órgãos linfoides geradores; b) apoptose defeituosa de linfócitos autorreativos maduros; c) defeitos na geração de linfócitos Tregs; d) função inadequada de receptores de inibição[124], entre outros[26,77,78,123,124,134–136].

Outra questão que tem sido muito debatida entre os imunologistas está relacionada com bases genéticas da autoimunidade. Já a partir dos primeiros estudos sobre doenças autoimunes em pacientes, foi observado que estas doenças têm um forte componente genético, por exemplo, no diabetes tipo I há uma concordância de 35 a 50% em gêmeos monozigóticos. Logo, esta concordância é incompleta, o que tem levado os pesquisadores a incluir fatore ambientais com a patogênese da doença[159]. Outras doenças autoimunes mostram evidências similares de uma contribuição genéticas. Análises de histórico familiar, estudos de associação genômica revelaram mais informações sobre genes que podem apresentar papel causal no desenvolvimento de autoimunidade. Esses estudos têm levado muitos pesquisadores a investigar aspectos gerais de genes relacionados à uma susceptibilidade genética no desenvolvimento dessas doenças[155].

A maioria das doenças autoimunes é decorrente de traços poligênicos complexos nos quais os indivíduos afetados herdam polimorfismos genéticos múltiplos que podem contribuir à susceptibilidade à doença. Cada um desses fatores isolados, em princípio, não são suficientes à patogênese, mas quando genes agem em conjunto com fatores ambientais doenças podem ser causadas[13,155,161]. As descobertas mais contundentes têm apontado para loci de genes que codificam para moléculas MHC, ou seja, loci do sistema antígeno leucocitário humano que se localiza no cromossomo 6 dos humanos[155,162,163].

Por outro lado, os estudos de associação genômica também têm levado à identificação de polimorfismos de nucleotídeos variantes em genes que não pertence ao sistema HLA e que provavelmente estão associados à autoimunidade. Entre os principais exemplos podem ser citados: Polimorfismos no gene de receptor NOD2 com uma susceptibilidade à enteropatia inflamatória (doenças de Crohn)[164]. Deficiências genéticas em proteínas do sistema complemento já fora associadas a doenças autoimunes como o lúpus eritematoso[165]. Alguns polimorfismos no receptor de IL-23 já foram associados à susceptibilidade aumenta para a enteropatia inflamatória e para a psoríase. A IL-23 é uma das citocinas envolvidas no desenvolvimento de células Ths patológicas, que estimulam reações inflamatórias[166].

Atualmente, a patogênese da autoimunidade já foi associada com vários outros fatores, além da suscetibilidade genética. O dimorfismo sexual tem sido avaliado junto a prevalência de doenças autoimunes (em relação ao sexo). A prevalência de doenças autoimunes variou significativamente entre diferentes países estudados, mas as tendências principais permaneceram as mesmas. Muitas doenças autoimunes têm uma incidência maior nas mulheres do que nos homens, mas existem exceções. Este tema depende de mais estudos. Em mulheres, a incidência de doenças autoimunes antes da menarca é menor. Após este período, já foram determinadas prevalências em proporções de 3:1 e até 9:1 (mulher:homem) no caso da esclerose múltipla e lúpus eritematoso, respectivamente. Os estudos especulam/argumentam sobre diferenças entre o sistema imune da mulher e do homem e influências hormonais que possam desempenhar algum papel sobre a autoimunidade. Os pesquisadores afirmam que atualmente não é possível afirmar com certeza, se a predominância em fêmeas resulta da influência de hormônios sexuais ou outros fatores relacionados ao gênero. Em

alguns países a espondilite anquilosante e a síndrome Guillain-Barré foram mais a prevalência em homens nos EUA[167].

Em 1940, Peter Medawar foi o primeiro cientista a sugerir o termo imunoprivilégio para descrever a ausência de respostas imunes em tecidos transplantados no cérebro, na câmara interior do olho, testículos, placenta e feto. De forma particular, antígenos estranhos que causariam resposta imune na maioria dos tecidos com frequência são tolerados nos sítios mencionados, que são considerados imunoprivilegiados. Especula-se que isto ocorra porque respostas imunes e inflamações nestas partes do corpo trariam alto risco de disfunção orgânica letal ou falência reprodutiva[23]. Pesquisas sobre autoimunidade já revelaram que certas doenças autoimunes são causadas quando estes órgãos sofrem trauma, ou lesão isquêmica, ou alterações anatômicas, que podem ser causadas por inflamações, muitas vezes secundárias a infecções. Nestes casos, os autoantígenos previamente ocultos nos tecidos privilegiados podem ser liberados em interagir com linfócitos causando respostas imunes especificas de autoimunidade[168,169].

Em alguns pacientes, o surgimento de doenças autoimunes é precedido por infecções. Na maioria dos casos, quando a autoimunidade se desenvolve os microrganismos nem podem ser mais detectados. Sugere-se que antígenos destes microrganismos podem reagir de maneira cruzada com autoantígenos, de modo que respostas imunes a estes complexos (feitos de antígenos de microrganismos mais autoantígenos) podem resultar em reações de autoimunidade. Esse fenômeno é conhecido como mimetismo molecular. Exemplos desse fenômeno podem ser ligados à casuística da febre reumática que se desenvolve após infecções estreptocócicas e é causada por anticorpos que têm reatividade cruzada com proteínas do miocárdio. Também já foi percebido que certas infecções sistêmicas virais podem causar falha da tolerância e destruição autoimune das células produtoras de insulina[23,170,171].

Por último, sabe-se que o microbioma intestinal e cutâneo podem influenciar como o sistema imune se estrutura nestes epitélios e também influenciar no desenvolvimento de doenças autoimunes. Este tema será mais bem explicado na seção mais adiante: estruturação do sistema imune no epitélio cutâneo.

1.1.2.15.1 Linfócito Th17, T reguladores, interleucina 17 e autoimunidade

O final do século XX introduziu algumas mudanças na classificação das células Ths. A identificação de uma nova subpopulação de células Ths secretoras de IL-17 mudaram o paradigma Th1-Th2 das respostas imunes. Esta subpopulação de Ths foi denominada Th17. Vários estudos mostraram altas habilidades destas células para estimular a inflamação aguda e crônica relacionadas ao desenvolvimento de doenças autoimunes. Numerosas publicações baseadas em modelos animais e humanos confirmaram seu papel central na patogênese de doenças autoimunes humanas sistêmicas e específicas de órgãos. Essas descobertas tornaram as células Th17 e as vias que regulam seu desenvolvimento e função um bom alvo para a terapia de doenças autoimunes. As terapias baseadas na inibição das vias dependentes de Th17 têm sido associadas a benefícios clínicos, mas, como ocorre sempre, essas modalidades terapêuticas não são isentas de efeitos colaterais[172].

Existem seis isoformas conhecidas de IL-17, de A á F, mas as células Th17 são capazes de produzir apenas IL-17A e IL-17F. Ambos são citocinas pró-inflamatórias. Alguns pesquisadores mostraram recentemente que IL-17A e/ou IL-17F são responsáveis pelo desenvolvimento de inflamação em muitos distúrbios, especialmente em doenças autoimunes como artrite reumatóide, psoríase, doença de Crohn e muitos outros[172–175]. As células Th17 também produzem IL-21 e IL-22. Ambos são citocinas pró-inflamatórias; A IL-21 ajuda a restaurar o equilíbrio entre as células Th17 e Treg e a IL-22 esta ligada à inflamação crônica e participa da patogênese de muitas doenças autoimunes[172].

As células Th17, como outras células Ths, precisam de citocinas e fatores de transcrição específicos para ativação e proliferação. Moléculas específicas que regulam as funções e propriedades das células Th17 se tornaram mais interessantes, após a descoberta de que as células Th17 participam da patogênese de muitas doenças. Desde então, os pesquisadores têm tentado encontrar a origem e a função das células Th17 e têm tentado usá-las como alvos terapêuticos. Hoje são conhecidas duas formas de ativação das células Th17 e alguns fatores que promovem a inibição de sua diferenciação. As células Th17 podem ser estimuladas por IL-6 e TGF-β[176] ou via IL-23. Os principais inibidores das células Th17 são as citocinas IFN e IL-4[177]. Noack e Miossec[178] descreveram também conexões entre células Th17 com Tregs.

Possivelmente, a interação entre as populações Th17 e Tregs está provavelmente entre os principais focos de atenção nos estudos da patogenia de doenças autoimunes atualmente, porque foi descoberto que um desequilíbrio crítico em favor das células Th17 aumenta significativamente a possibilidade e gravidade da doença[172].

Estudos têm sugerido que células Th17 e células Tregs, que compartilham uma célula precursora comum (a célula T CD4 naive), requerem um fator comum, o TGFβ, como sinal para diferenciação inicial. No entanto, as células terminalmente diferenciadas desempenham funções opostas: as células Th17 causam autoimunidade e inflamação, enquanto as células Tregs inibem esses fenômenos e mantêm a homeostase imunológica. Assim, desvendar os mecanismos que afetam o equilíbrio das células Th17/Treg é fundamental se quisermos entender melhor a autoimunidade e a tolerância. Estudos recentes identificaram muitos fatores que influenciam esse equilíbrio; esses fatores variam nas vias de sinalização desencadeadas por receptores de células T, receptores coestimuladores e citocinas, a várias vias metabólicas e a microbiota epitelial[179,180].

Em relação ao desequilíbrio Th17/Tregs relacionado às doenças autoimunes, sabe-se que as células Th17 e células Treg compartilham uma via de sinalização comum mediada por TGF-β. No entanto, sinais pró-inflamatórios presentes durante a ativação celular regulam o destino dessas células reciprocamente. Por exemplo, na presença de IL-6 ou IL-21 (juntamente com TGF-β), as células $TCD4^+$ virgens diferenciam-se em células Th17; entretanto, na ausência de citocinas pró-inflamatórias, o TGF-β conduz a diferenciação em células Tregs. As células Th17 produzem IL-17, IL-22 e IL-23, recrutam neutrófilos e promovem inflamação no local da infecção. Em contraste, as células Tregs produzem citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF-β, suprimem a atividade de uma variedade de células imunes e, assim, inibem as respostas imunes. Assim, esses dois tipos de células desempenham papéis opostos durante as respostas inflamatórias e imunológicas. As células Th17 desempenham um papel importante nas doenças autoimunes, como psoríase, doença inflamatória intestinal, artrite reumatóide e esclerose múltipla. STAT3 é ativado após estimulação por sinais TCR e coestimuladores, juntamente com TGF-β e IL-6; STAT3 então induz a expressão do fator RORγt, que deriva células para o subconjunto Th17[179].

Em contraste, as células Tregs inibem as respostas auto-imunes. As células Tregs surgem durante o desenvolvimento no timo ou na periferia, via ativação de células TCD4 virgens. As células Tregs derivadas do timo são chamadas de células tTregs, enquanto as células Tregs derivadas da periferia são chamadas de células pTregs. As células tTregs (como explicado) são geradas recebendo estimulação de TCR relativamente forte por complexos autoantígeno-MHC em APCs tímicas, o que leva à expressão de Foxp3. Por outro lado, as células pTreg são geradas a partir de células T CD4 naive recebendo estimulação de antígeno sob a influência de TGF-β e IL-2 na periferia. As células pTregs são prevalentes em certos órgãos, como o intestino, a placenta materna e a pele. Assim, as células pTregs são consideradas como efetoras de um papel importante na manutenção da tolerância contra alimentos, bactérias comensais e o feto durante a gravidez. A estimulação de células $TCD4^+$ virgens com TGF-β ativa o fator de transcrição Foxp3; isso leva as células em direção à linhagem pTregs. Além disso, a IL-2 induz STAT5, que ativa o Foxp3[179].

As células Th17 causam, enquanto as células Tregs inibem, a autoimunidade. Assim, a geração recíproca de células Th17 e Treg são extremamente importantes. Muitos fatores que influenciam a geração e manutenção dessas células e eles também são importantes para a regulação adequada do equilíbrio Th17/Treg; estes incluem sinais de TCR, sinais coestimulatórios, sinais de citocinas, estabilidade Foxp3, processos metabólicos e a microbiota. No entanto, sabe-se as citocinas são o determinante mais poderoso do destino das células T CD4[181].

O que chama a atenção e como já explicado é que o estágio inicial de diferenciação das células $TCD4^+$ virgens é que em princípio, o TGF-β induz a diferenciação de células Th17 e Tregs. Contudo, a presença de IL-6 é um determinante crítico das decisões subsequentes do destino da célula. IL-6 conduz a diferenciação de células Th17 por fosforilação e ativação de STAT3, que então induz genes específicos de Th17. STAT3 também inibe a diferenciação de células Tregs por regulação negativa da expressão de Foxp3 induzida por TGF-β. Desta forma, a geração de células Th17 inibe a geração de células Tregs. O efeito da IL-6 é reforçado por outras citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1β, IL-21, IL-23 e TNF[182]. Embora a combinação de IL-6 mais TGF-β é um fator crítico estimulante da diferenciação de células Th17, não é suficiente para a aquisição completa de propriedades patogênicas pelas células Th17, uma vez que TGF-β mais IL-6 também induzem IL-10. Sabe-se

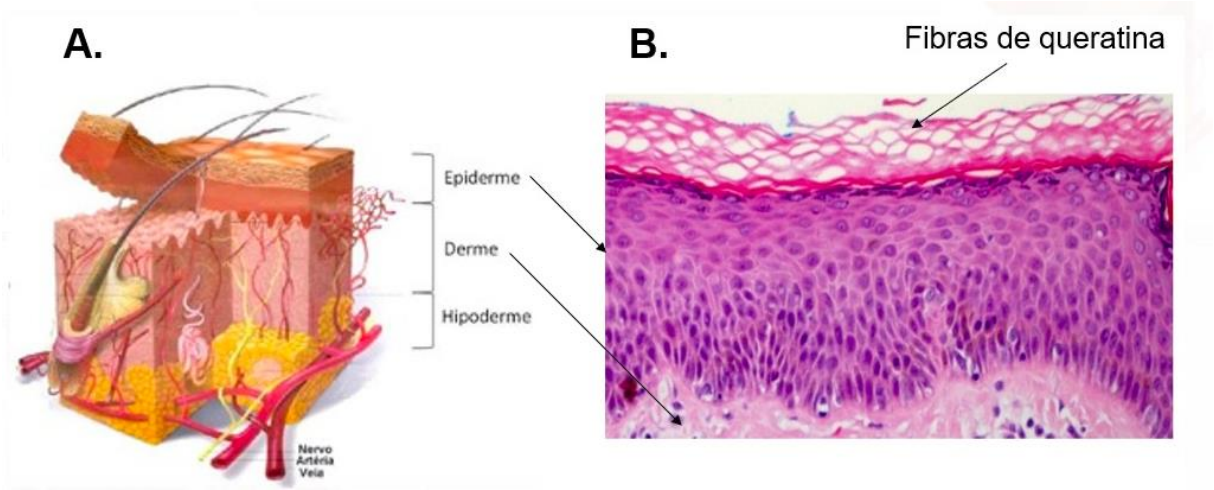
que a patogenicidade das células Th17 requer um sinal de IL-23 junto com IL-6 mais TGF- β para induzir a expressão do receptor de IL-23[179].

Para finalizar esta seção cabe adiantar que um papel da microbiota existente sobre os epitélios do intestino e da pele também tem influência no desbalanço Th17/Tregs. Este tema será mais bem desenvolvido e apresentado mais adiante na seção 1.1.3.1 que irá abordar a estruturação do sistema imune em epitélios, enfatizando o tecido cutâneo.

1.1.3 O tecido cutâneo: a pele

Alguns autores sugerem que a pele seja o maior órgão do corpo humano[20,183–185]. Outros autores sugerem que ela seja o segundo maior órgão do corpo humano, sendo ultrapassada apenas pelo sistema vascular[186]. Pode representar até 15% do peso corporal total do adulto[183]. É composta por camadas, sendo elas a epiderme (epitélio escamoso estratificado queratinizado), a derme (constituída de tecido conjuntivo e outras células) e na subjacência dessas camadas, unindo-a aos órgãos, há a hipoderme (tecido conjuntivo frouxo e adiposo). Esta última, por muitos autores, não é considerada como parte integrante da pele, embora seja estudada dentro do sistema tegumentar[183,184,186–188].

Figura 27 - Camadas da pele



Fonte: https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Camadas-principais-da-pele-epiderme-derme-e-hipoderme_fig1_273177237 (A) e http://dermatopatologia.com/histologia/ (B)

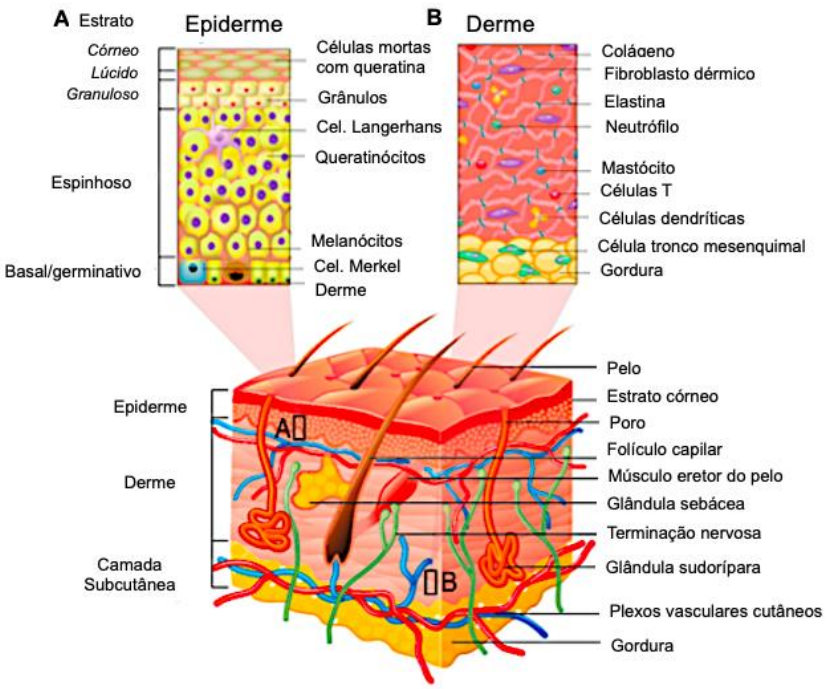
A pele desempenha muitas funções vitais. Possivelmente, entre as principais funções é que a pele representa uma barreira impermeável rica em lipídios e queratina[23]. A pele atua com o sistema imune formando uma das uma das principais barreiras para a proteção contra desafios microbianos (invasão), químicos e físicos prejudiciais encontrados no meio ambiente[189–191]. A pele tem ainda outras funções, como por exemplo, sentir o tato, a dor e tem papel na termorregulação. A pele serve para prevenir a perda excessiva de água do corpo e é responsável pela produção de pré-hormônio (vitamina D)[20,183–185,190,192].

A Figura 27A ilustra as camadas da pele e alguns dos seus anexos, ao passo que Figura 27B corresponde a um corte longitudinal de pele humana corado com eosina e hematoxilina (magnificação 400x), na qual é possível observar principalmente o epitélio estratificado da epiderme sobre o qual existe uma camada de fibras de queratina e parte da derme.

1.1.3.1. A epiderme

A epiderme tem origem ectodérmica e é constituída por camadas de células epiteliais, melanócitos e célula sentinelas do sistema imune (DCs, linfócito T, entre outros) e células de Merkel. A maioria das células da epiderme são células epiteliais chamadas de queratinócitos que estão sobre uma membrana basal localizada no limite entre a epiderme e a derme. A membrana basal é uma estrutura de matriz extracelular altamente especializada, que separa fisicamente os dois compartimentos, tendo um papel estabilizador (de sustentação), embora represente uma interface dinâmica na forma de uma barreira que permite difusão de elementos entre derme e epiderme[186183].

Figura 28 – Constituintes da pele



Fonte: Adaptado de Gaur et al.[193]

A epiderme é formada por camadas (estratos). A epiderme é a camada mais externa da pele, é avascular e têm espessura relativamente uniforme em todo o corpo, exceto na palma das mãos e sola dos pés. A Figura 28A ilustra a epiderme, suas cinco principais camadas de acordo com a morfologia e posição das células. A camada mais interna da epiderme é o estrato basal ou germinativo, seguido pelo estrato escamoso ou espinhoso, estrato granuloso, estrato lúcido e por último e mais externo, o estrato córneo[183,184,186,193].

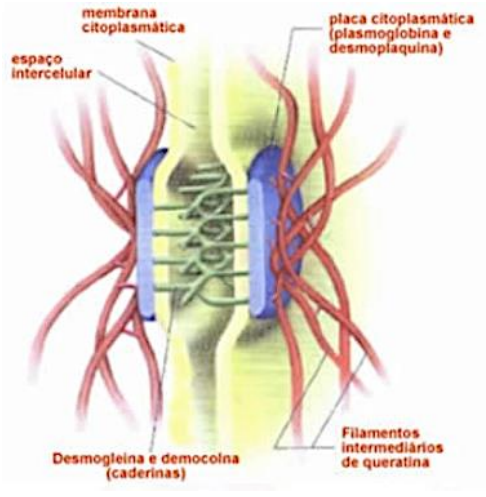
O estrato basal ou germinativo contém queratinócitos em forma de coluna que se fixam na membrana basal sobre a derme. Essas células basais formam uma única camada de células colunares, aderidas umas às outras, como às células escamosas mais superficiais, por meio de junções desmossomais. São células com núcleos ovais ou alongados de coloração basofílica quando coradas por eosina e hematoxilina. As células germinativas epidérmicas da camada basal são células clonogênicas com uma vida útil relativamente longa em condições normais. Condições anormais como feridas, podem aumentar o número dessas células em ciclagem (*turn over*), ou seja, em divisão celular. A migração de uma célula do estrato basal para a camada cornificada em humanos leva aproximadamente 14 dias (tempo no qual elas se

diferenciam). No estrato córneo, elas permanecem por cerca de mais 14 dias. Em princípio, a partir do estrato germinativo, a medida que vão se diferenciando, as células vão se dirigindo ao exterior, dando origem aos estratos pseudoestratificado para depois assumirem uma forma de células achatadas (como escamas); daí a definição da epiderme como um tecido pavimentoso[183,184].

Um pouco mais acima, o estrato de células escamosas ou espinhosas cobrem o estrato germinativo. O estrato escamoso ou espinhoso é composto por uma variedade de células que diferem em forma, estrutura e propriedades subcelulares, dependendo de sua localização. As células espinhosas são poliédricas em forma e têm um núcleo arredondado; tornam-se mais achatadas à medida que são dirigidas em direção à superfície. Os espaços intercelulares entre as células espinhosas são interligados por muitos desmossomos que promovem o acoplamento mecânico entre as células da epiderme e fornecem resistência aos estresses físicos[183,184].

Os desmossomos (do grego *desmos*, ligação, e *somatos*, corpo) são junções celulares constituídas por duas partes, uma delas na membrana de uma das células e a outra, na membrana da célula vizinha. São constituídos de proteínas estruturais plasmoglobina e desmoplaquina que constituem as placas citoplasmáticas do desmossomos. Associados às placas citoplasmáticas são formados de filamentos intermediários de queratina e no espaço intercelular de proteínas desmogleina e desmocoina (caderinas) (Figura 29)[183,188,194].

Figura 29 - O desmossomo



Fonte: https://brasilescola.uol.com.br/o-que-e/biologia/o-que-desmossomo.htm

O estrato granuloso está localizado mais superficialmente ao estrato espinhoso da epiderme contendo células vivas; é composto de células achatadas contendo abundantes grânulos queratohialinos em seu citoplasma. Nessas células inicia a síntese de queratina. A espessura do estrato granuloso varia em proporção à camada de células córneas que o recobre. Esta camada pode ter apenas 1-3 camadas de células de espessura em todo o corpo, mas em alguns casos patológico, pode ser muito fina ou ausente resultando em paraceratose; processo de diferenciação anormal no qual os núcleos dos queratinócitos persistem enquanto as células se movem para o estrato córneo (uma característica da psoríase). Os grânulos da camada granular são necessários na formação da matriz que mantém os filamentos de queratina das células córneas. A ação enzimática dos grânulos resulta na produção de queratina "mole" na epiderme, influenciando as modificações periódicas dos filamentos de queratina. Em contraste, o cabelo e as unhas não contêm grânulos de queratohialinos e os filamentos de tonofibrilas que atravessam o citoplasma da célula vão endurecer devido à incorporação de ligações dissulfeto, produzindo queratina "dura" nessas estruturas. Algumas enzimas lisossomais presentes em pequenas quantidades no estrato basal e estrato espinhoso são encontradas em níveis elevados no estrato granuloso porque o estrato granuloso é uma zona ceratógena da epiderme[183,184].

Histologicamente, nas regiões da palma da mão e sola dos pés, é encontrada uma camada epidérmica adicional, entre a granulosa e a córnea, denominada estrato lúcido. As células desta camada são nucleadas e denominadas células de transição, nas quais enzimas lisossomais ativas degradam o núcleo e as organelas celulares antes das células serem movidas para o estrato córneo. Essa camada é encontrada em áreas onde a epiderme é mais espessa, mas está ausente na pele mais fina, como as pálpebras. Essa camada pode ter uma a cinco células de espessura e é transparente[188].

A camada córnea fornece proteção mecânica para a epiderme subjacente e é uma barreira para prevenir a perda de água e invasão por substâncias estranhas. Os corneócitos, ricos em proteínas e com baixo teor de lipídios, são circundados por uma matriz lipídica extracelular contínua. As células córneas grandes, planas e de forma achatadas perderam seus núcleos durante a diferenciação terminal e, tecnicamente, são consideradas mortas. As propriedades físicas e bioquímicas das células na camada cornificada variam de acordo com a posição, a fim de promover a

descamação para o exterior. Os desmossomos nesta camada sofrem degradação proteolítica à medida que as células progridem para fora, contribuindo para a liberação de corneócitos durante a descamação. A queratina acumulada nesta camada, aumenta a espessura da camada córnea (ortoceratoce)[183,184,195].

As células não queratinócitas presentes na epiderme são principalmente: melanócitos, células de Merkel e células de Langerhans. Os melanócitos são células dendríticas responsáveis pela produção do pigmento melanina confinada na pele predominantemente à camada basal. Extensões dos melanócitos (espécie de dendritos) entram em contato com os queratinócitos, mas não formam junções celulares. A melanina é produzida em uma organela arredondada ligada à membrana, conhecida como melanossoma, por meio de uma série de reações mediadas por receptor, estimuladas por hormônios e catalisadas por enzimas. Outro tipo celular presente na epiderme são as células de Merkel. Essas células são mecanorreceptores do tipo I de adaptação lenta, de formato oval, localizadas em locais de alta sensibilidade tátil que são fixadas aos queratinócitos basais por junções desmossômicas. São encontradas nos dedos, lábios, regiões da cavidade oral e bainha externa da raiz do folículo piloso e às vezes são montadas em estruturas especializadas conhecidas como discos táteis ou cúpulas de toque. Deformações relativamente pequenas dos queratinócitos adjacentes são estímulos suficientes para fazer com que as células de Merkel secretem um sinal químico que gera um potencial de ação no neurônio aferente subdjacente, que retransmite o sinal para o cérebro. Junto com linfócitos T, as células de Langerhans estão envolvidas em uma variedade de respostas do sistema imunológico. São células derivadas da medula óssea que migram para uma posição suprabasal na epiderme no início do desenvolvimento embrionário e continuam a circular e repovoar a epiderme ao longo da vida. Estas células são células dendríticas e não formam junções celulares com células vizinhas. As células de Langerhans constituem 2-8% da população total de células epidérmicas nas camadas escamosa e granular, com menos células na camada basal. São responsáveis por reconhecer e processar antígenos solúveis encontrados no tecido epidérmico[183,184,188,193].

Para finalizar esta seção, é importante ainda destacar que a epiderme é uma camada que se renova continuamente e dá origem a estruturas derivadas, como

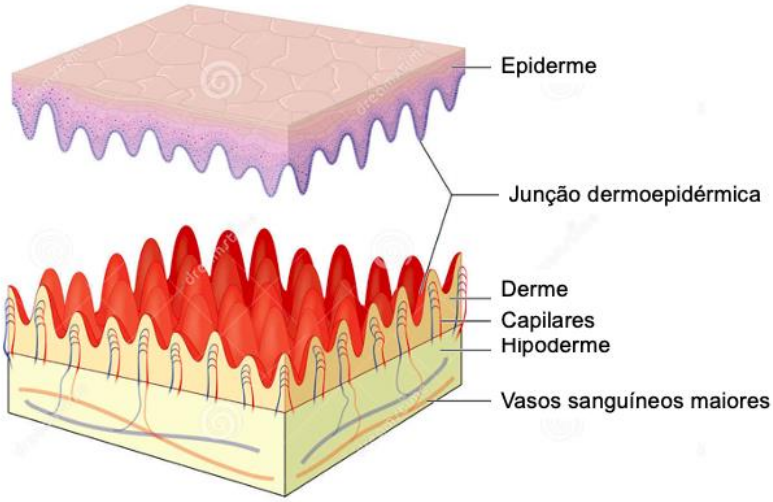
aparelhos pilossebáceos, unhas, glândulas sudoríparas e folículos capilares[183,184,190,192].

1.1.3.2 A derme

A junção dermoepidérmica (Figura 30) é uma área de tecido que une as camadas epidérmica e dérmica da pele. As células basais no estrato basal da epiderme se conectam à membrana basal por filamentos de ancoragem dos desmossomos; as células da camada papilar da derme são fixadas à membrana basal por fibrilas de ancoragem, que consistem em colágeno tipo VII. Abaixo desta área está a região da derme[183].

A derme, como ilustrada na Figura 28B é composta por uma rede de fibroblastos que produz uma matriz extracelular rica em colágeno, elastina, vasos sanguíneos e vasos linfáticos que facilitam a entrada de células imunes do sangue e a saída de linfócitos. De origem mesodérmica, a derme é subdivida em três componentes: a camada papilar, a perianexial e a reticular[187]. A porção papilar é constituída por um número maior de fibroblastos e capilares comparado à camada reticular, existindo um predomínio de fibras colágenas do tipo III. Esta camada é mais delgada e dá origem as papilas dérmicas, constituída de tecido conjuntivo frouxo. A camada perianexial compõe, juntamente com a derme papilar, a unidade anatômica denominada derme adventicial. A camada reticular é a mais espessa, constituída por tecido conjuntivo denso, com feixes de fibras colágenas do tipo I que a compõem que se entrelaçam em um arranjo semelhante à uma rede[187,196].

Figura 30 - Junção dermoepidérmica



Fonte: https://pt.dreamstime.com

A derme compreende a maior parte da pele e fornece sua flexibilidade, elasticidade e resistência à tração. Protege o corpo de lesões mecânicas, retêm a água, ajuda na regulação térmica e inclui receptores de estímulos sensoriais. A derme interage com a epiderme mantendo as propriedades de ambos os tecidos. As duas regiões colaboram durante a morfogênese da junção dermoepidérmica e dos apêndices epidérmicos, interagindo durante o processo de reparo e remodelação da pele, à medida que eventuais são cicatirzadas[183,184]. O limite entre a camada epidérmica e a derme é dado pelo plexo vascular superficial que se situa um pouco abaixo da base dos cones epidérmicos. Sua formação é de fibras colágenas, fibras elásticas, substância amorfa e fibroblastos. Encontram-se ainda, vasos, nervos e músculos, fibroblastos, DCs, mastócitos e macrófagos que constituem os principais componentes celulares da derme, além dos anexos cutâneos[187,188,196–198].

A vasodilatação e o aumento do fluxo sanguíneo da pele, junto com a sudorese, são cruciais para a dissipação do calor durante a exposição ao calor e exercícios. Durante a exposição ao frio, a vasoconstrição na pele diminui a perda de calor do corpo para prevenir a hipotermia. O controle alterado do fluxo sanguíneo da pele pode prejudicar consideravelmente a capacidade de manter a temperatura corporal normal[183,184].

Os feixes nervosos, bem como arteríolas e vênulas são encontrados em grande quantidade nos feixes neurovasculares da derme. Os corpúsculos de Meissner, encontrados nas papilas dérmicas, ajudam a mediar sensações táteis, sendo

encontrados predominantemente nas mãos, com maior concentração nas pontas dos dedos. Os corpúsculos de Vater-Pacini são grandes órgãos terminais nervosos que percebem a sensação de pressão e estão localizados na parte mais profunda da derme de superfícies de suporte de peso e genitais. Eles também são encontrados comumente nos mamilos e na região anogenital. Dor, temperatura e sensação de coceira são percebidas por fibras nervosas amielínicas que terminam em torno dos folículos capilares e da derme papilar[183,184,193].

As fibras musculares na derme estão localizadas no tecido conjuntivo de sua porção superior e estão ligadas ao folículo piloso abaixo das glândulas sebáceas. Eles estão situados em um ângulo em relação ao folículo piloso que, quando contraído, o folículo piloso é puxado para a posição vertical, deformando a pele e causando os “arrepios”. Os corpos glômicos são agregados neuromioarteriais especializados, constituidos de músculo liso, encontrados entre as arteríolas e vênulas, que existem na derme, especialmente nos dedos, nas faces laterais das palmas das mãos e plantas dos pés. Eles regulam a temperatura corporal e auxiliam na drenagem do sangue[183,184,193].

Os constituintes da derme são de origem mesodérmica, exceto os nervos, que, como os melanócitos, derivam da crista neural. Até a sexta semana de vida fetal, a derme é apenas um reservatório de células de formato dendrítico repleto de mucopolissacarídeos ácidos, que são os precursores dos fibroblastos. Por volta da 12ª semana, os fibroblastos estão sintetizando ativamente fibras de retículo, fibras elásticas e colágeno. Uma rede vascular se desenvolve e células de gordura apareceram sob a derme por volta da 24ª semana. A derme infantil é composta por pequenos feixes de colágeno, enquanto a derme adulta contém feixes mais grossos de colágeno. Muitos fibroblastos estão presentes na derme infantil, mas poucos persistem na idade adulta. A derme está conectada com a fáscia dos músculos subjacentes através de uma camada de tecido conjuntivo frouxo, conhecida por hipoderme[183,184,187,193,196].

Os mastócitos ilustrados na Figura 28B são as células mais presentes em maior número na derme papilar. Na derme normal, os mastócitos aparecem como células ovais a fusiformes com um núcleo redondo ovalado localizado centralmente. Numerosos mastócitos estão localizados ao redor dos vasos sanguíneos, especialmente vênulas pós-capilares. Sob magnificação microscópica, os mastócitos

revelam numerosas vilosidades grandes e longas em sua periferia e grânulos que são estruturas circulares, ovais ou angulares ligadas à membrana, contendo histamina, heparina, serina proteinases e vários tipos de citocinas. A superfície da célula contém centenas de milhares de locais de receptores de glicoproteína para IgE. Os mastócitos podem se acumular na pele devido à proliferação anormal, migração e falha na apoptose quando ocorre a mastocitose. Tradicionalmente associadas à resposta alérgica[190,192,199].

Estudos sugerem que essas células também podem ser capazes de regular a inflamação, a defesa do hospedeiro e a imunidade inata. Os mastócitos podem sofrer ativação por antígenos ou alérgenos agindo via receptor de alta afinidade para IgE, ânions superóxido, proteínas do complemento, neuropeptídeos e lipoproteínas. Após a ativação, os mastócitos secretam histamina, leucotrienos, prostanoides, proteases e muitas citocinas e quimiocinas. Esses mediadores podem ser fundamentais para a gênese de uma resposta inflamatória. Em virtude de sua localização e expressão de mediadores, acredita-se que os mastócitos desempenhem um papel ativo em muitas condições, como alergia, doenças parasitárias, aterosclerose, malignidades, asma, fibrose pulmonar e artrite[187,188,196–198]. Dentre as células imunes presente na derme e ilustradas na Figura 28B, inclui-se as DCs, mastócitos, neutrófilos e linfócitos T. As DCs são dividida em dois subconjuntos principais: $CD103^+$ e $CD11b^+$ e o transporte da derme para a epiderme é um evento importante na psoríase[190,192,199]. A estruturação do sistema imune da pele será mais detalhados na seção a seguir.

1.1.3.3 Pele e sistema imune

O sistema imune (inato e adaptativo) desenvolveu propriedades especializadas em diferentes partes do corpo, principalmente nos tecidos de barreiras epiteliais. Como explicado anteriormente, essas características e barreiras são essenciais contra os diferentes tipos de desafios microbianos, químicos e físicos prejudiciais encontrados no meio ambiente. Por outro lado, este sistema e barreiras com o amadurecimento do indivíduo, estruturam-se de forma a garantir que vivamos em harmonia com os organismos comensais não patogênicos que colonizam as superfícies epiteliais (da pele, por exemplo). A coleção de células e moléculas que

exercem funções especializadas imunológicas em determinadas localizações anatômicas como a pele são chamadas de sistemas imunes regionais[23,189–191].

Os sistemas imunes nas barreiras epiteliais compartilham uma organização básica, com uma camada epitelial externa que previne a invasão microbiana, no caso da pele a epiderme, um tecido conectivo subjacente contendo vários tipos celulares mediadores de respostas imunes, com tecido linfóide secundário drenante local, sendo a região onde se iniciam respostas imunes adaptativas (no caso da pele, a derme). Os sistemas imunes regionais contêm tipos de células imunes e moléculas especializadas que no geral não são abundantes em outros sítios do organismo, como por exemplo: subpopulações de DCs (que na pele são referidas como células de Langerhans), outras células APCs, subpopulações de linfócitos T, células linfoides inatas, entre as principais. Os sistemas imunes regionais têm funções reguladoras importantes que servem para prevenir respostas indesejadas a microorganismos não patogênicos e substâncias estranhas que são encontradas normalmente na sua superfície ou que frequentemente entram em contato com a mesma. A barreira física determinada pela pele impede que muitos patógenos invadam o nosso organismo e assim garante homeostase. No entanto, a pele não é totalmente impermeável; algumas substâncias, como por exemplo, medicamentos, cremes, loções, entre outros, podem penetrar em determinada extensão a mesma[23,105,189–191,200].

As células epiteliais são consideradas componentes integrais da imunidade inata e adaptativa que possuem funções de barreiras físicas, produzem citocinas, quimiocinas e peptídeos antimicrobianos, regulam a função do sistema imune e têm a capacidade de reconhecer e processar antígenos[20,183–185]. As células epiteliais da epiderme são chamadas de queratinócitos. Os sinais produzidos pelos queratinócitos alertam as células da derme, da corrente sanguínea e dos linfonodos para eventualmente recrutar células do sistema imunológico para a pele, no caso de alguma ameaça[183,184,190,192].

Nas primeiras fases da vida (bebês e crianças), a estruturação do sistema imunológico na pele depende da resposta imune inata, do amadurecimento da resposta antígeno-específica e de memória imunológica, em paralelo ao desenvolvimento e manutenção, de imunidade por um lado, e por outro lado, de tolerância aos antígenos próprios ou da microbiota (imunidade adaptativa). Ao nascimento, a pele do bebê é estéril e com o passar do tempo irá adaptar-se à uma

microbiota que irá se desenvolver em sua superfície[201]. A pele do bebê é estruturalmente diferente da pele do adulto; as células são menores e as fibras de colágeno são mais finas. A camada subcutânea nas primeiras fases da vida chega a ser 30%, e a epiderme 20%, mais finas do que a pele dos adultos. Consequentemente, a pele do bebê é mais sensível, permeável e mais propensa à desidratação do que a pele adulta[202].

Frente a um estímulo antigênico, o sistema imune da criança mostra diferenças quantitativas e funcionais em relação ao do adulto. O fato é que tanto na pele da criança, assim como na pele dos adultos existem populações relativamente diferentes de células imunes[23,201,203]. A diferença é que os componentes adaptativos na pele da criança são na maioria células virgens, ao passo que no adulto, estima-se que a pele normal humana contenha muitas subpopulações de células T, sendo cerca de 95% delas, células que já exibem fenótipo de memória; sejam células de memória efetoras de defesa ou células tolerogênicas. Cerca de 98% das células T presentes na pele estão localizadas na derme e 2% destes linfócitos são intraepidérmicos. Os linfócitos T dérmicos (ambos, $CD4^+$ e $CD8^+$) estão predominantemente em regiões perivasculares e perifoliculares. Além dos mecanismos timo-dependentes, sabe-se que o fenótipo de memória é gerado nos linfonodos periféricos a partir de sensibilizações prévias. Essas células T residentes exibem funções efetoras poderosas quando ativadas, incluindo as células $CD4^+$ de cada uma das subpopulações auxiliares (Th1, Th2, Th17 e Tregs)[23,26,32].

Os linfonodos na periferia da pele são locais onde os linfócitos T virgens irão assumir um fenótipo efetor de defesa ou de tolerância, assim como acontece em outras partes do corpo[23,72,73]. Como explicado, os fenótipos de defesa desenvolve-se quando antígenos são apresentados por DCs ou outras células APCs (MHCII), juntamente com processos inflamatórios, nos quais ocorre secreção das citocinas pró-inflamatórias ou aumento dos níveis normais das mesmas e presença de coestimuladores que em circunstâncias normais não estariam presentes[105,151]. Por outro lado, na ausência de inflamação, ausência de coestimuladores inflamatórios, ausência de expressão de determinadas citocinas, ou papel de citocinas expressas com funções regulatórias, ausência de infecção, entre outros, a apresentação de moléculas estranhas por APCs a linfócitos (normalmente nos linfonodos vizinhos), no geral, induz o desenvolvimento de células com fenótipo tolerogênico. Isto é o que mais

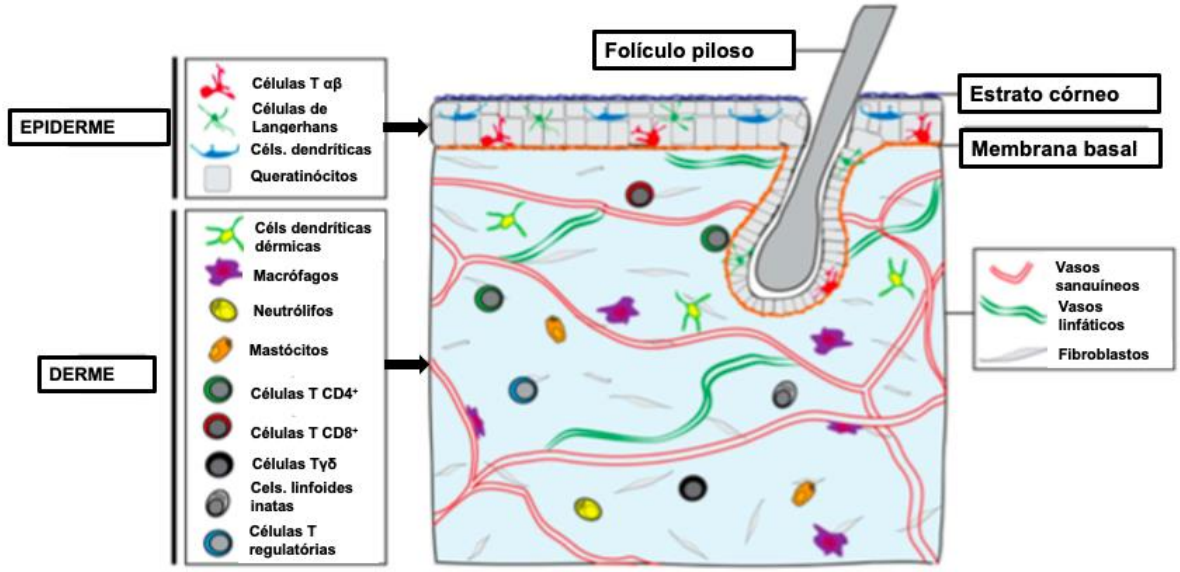
acontece com a maioria dos elementos presentes no meio ambiente, inócuos à saúde, com os quais temos contato no dia-a-dia. O tráfego celular, em princípio, segue a mesma lógica daquele ilustrado na Figura 23; isto é: fagocitose por DCs ou outras APCs → expressão de quimiocinas que dirigem o destino destas células → drenagem linfática de capilares para vasos linfáticos cada vez mais calibrosos → linfonodos periféricos → apresentação do antígeno (imunogênico ou tolerogênico) → linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ virgens tornam-se ativados e deixam os linfonodos sendo drenados ao ducto torácico → retorno à circulação sanguínea. A partir daí eles podem recircular no sangue ou tornarem-se residentes na pele/ou sítio de ação (a depender do comando dado pelas quimiocinas). Sabe-se que no caso das células residentes da pele, a vitamina D e seu derivado ativo (calcitriol) possuem um papel importante no *homing* (residência) das células T que irão residir na pele. Neste local, essas células expressam integrinas CD103 que se ligam com ligantes das células epiteliais e servem para reter as células T na pele[23,26,32,110,143–145]. Nesta altura do texto, inúmeros mecanismos reguladores das respostas de defesa e tolerância foram apresentadas. Os referidos aspectos complementam-se com as informações apresentadas neste parágrafo. Portanto, não deve ser surpresa indicar que falhas nos mecanismos abordados neste trecho também estão relacionados ao desenvolvimento de hipersensibilidade e autoimunidade.

Atualmente, sabe-se que as DCs têm papel importante neste contexto (pele - sistema imune). As DCs são altamente suscetíveis a sinais extrínsecos que modificam as funções dessas APCs cruciais. A maturação das DCs induzida por diversas condições pró-inflamatórias promove respostas imunes, mas certos sinais também induzem funções tolerogênicas em DCs. As "DCs tolerogênicas induzidas" ajudam a moderar as respostas imunológicas, como aquelas respostas para a microbiota comensal presente em locais anatômicos específicos. No entanto, também em condições de estado estacionário, algumas DCs são caracterizadas por propriedades tolerogênicas intrínsecas; uma característica encontrada em estudos recentes. Os mecanismos imunomoduladores constitutivamente presentes em tais “DCs tolerogênicas naturais” ajudam a promover a tolerância aos antígenos periféricos. Ao entender a tolerância inicialmente estabelecida no timo, essas funções das DCs ajudam a regular as respostas autoimunes e outras respostas imunológicas. Inclusive já foi demonstrado que DCs residentes nos tecidos são menos imunogênicas que DCs

recrutadas a partir da corrente sanguínea, quando ocorre uma infecção por exemplo[200].

Numerosas populações de células imunes são encontradas na pele, incluindo algumas que permanecem residentes e outras que podem entrar e sair da pele como parte de seu programa de migração (Figura 31). Os linfócitos T $CD8^+$ específicos para determinado patógenos que persistem na epiderme após alguma infecção são uma população única de células de memória com papeis importantes na vigilância imunológica e respostas protetoras à reinfecção. Os sinais que controlam a persistência, comportamento e os mecanismos pelos quais medeiam as respostas de locais estão apenas começando a ser elucidados[190].

Figura 31 - Estrutura da pele e tipos de células imunológicas encontradas na pele



Fonte: Traduzido de Mueller el at. [190]

1.1.4 Psoríase: ênfase nas formas dermatológicas da doença

1.1.4.1 Contextualização, epidemiologia e carga da doença

A psoríase é uma doença crônica inflamatória sistêmica, autoimune que atinge pessoas de todas as idades e ambos os sexos. Geralmente, seu início é mais precoce no sexo feminino. Entre as doenças autoimunes, a psoríase é considerada a mais prevalente mundialmente. Ela chega a ser considerada uma doença comum, pois se estima que aproximadamente 2 a 5% da população mundial seja acometida e que

cerca de 30% desses pacientes desenvolvam uma artrite inflamatória, conhecida como psoríase artrítica ou artropática[12,13,17,49,204].

A psoríase é uma doença fenotipicamente heterogênea, que inclui mais de uma dezena de formas clínicas. As principais formas são classificadas em duas categorias: formas dermatológicas e formas artríticas[13,17,18,205]. Quase 90% dos indivíduos que têm psoríase desenvolvem psoríase vulgar, uma forma dermatológica da doença e a maioria das pesquisas publicadas na literatura investigou essa variante[17,205].

Um estudo muito significativo foi publicado a partir de uma parceria internacional de pesquisadores originários da América do Norte (Canadá e Estados Unidos) e mais cinco países da Europa (Reino Unido, Espanha, Franca, Alemanha e Itália); um estudo realizado de forma a reduzir ao máximo vieses determinados por fronteiras geográficas e dados que são obtidos de amostras de sujeitos originários de clínicas em especifico. Este estudo teve autoria de Lebwohl et al[12] e foi publicado no Jornal da Academia Americana de Dermatologia[12]. O estudo incluiu 3.426 pacientes e 781 médicos especialistas. Neste estudo, 79% dos participantes tinham somente formas dermatológicas de psoríase, ao passo que 21% tinham psoríase artrítica com ou sem sinais/sintomas na pele. Neste estudo, a maioria dos pacientes eram mulheres (59%).

No Brasil, existe uma carência de estudos epidemiológicos que providenciem dados fidedignos sobre a incidência e prevalência de psoríase em nível nacional. A prevalência de psoríase no Brasil normalmente tem sido estimada a partir do perfil das consultas dermatológicas realizadas anualmente. Um dos estudos mais recentes que compilou estes dados foi publicado pela Sociedade Brasileira de Dermatologia em 2018[206]. Para este estudo, 8.800 dermatologistas brasileiros foram convidados a apresentar o perfil ou o motivo das consultas que realizaram na semana entre os dias 21 e 26 de maio de 2018. Entre o imenso espectro de doenças dermatológicas descritas na literatura, a frequência de 60 doenças foi ranqueada nesta publicação. Nela, a psoríase foi apontada como a sexta principal causa de visitas aos dermatologistas brasileiros[206].

Um outro estudo de estimativa de prevalência de psoríase no Brasil foi citado em 2019 no Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Psoríase da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde (SUS) (CONITEC). Neste estudo, os pesquisadores mostraram que o diagnóstico de psoríase foi verificado em 1.349 de um total de 54.519 pessoas que consultaram

dermatologistas em instituições públicas e privadas, totalizando 2,5% dessa amostra[49].

Em termos de carga de doença, os estudos revelam que a psoríase é bastante onerosa tanto para o paciente, assim como para os sistemas de saúde. A doença é associada à uma série de comorbidades, entre elas: alcoolismo, ansiedade, depressão, obesidade, diabete melito, hipertensão arterial, síndrome plurimetabólica, retocolite ulcerativa, artrite reumatoide, aterosclerose, doença cardíaca, enteropatia inflamatória (doença de Crohn), AIDS, entre outras[49,207–209]. Estes pacientes possuem risco aumentado de desenvolver certos tipos de câncer, principalmente câncer de pele não melanoma, linfoma, câncer de pulmão, entre outros[49]. Existem evidências de que o prejuízo físico e mental de pessoas com psoríase é maior que em pessoas com algumas outras doenças crônicas. Pacientes com psoríase têm risco elevado de desenvolver distúrbios psiquiátricos e até idealizações suicidas[49].

Durante uma crise de psoríase, as pessoas geralmente sentem-se angustiadas, evitando atividades, como ir à academia ou piscina, manter relação sexual, usar roupas que mostram a pele ou participar de eventos sociais[49,207,208,210]. Esses sentimentos fazem a vida parecer muito mais difícil. Em outras palavras, a psoríase impacta tanto na condição física, assim como psicológica do paciente. Sabe-se que grande parte da razão para isso está relacionada à falta de conhecimento sobre a própria doença[49,207,208,210]. Em certos casos, a doença pode ser incapacitante, tanto pelas lesões cutâneas que dificultam a inserção social, o que influencia negativamente sobre a qualidade de vida do paciente[49,211,212].

Assim como outros problemas graves de saúde, a psoríase acaba reduzindo a empregabilidade. Os custos da terapia e sociais têm grande impacto sobre os sistemas de saúde e na sociedade em geral. Uma estimativa americana da Fundação Nacional de Psoríase indicou que os custos anuais relacionados com a psoríase chegam a mais de 11 bilhões de dólares, com os dias de trabalho perdidos respondendo por cerca de 40% deste custo[13,209]. No Brasil, existe também carência de estudos que estimem este custo.

1.1.4.2 Diagnóstico e formas clínicas dermatológicas de psoríase

Nesta altura do referencial teórico, cabe explicar que não perdendo de vista a carga das formas artríticas de psoríase, contudo foco de atenção escolhido para esta tese foram as formas dermatológicas da doença.

Na dermatologia, a psoríase possuí alguns padrões característicos em relação ao fenótipo e distribuição das lesões na pele. As manifestações clínicas dermatológicas incluem lesões cutâneas características, mas é verdade que existe um espectro de variantes da doença. No paciente com psoríase, muitas vezes as lesões começam aparecer após algum trauma cutâneo ou após algum episódio de infecção das vias aéreas, alguma infecção estreptocócica, viral ou alguma ruptura da camada cutânea[13,213]. Como será explicado nas seções mais adiante, apenas esses eventos não são suficientes para causar psoríase, sabe-se que nestes pacientes existem fatores intrínsecos do genoma deles. A combinação desses fatores é o que predispõem ao estabelecimento da doença[13,17].

O diagnóstico da psoríase geralmente ocorre na segunda ou terceira década de vida. Estima-se que apenas 0,12% das vezes, o diagnóstico ocorra na mais tenra idade de vida e apenas 1 a 2% das vezes, antes dos 18 anos[18]. O diagnóstico, no geral, ocorre em âmbito clínico, realizado por um dermatologista, que em princípio, faz uma anamnese levando em consideração: a idade, o contexto, a severidade e a evolução morfológica. As manifestações clínicas da psoríase são proteicas, isto é, existe uma produção excessiva de queratina. No fenótipo clínico das lesões psoriáticas incluem hiperqueratose[13,49,207,214,215].

No primeiro momento, o dermatologista quando visualiza as lesões, avalia as mesmas considerando características como: idade de início, grau de envolvimento da pele, padrão morfológico e envolvimento predominante em termos de localização anatômica. Contudo, com alguma frequência, o diagnóstico definitivo pode ser complicado e demorado, pois a aparência das lesões lembra várias outras dermatoses[207]. Alguns diagnósticos diferenciais podem ser úteis. Por exemplo, diferenciar a doença de: pitiríase rósea de Gilbert, pitiríase liquenoide, sífilis secundária, dermatite seborreica (deve ser diferenciada da psoríase inversa), eritrodermia em atópicos (deve ser diferenciada da psoríase eritrodérmica), erupções medicamentosas, disidrose (deve ser diferenciada da psoríase pustular palmo-

plantar), eczemas, lúpus cutâneo, líquen plano, parapsoríase em placas, pitiríase rubra pilar, doença de Bowen, assim como síndrome de Sézary e micose fungoide, que ocorre nos linfomas. Dados da história clínica e a presença de outros sinais e sintomas ajudam no diagnóstico diferencial. Deve-se levar em consideração que os dados epidemiológicos demostram que a psoríase apresenta agregação familiar, logo será avaliado se algum outro membro da família possui diagnóstico de psoríase[195,214,216]. No estudo populacional realizado por Lebwohl et al[12], envolvendo 3.426 pacientes, o tempo médio relatado pelos participantes da pesquisa, com formas dermatológicas da doença, foi de cerca de dois anos.

No Brasil, existem os Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas para a psoríase. Esses protocolos são os documentos oficiais do SUS que embasam e estabelecem os critérios para o diagnóstico de uma doença ou agravo à saúde; o tratamento preconizado, incluindo medicamentos e tecnologias apropriadas; as posologias recomendadas; os cuidados com a segurança dos doentes; os mecanismos de controle clínico; o acompanhamento e a verificação dos resultados terapêuticos a serem buscados pelos profissionais de saúde e gestores do SUS. Esses protocolos visam também garantir o melhor cuidado de saúde possível diante do contexto brasileiro e dos recursos disponíveis no SUS, levando em conta os critérios de eficácia, segurança, efetividade e custo-efetividade das intervenções em saúde[16,208]. Nesses documentos, o diagnóstico da psoríase é baseado na apresentação clínica, necessitando eventualmente de biópsia de pele para confirmação em casos atípicos ou de dúvida diagnóstica (em uma seção mais adiante serão mostradas as caraterísticas histopatológicas das lesões). Este procedimento pode ser realizado em ambulatório ou no consultório sob anestesia local, sendo enviado o material para exame anatomopatológico cujos resultados podem auxiliar no diagnóstico da doença, além dos dados da história clínica de cada paciente[49,208].

Assim como acontece com algumas outras doenças autoimunes, infelizmente, os exames laboratoriais são de pouca serventia para o diagnóstico de psoríase, uma vez que até o presente momento, não foi identificado nenhum marcador celular ou molecular específico para o diagnóstico[13,49,207]

Em relação as formas clínicas dermatológicas de psoríase, na maioria dos casos, os sinais e sintomas apresentados pelos pacientes alternam entre períodos de exacerbação e períodos de uma relativa remissão da doença. As principais formas

dermatológicas são: psoríase vulgar ou em placas (> 90% dos casos)[17,18], psoríase gutata, psoríase pustulosa e psoríase eritrodérmica[13,17,18,205]. Existem ainda, algumas subclassificações de fenótipos que levam em consideração a localização anatômica acometida, como por exemplo: psoríase do couro cabeludo, inversa/flexural, palmoplantar, genital, ungueal, entre outras[13,217,218].

A psoríase vulgar ou em placas, (Figura 32) caracteriza-se por aparecer na forma de placas ovais secas e bem demarcadas concentradas nos joelhos, cotovelos e couro cabeludo, principalmente[13,219–221].

Figura 32 – Aparência das lesões da psoríase vulgar ou em placas

Fonte: Raychaudhuri et al[13], https://www.nasestradasdoplaneta.com.br/psoríase-e-suas-formas.html e https://dratallitadermatologista.com.br/blog/393-2/

A psoríase gutata (Figura 33) surge de maneira abrupta, com inúmeras pápulas (ou gotas) pequenas e disseminadas sobre a pele, que geralmente aparecem após um episódio de infecção das vias aéreas superiores de causa estreptocócica. No geral, este tipo de psoríase já é diagnosticada na infância[13,49,222]. Esta forma pode evoluir para psoríase em placas, sugerindo que deva haver uma íntima associação genética entre ambas[13].

Figura 33 – Aparência das lesões da psoríase gutata

Fonte: https://www.nasestradasdoplaneta.com.br/psoríase-e-suas-formas.html

A psoríase pustulosa é caracterizada pela presença de pústulas que podem ser localizadas ou generalizadas[13,49,223]. A psoríase localizada assemelha-se com a acrodermatite de Hallopeau (caracterizada pela erupção pustular dos dedos das mãos e dos pés) e pustulose palmoplantar (caracterizada por pústulas nas palmas das mãos e plantas dos pés e com escamas eritematosas) (Figura 34A, B e C).

Figura 34 – Aparência das lesões da psoríase pustulosa

Fonte: Raychaudhuri et al.[13] e https://www.nasestradasdoplaneta.com.br/psoríase-e-suas-formas.html

A psoríase pustular generalizada é rara, podendo ser precipitada por uma infecção, gravidez, drogas, hipocalcemia, após um tratamento tópico irritante ou devido à retirada abrupta de corticosteroides. Neste caso, os pacientes costumam estar gravemente enfermos, necessitam de hospitalização e acompanhamento rigoroso da função hepática, hipocalcemia e hidratação[13] (Figura 34D e E).

A psoríase eritrodérmica (Figura 35) é a forma mais grave da doença e talvez seja a mais dolorosa dentre as outras formas. Ela se caracteriza por eritema e descamação generalizados, envolvendo até 90% da superfície corpora[13,224]. Esta forma geralmente se desenvolve se houver um controle inadequado da doença; retirada abrupta de medicação sistêmica, resposta a uma reação medicamentosa ou ainda, devido a uma infecção sistêmica subjacente[13].

Figura 35 – Aparência das lesões da psoríase eritrodérmica

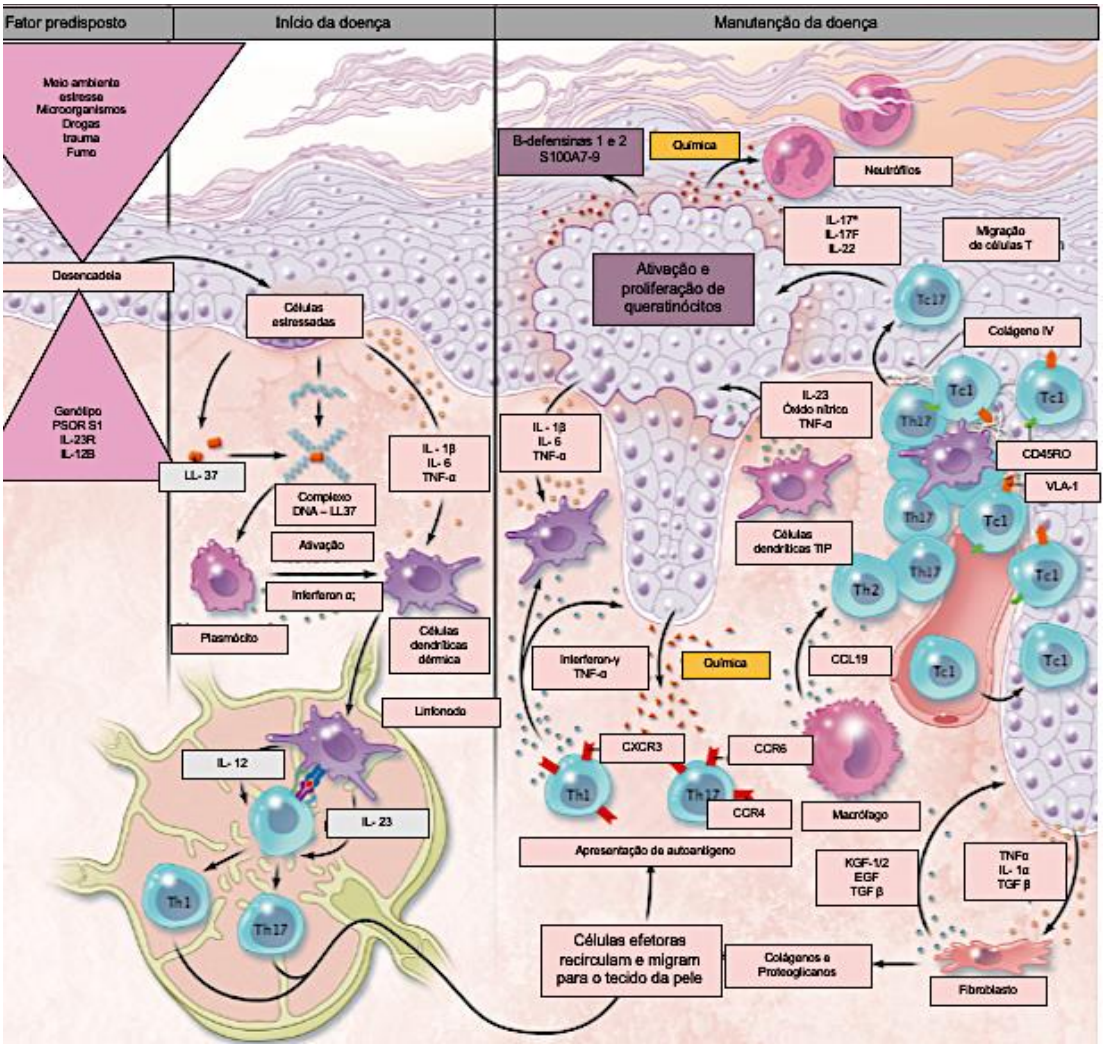
Fonte: Raychaudhuri et al.[13] e https://www.nasestradasdoplaneta.com.br/psoríase-e-suas-formas.html

1.1.4.3 Características histolopatológicas

Nesta seção serão detalhados os achados histológicos em amostras de pele de lesões psoriáticas e os tipos celulares presentes na pele doente. Histopatologicamente, a psoríase caracteriza-se por acantose (aumento do número de queratinócitos e espessamento da epiderme), paraceratose (disfunção do processo de cornificação que mantém queratinócitos nucleados na camada córnea), vasodilatação e infiltrado inflamatório contendo células dendríticas, macrófagos, neutrófilos e tipicamente linfócitos[38,4313]. Estudos revelam que as alterações histológicas típicas da pele psoriática: alterações histológicas epidérmicas e dérmicas em três fases na pele de pessoas com psoríase (Figura 36). A primeira fase refere-se à fase inicial, caracterizada por hiperplasia, acantose, espongiose, hipogranulose, paraceratose, pústulas espongiformes e na derme superior, acantose, vasodilatação e infiltrado linfocitário. A segunda fase refere-se à fase do completo desenvolvimento, que consiste em hiperplasia, paraceratose, microabscessos, hipogranulose, espongiose. A derme superior apresenta, acantose, vasos dilatados, edema e

infiltrado linfocitário. Já a terceira e última fase, refere-se a fase tardia de manutenção da doença, caracterizada por hiperplasia, cones interpapilares, paraceratose e hipogranulose. A derme apresenta ainda, leve fibroplasia, dilatação e infiltrados linfocitários perivasculares e intersticiais[16,17,49,225,226].

Figura 36 - Principais fases e células e moléculas envolvidas na patogênese da psoríase



Fonte: Adaptado de Nestle et al.[17]

Atualmente, os estudos histopatológicos que abordam a psoríase, ao compararem a pele saudável e doente, demonstram diferenças na composição celular e de mediadores inflamatórios. Quanto à composição celular, na pele saudável é possível observar muitas células de Langerhans e DCs imaturas, poucos TCD4^{+} e

raros linfócitos TCD8^{+}. Ao passo que na pele doente (psoriática), é possível observar diferentes tipos celulares, como descrito no Quadro 2.

Tabela 1 - População celulares envolvidas nas lesões psoriáticas

Células	Pele não lesionada	Pele lesionada	Expressão na psoríase
Células de Langerhans imaturas	Poucas	Muitas	Constitui-se em células dendríticas imaturas, residentes na epiderme
Células dendríticas mieloides	Poucas	Muitas	Localizam-se na derme; derivam de monócitos sanguíneos ou de outras células precursoras mieloides, com fortes expressão do MHCII, responsável por intensa imunoestimulação de linfócitos T, devido à grande liberação de IL-12 e IL-23 (citocinas com ação inflamatória).
Células dendríticas maduras	Ausentes	Abundantes	Após maturação pela ação do TNF, essa linhagem, que deriva da linhagem mieloide, apresenta maior capacidade de ativação de células T, diferente daquelas presentes na pele normal.
Células dendríticas plasmocitoides	Ausentes	Muitas	Ativadas, sintetizam e liberam grandes concentrações de interferon α (IFN-α), estimulando linfócitos T na lesão.
Linfócitos T CD4^{+}	Poucas	Abundantes	Predominam na derme e expressam antígeno cutâneo linfocitário, que atua seletivamente nas lesões inflamatórias.
Linfócitos T CD8^{+}	Raras	Abundantes	Localiza-se na epiderme, expressando α e β7 integrinas, que se ligam à E-cadeinas, impedindo a formação de desmossomos entre os queratinócitos.
Linfócitos T natural killer	Ausentes	Abundantes	São recrutados do sangue circulante, por quimiotaxia e sintetizam grandes quantidades de IFN- γ.
Neutrófilos	Ausentes	Frequentes	São recrutados para a lesão pela ação da IL-8 e embora presentes, não são considerados causa primária da psoríase.
Macrófagos	Ausentes	Abundantes e ativados	São essenciais para a ativação de linfócitos B.

Fonte: Lima et al.[227]

A Figura 37 apresenta na parte superior amostras de cortes histológicas de pele saudável, ao passo que na parte inferior; pele psoriática. Na parte esquerda da Figura os cortes foram corados com eosina e hematoxilina. No lado direito da figura, foi feita a coloração imunohistoquímica que destaca o infiltrado de linfocitário[18]. A pele saudável foi indicada pelas letras A e C e a pele psoriática pelas letras B e D. Os achados histológicos sugerem que na epiderme psoriática (Figura 37 B e D) está presente a acantose e paraceratose. As setas (Figura 37B) indicam vasos sanguíneos dérmicos estão dilatados, contorcidos e alcançam as pontas das papilas dérmicas. O asterisco (Figura 37B) indica um infiltrado inflamatório misto contendo neutrófilos se

acumulando na epiderme. Em contraste com a pele normal (Figura 37C), as flechas na Figura 37D revelam por detecção imunohistoquímica muitas células T na derme e epiderme na pele psoriásica. Os núcleos celulares presentes na camada cornificada da epiderme também são característicos da pele psoriásica (Figura 37D, asterisco).

Figura 37 – Amostra histológica de pele saudável e de pele psoriática

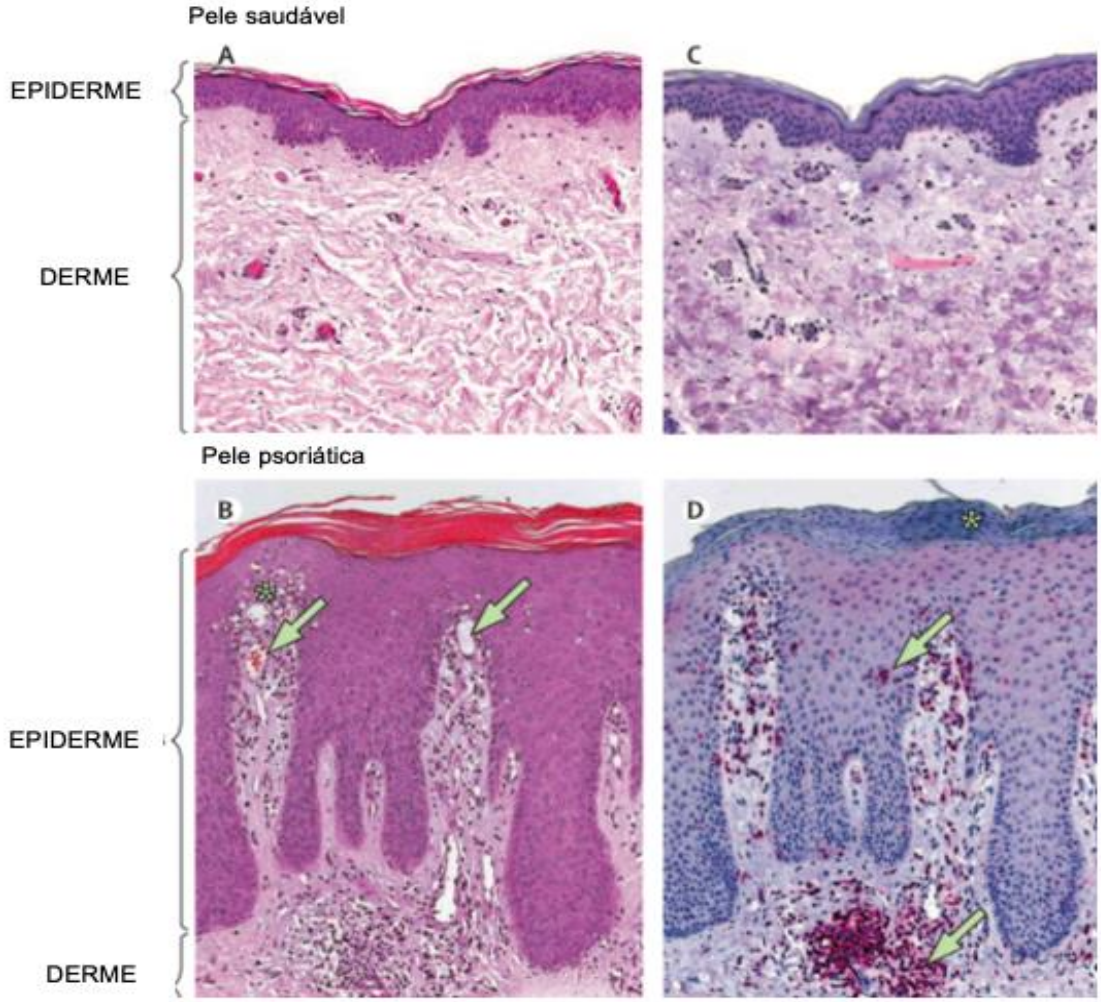


Figura 2: Adaptada de Boehncke et al.[18]

1.1.4.4 Imunopatogênese da psoríase

O sistema imunológico inato fornece um mecanismo de resposta precoce contra danos. Existem evidências de desregulação do sistema imunológico inato na psoríase. Dentre as células imunes presente na pele psoriática estão as DCs, células *NKs*, neutrófilos, macrófagos e notavelmente linfócitos[23,45,63,213]. As células dendríticas são as principais sentinelas do sistema imune, fazendo a ponte entre a imunidade inata e a adaptativa. Em um sentido amplo, existem três tipos de DCs dérmicas

residentes: células epidérmicas de Langerhans (LCs), DCs dérmicas mielóides (mDCs) e DCs plasmocitóides (pDCs) (Figura 36).

Na psoríase, as mDCs estão aumentadas e induzem proliferação de células T, bem como produção de citocinas de células T auxiliares. Eles também têm uma capacidade pró-inflamatória, produzindo TNF e induzindo a expressão da óxido nítrico sintase indutível[199,228]. As mDCs ativadas liberam IL-12, que ativa células Th1 que se caracteriza pela produção do interferon IFN-γ, e também IL-23, que ativa células Th17. As células ativadas secretam IL-17 (principalmente IL-17A) e IL-22, que ativam os queratinócitos e provocam o fenótipo da psoríase[68,199,228].

Uma questão-chave diz respeito à natureza autoimune da psoríase e a contribuição das células T autorreativas para o processo patológico[17]. Como ilustrado na Figura 36, células pDCs parecem ser ativadas por complexos formados por peptídeos antimicrobianos (LL-37) e auto-DNA oriundos dos queratinócitos de uma maneira dependente de receptores toll-like[199,229]. Essa explicação fornece uma teoria de um mecanismo pelo qual o DNA do hospedeiro é transformado em um estímulo pró-inflamatório que compromete os mecanismos de tolerância imunológica no caso da psoríase[17]. Assim, queratinócitos e neutrófilos, através da liberação de LL-37, podem fornecer informações sobre o reconhecimento do auto-DNA pelas DCs, e isso, por sua vez, pode ser um elemento crítico na fisiopatologia da psoríase. Neste contexto, existe um importante grupo de moléculas que surgem como candidatas para compreender o mecanismo de interação entre fatores de risco que, uma vez conhecidos, podem auxiliar no desenvolvimento de terapias inovadoras no futuro, além de potencialmente poder servir como marcadores para diagnóstico ou prognóstico da doença[199,229].

Outra célula que parece desempenhar um papel sobre os queratinócitos são as *NKs*. Estas células são um subconjunto distinto de células $CD56^+$ e $CD16^+$ bem conhecidas por sua capacidade de matar células cancerígenas e infectadas por vírus. Porém, estudos sugerem que as *NKs* são capazes de produzir grandes quantidades de IFN-γ, induzindo a ativação de queratinócitos e a regulação positiva das moléculas do MHC de classe I. Ainda existem evidências de que os neutrófilos recrutados pelas quimiocinas CXCL1, CXCL2 e IL-18 contribuem para o recrutamento de células T que produzem IL-17 em pacientes com psoríase. A infiltração de macrófagos promove a

proliferação de queratinócitos e o desenvolvimento de psoríase, pois produzem muitos mediadores inflamatórios e citocinas, uma delas é a IL-23, crucial na patogênese da doença[213].

Os infiltrados inflamatórios na psoríase possuem um infiltrado linfocitário proeminente. Os linfócitos T nas lesões psoriáticas apresentam uma compartimentalização distinta entre as camadas anatômicas da pele: Células T $CD4^+$ são encontradas predominantemente na parte superior da derme, ao passo que há um epidermotropismo de células T CD 8+ que em sua maioria localizam-se na epiderme podendo lesionar os queratinócitos[190]. As células Th17 têm um papel preponderante na patogénese da psoríase e os modelos de xenotransplante em camundongos demonstram que a injecção de células Th17 ativadas induz psoríase nos enxertos de pele saudável. No caso das doenças inflamatórias imunomediadas da pele, os linfócitos T danificam os tecidos pelo desencadeamento de inflamação ou por matar diretamente as células-alvo[199,228]. Essas reações são desencadeadas principalmente por células $TCD4^+$ anormais das subpopulações Th1, Th17, Tγδ, Th22, Th9 e Tregs. É verificado também que as células endoteliais vasculares nas lesões podem expressar níveis aumentados de proteínas de superfície, tais como moléculas de adesão e moléculas MHC classe II, desreguladas por diferentes citocinas[23].

As células Th1 secretam IFN-γ, TNF e IL-2, ativam macrófagos e foram originalmente consideradas o principal mediador da resposta imune nas placas psoriáticas[11,199,213,230]. Deng et al.[213] relataram que em um estudo realizado foi encontrada expressão aumentada de mRNA do IFN- γ, TNF e IL-12 na psoríase. O IFN-γ age sobre os queratinócitos, contribuindo para as alterações epidérmicas e vasculares observadas na psoríase[227]. Uma rede de pelo menos três citocina pró-inflamatórias predominantes estão envolvidas na patogênese da psoríase, são elas: IFN tipo I, IFN-γ e TNF[199].

As células Th17 são de importância central na imunopatogênese da psoríase e secretam IL-17, IL21 e IL-22 que recrutam os neutrófilos para no local da inflamação[190]. Todas estas citocinas agem direta ou indiretamente para promover a resposta inflamatória sobre os queratinócitos. Estudos recentes sugerem que a via IL-23/IL-17 é essencial para a patogênese da psoríase. O bloqueio desse eixo foi muito promissor em suprimir o desenvolvimento de doenças psoriáticas e a desregulação

da sinalização de IL-17 e a função da via celular Th17, induzidas pela IL-23, promovem a inflamação crônica da psoríase[213].

As células Tγδ demonstraram uma estreita relação com as doenças imunológicas, onde Tγδ produtoras de IL-17 foram recentemente identificadas e responsabilizadas por desempenhar um papel na patogênese da psoríase através de suas citocinas efetoras (IL-17), ampliando assim a função do Th17. Deng et al mencionam também em seus estudos que foi encontrado um grande número de células Tγδ em lesões de pacientes com psoríase após a estimulação de IL-23 na pele. Estas células geralmente encontram-se aumentadas na pele e diminuídas no sangue periférico em pacientes com psoríase, sugerindo que elas se redistribuem a partir do sangue para a pele, a fim de participar da patogênese da psoríase[213].

As células Th22 produtoras de IL-22 e as células Th9 produtoras de IL-9 constituem outros dois subconjuntos distintos de células T efetoras que levam à indução de quimiocinas específicas de citocinas e ao aumento de respostas efetoras específicas mediadas pelo eixo IL-23/Th17. A IL-9 funciona como um potente mediador da sinalização celular Th17. Espera-se que novos estudos com as células Tγδ, Th22 e Th9 na psoríase, ainda na infância, sejam um interesse crescente no estudo de mecanismos potenciais de respostas inflamatórias e patogênese da doença psoriática[213].

As Tregs são essenciais para manter a tolerância imunológica e prevenir doenças autoimunes, incluindo a psoríase. Estas células são encontrados na derme saudável de camundongos[11,190,213]. As células Treg maduras expressam Foxp3, TGF-β, IL-10, perforinas, granzimas e podem causar supressão local de outras células imunes, incluindo as células Th17[213]. A supressão da autoimunidade ou inflamação crônica por Tregs é mediada por citocinas imunossupressoras que elas secretam, incluindo a IL-10, o que foi confirmado por estudos clínicos[11,17]. As Tregs são responsáveis pela manutenção da autotolerância, inibindo a autoimunidade, enquanto as células Th17 pró-inflamatórias contribuem para a indução e propagação da inflamação. Estas células regulam uma a outra reciprocamente através de mecanismos contra-regulatórios[11,17,213,231].

Nas lesões psoriáticas, o processo hiperproliferativo dos queratinócitos é dirigido também pela sinalização por parte das citocinas inflamatórias, que levam a alterações em vias de transdução de sinais e células imunes. Além disso, a IL-23, IL-

17A e IL-22 são de importância considerável na patogenia da psoríase e atuam através de um conjunto restrito de vias de sinalização e transcrição[199].

A via da JAK-STATs são ativadas por IFN-γ NF-κB no caso do TNF. O IFN-γ é secretado linfócitos T auxiliares tipo 1 (Th1), linfócitos T CD8, células B, células *NKs* e APCs, tais como monócitos, macrófagos e células dendríticas, entre outras[70]. Assim, citocinas convergem em importantes pontos de verificação intracelulares conhecidos e que são comuns a muitas condições inflamatórias crônicas[199].

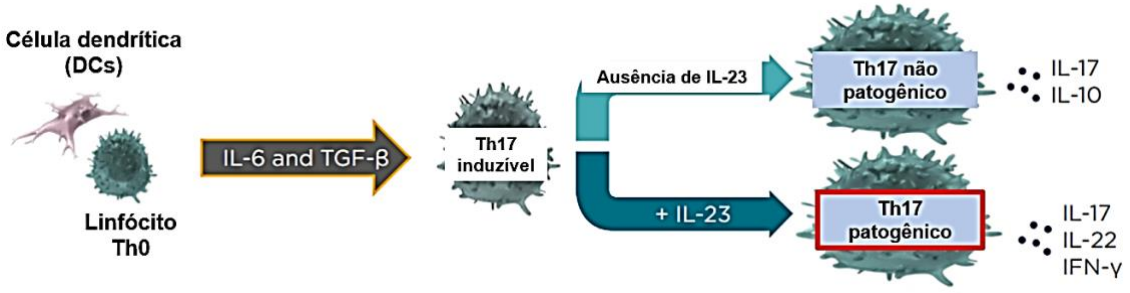
Uma das vias relacionada com a inflamação psoriática e hiperproliferação é a via das MAPKs. Desta forma, as proteínas ERK1 e ERK2 quando ativadas por fosforilações medeiam alguns dos efeitos biológicos de fatores de crescimento, translocando ao núcleo das células onde fosforilam proteínas como Elk-1, que quando ativadas modulam a transcrição de cerca de 100 genes que regulam a proliferação e diferenciação celular[232,233].

Entre as diversas vias de sinalização, semelhante a via das MAPKs, a via da Akt também parece envolvida na fisiopatologia da psoríase. Esta via de sinalização é conhecida como uma das mais importantes vias que regulam a sobrevivência celular; ela desempenha um papel fundamental na angiogênese de células endoteliais. Além disso, a Akt ativa a óxido nítrico-sintase endotelial, liberando óxido nítrico que estimula vasodilatação, remodelagem vascular e novamente a angiogênesse[99,234].

No 27° Congresso da Academia Europeia de Dermatologia e Venereologia realizado em Paris na França, recentemente em 14 de setembro de 2018; o Professor Dr. Kristian Reich (da Instituição *Dermatologikum* de Berlim, vinculado ao Centro de Pesquisa *SCIderm Research Institute* e à *Georg-August-University Göttingen,* Hamburgo, Alemanha) foi moderador e fez o relatório, juntamente com a colaboração por parte do Dr. Helen Saul (publicado no reconhecido periódico *European Medical Journal*, na forma de artigo científico), referente à uma elegante apresentação, na qual juntamente com o Prof. Dr. Lars Iversen do Departamento de Dermatologia e Venereologia do Hospital Universitário Aarhus (Dinamarca) e Prof. Dr. Hervé Bachelez do Departamento de Dermatologia do *AP-HP Hôpital Saint-Louis* de Paris, foi apresentada uma teoria inovadora que gerou maior compreensão, estendendo fronteiras do conhecimento, em relação ao processo patogênico da psoríase. O ponto de partida foram conceitos consensuais recém apresentados na revisão teórica da presente tese sobre a imunopatogênese da psoríase humana[13,16,18,205].

A teoria aditiva foi esquematizada na Figura 38, adaptada a partir do próprio referido relatório científico[283].

Figura 38. Diferenciação induzível de Th17 patogênico na presença de IL-23.



Fonte: Reich et al[283].

O foco de atenção dos autores foi a diferenciação induzível em contexto fisiológico e na psoríase das células Th17. A teoria reconhece que, em pessoas normais e em circunstâncias fisiológicas, a iniciação e polarização de respostas imunes do tipo celular, através de linfócitos Th17 é de fundamental importância para a defesa do hospedeiro, quando ele é contaminado por certos tipos de bactérias e fungos. Neste contexto, após a apresentação do antígeno por DCs aos linfócitos virgens (Th0), nos órgãos linfoides periféricos, as citocinas IL-6 e TGF-β induzem linfócitos Th0 a diferenciarem-se em linfócitos Th17 não patogênicos, que secretam IL-17 com alvos sobre neutrófilos e células T citotóxicas que irão combater à infecção por meio de respostas essencialmente celulares (38). O Th17 não patogênico, ainda secreta IL-10, que inibe respostas imunes indesejadas.

Por outro lado, no contexto da patogênese da psoríase, em indivíduos que possuem genes de pré-disposição à doença, o autoantígeno putativo (complexo de DNA e LL37) é fagocitado pelas células DCs e apresentado aos linfócitos Th0, juntamente com uma secreção anormal da citocina IL-23 (Figuras 24 e 38). A diferenciação do linfócito Th0 para Th17, deixa de ser dirigida pelas citocinas típicas (IL-6 e TGF-β) e, a aquisição do fenótipo Th17 passa acontecer sob influência da IL-23, o que origina células Th17 patogênicas, que em vez de secretar IL-17 e IL-10; secretam de forma anormal, IL-17, em concentrações tais que inibem as células Tregs e a secreção de IL-10, supressoras de respostas imunes indesejadas[97]. A partir de um eixo de biossinalização IL-23/IL-17, as células Th17 patogênicas secretam ainda, IL-

22 e INFγ; o aumento da concentração desta última está sabidamente relacionado à promoção da doença psoriática[13,16,18,205].

1.1.4.5 Causas genéticas e ambientais

Dados epidemiológicos são suficientes para considerar a psoríase uma doença com fortes traços hereditários, pois neste caso há “agregação familiar”, ou seja, traços hereditários dentro de uma mesma família. Os aspectos genéticos desta doença levam a considerar a psoríase uma genodermatose multifatorial, poligênica e influenciada pelo meio[49,235,236]

Há décadas atrás, a causa da psoríase foi primeiramente pensada como sendo causada por queratinócitos aberrantes resultantes de uma proliferação descontrolada nas camadas epidérmicas da pele. Os achados de *loci* mutantes em pacientes com psoríase apoiam esta hipótese[49,237,238], juntamente com estudos sobre a reciclagem das células epidermais[239–242]. Os queratinócitos na psoríase são carcaterizados não somente pela hiperproliferação, mas também pela expressão alterada de certas proteínas, por exemplo queratinas. O conceito de queratinócitos anômalos como células patogênicas causadoras de psoríase tem ganhado atenção renovada desde que diferentes artigos publicados no começo deste milênio mostraram alterações genéticas em fatores de transcrição epidermais que podem causar doenças dermatológicas que se assemelham à psoríase humana clínica e histopatologicamente[241].

Um esforço tremendo tem sido feito por parte de cooperações internacionais sob a forma de estudos de associações amplas de genoma, análise do genótipo e fenótipo de milhares de pacientes e voluntários-controle em um desafio que objetiva identificar mutações em *loci* verdadeiramente relacionadas com uma susceptibilidade para psoríase[237]. As descobertas mais recentes têm apontado para *loci* de genes que codificam para o MHC, ou seja, *loci* do sistema antígeno leucocitário (HLA) localizado no cromossomo 6 dos humanos. Está claro que a susceptibilidade não é determinada por um único locus. Mas, como previsto por estudos há mais de 25 anos, os cientistas conseguiram confirmar que os sinais de associação genética com a psoríase mais fortes estão ligados ao locus HLA-Cw6. Hoje, sabe-se que a psoríase está associada

com HLA-Cw6 e p.ex. caucasianos que carregam esse alelo têm risco de desenvolver psoríase cerca de 10 vezes aumentado[243]. A partir de 2006, HLA-Cw6 passou a ser tratado como um locus alelo da susceptibilidade à psoríase PSORS1[49,244]. PSORS1 sozinho não pode causar psoríase, mas sabe-se que principalmente no caso da psoríase gutata existe uma forte associação. Um estudo realizado já demonstrou que até 100% dos pacientes com psoríase gutata eram portadores deste alelo[49,245]. Outros *loci* já foram associados com a desregulação da função das células T, respostas antivirais mediadas por interferon IFN, ativação de macrófagos e sinalização do fator de transcrição NFκB[13,204].

Uma vez identificados estes *loci,* estudos que avaliem a correlação entre o genótipo e o fenótipo da psoríase são muito necessários. Por exemplo, há ainda muita controvérsia para afirmar se a psoríase e a artrite psoriática constituem doenças geneticamente distintas ou se compartilham do mesmo padrão de hereditariedade. Várias diferenças têm sido identificadas em pacientes com envolvimento articular e psoríase pustular[49,246,247]. Acredita-se que a psoríase em indivíduos geneticamente susceptíveis seja iniciada por estímulos específicos, assim como um trauma ou infecção bacteriana, que em resposta induz as DCs, os macrófagos e as células T para a produção de citocinas que iniciam uma cascata de eventos como ativação de células imunes, desregulação epidermal com acantose e angiogênese[13,241,248].

1.1.4.6 Tratamento disponível para psoríase e suas limitações

Atualmente, não há cura para a psoríase. O tratamento disponível é apenas paliativo. No entanto, o arsenal terapêutico expandiu-se muito nas últimas duas décadas com o desenvolvimento de várias terapias altamente seletivas que são eficazes e apresentam um perfil de segurança muitas vezes tolerável[205].

O tratamento é escolhido, em princípio, avaliando cada indivíduo na clínica. A primeira coisa a se fazer é a classificação dos casos, que podem ser considerados leves, moderados ou graves[249]. O tratamento tópico é o mais comum, pois cerca de 90% dos casos são casos leves e o tratamento permite aplicação no local da lesão. Sem contar que os efeitos colaterais são minimizados em comparação ao tratamento sistêmico. O tratamento sistêmico é indicado quando o tratamento tópico não é satisfatório. As medicações sistêmicas têm indicações limitadas, principalmente na

infância e durante a gestação, devido aos efeitos cumulativos das drogas, à baixa aceitação e ao risco de teratogenicidade[215]. O uso desses fármacos pode causar imunossupressão severa do paciente, levando a infecções oportunistas, podendo ser necessária a hospitalização, o que consequentemente gera aumento dos custos do tratamento. Portanto, esta modalidade terapêutica é reservada aos casos moderados a graves da doença[250]. A associação de medicamentos orais, tópicos e fototerapia precisam ser avaliadas pelo dermatologista, quando a relação risco/benefício deve ser avaliada criteriosamente[16,250].

Para iniciar um tratamento, uma triagem é realizada individualmente pelo médico dermatologista[16,208,251]. Este profissional é responsável por incluir ou excluir o paciente de determinada terapia. Para tanto, o comitê Nacional de incorporação de Tecnologias do Sistema único de saúde (SUS) (CONITEC)[16] pontuou algumas questões sobre os critérios de inclusão e exclusão para as possibilidades terapêuticas. Os métodos sugeridos são úteis para classificar os pacientes e avaliar as respostas aos tratamentos. Um dos métodos utilizado pelos especialistas da área é a Avaliação Global pelo Médico (PGA). De forma rápida e prática, o profissional avalia os resultados terapêuticos e gradua a severidade da psoríase ao mesmo tempo que avalia a qualidade de vida do paciente. O paciente recebe um escore de 0-6, que corresponde à gravidade das lesões onde: Escore 6 - Psoríase grave; Escore 5 - Psoríase moderada a grave; Escore 4 - Psoríase moderada; Escore 3 - Psoríase leve a moderada; Escore 2 - Psoríase leve; Escore 1 - Psoríase quase em remissão; Escore 0 - Remissão completa[49].

Tradicionalmente, os dermatologistas utilizam mais a avaliação da gravidade dos casos pelo Índice de Severidade da Psoríase por Área (PASI)[249]. Trata-se de um instrumento que possibilita uma estimativa visual macroscópica calculada pelo avaliador. O corpo é esquematicamente dividido em quatro regiões: membros inferiores, membros superiores, tronco e cabeça. Para cada uma delas, são avaliados quatros parâmetros: área acometida, eritema, infiltração e descamação. Ao final, os dados de cada região são somados podendo ter resultados de 0-72 (grau máximo de doença). Esse instrumento permite classificar a gravidade da psoríase em leve (igual ou inferior a 10) e moderada a grave (superior a 10)[49].

O PASI tem sido utilizado como desfecho principal de estudos clínicos que avaliam eficácia de tratamentos para psoríase pela comparação dos resultados

obtidos antes, durante e após as intervenções. O índice mais frequentemente utilizado para documentar a efetividade de terapias individuais para psoríase extensa é o PASI-75 que representa melhora superior a 75% do escore medido pelo PASI. O PASI é considerado menos sensível em pacientes com acometimento de menos de 10% da superfície corporal e subutilizado na prática clínica por sua complexidade, porém é o desfecho de escolha dos estudos mais relevantes[49,252,252].

Quando os dermatologistas utilizam o PASI, eles associam este instrumento com outro de avaliação de qualidade de vida: O Índice de Qualidade de Vida Dermatológico (DLQI)[253]. Este instrumento também é validado para uso no Brasil. Trata-se de um questionário de 10 itens que avalia o impacto de doenças dermatológicas na qualidade de vida dos pacientes em relação a atividades de vida diária, lazer, trabalho, estudo, relações pessoais e tratamento. Cada item é pontuado de 0-3, e o escore total varia de 0-30, sendo melhor a qualidade de vida quanto menor o escore. Uma redução de 5 pontos no escore total tem demonstrado significância clínica como desfecho positivo de uma intervenção terapêutica[49].

De modo geral, serão excluídos do tratamento os pacientes que apresentarem hipersensibilidade ou intolerância ao tratamento clássico da psoríase como por exemplo: pacientes com hipercalcemia; portadores de lúpus eritematoso sistêmico; xeroderma pigmentoso ou porfiria; histórico de melanoma ou múltiplos cânceres de pele; lesões cutâneas virais, fungicas ou bacterianas; gestantes e mulheres com desejo de gestar nos próximos anos; insuficiência hepática ou renal graves; hipertensão; síndromes de imunodeficiência; insuficiência cardíaca; histórico de doença neurológica desmielinizamte; doença inflamatória intestinal e tuberculose ativa ou latente[16].

No subtítulo a seguir foram apresentadas as formas de tratamento atualmente disponíveis para psoríase.

1.1.4.6.1 Formas tópicas de tratamento

Os medicamentos tópicos são destinados principalmente para o tratamento da psoríase em placas e podem ser administrados sozinhos ou em associação com outras alternativas terapêuticas. Para tanto, existem pomadas para lesões espessas, cremes para regiões escamosas e loções para couro cabeludo. Em alguns casos, a

inclusão da fototerapia faz-se necessário, uma vez que ajuda retardar a proliferação de queratinócitos. Esta modalidade terapêutica que também tem sido utilizada para certos casos é baseada em fototerapia combinada com fármaco fotossensibilizante, como psoralenos e radiação UV tipo A, denominada PUVA ou terapia fotodinâmica[254,255]. Um fármaco da família dos psoralenos induz fotossensibilidade, ou seja, uma sensibilidade extrema sobre a pele quando exposta à luz, seja solar ou de fontes luminosas. A depender do contexto, o uso da fototerapia depende de precauções, existindo inclusive situações onde é contraindicado[44].

O alcatrão de carvão era um recurso utilizado em combinação com a aplicação tópica de alcatrão. Este tipo de tratamento caiu em desuso por conta de ser de difícil aplicação, ter odor forte e sujeira que causava às vestimentas, sendo um recurso utilizado em lesões psoríaticas há mais de um século. O alcatrão de carvão era utilizado antes do surgimento dos corticoides. O mecanismo pelo qual o alcatrão reduz a manifestação psoriática ainda não está bem estabelecido, porém, os efeitos do tratamento parecem interferir na supressão da síntese de DNA, que leva a redução da hiperproliferação na pele psoriática[256,257]. No entanto, potenciais efeitos adversos incluem dermatite de contato irritativa, foliculite e fotossensibilidade aos UVA.

O tratamento mais indicado pelos dermatologistas nos casos leves é a aplicação tópica de corticosteroides, tendo como exemplo: propionato de clobetasol, valerato de betametasona e propionato de fluticasona. Os corticoides reduzem a quimiotaxia leucocitária, modulam a síntese e a liberação de citocinas e quimiocinas, diminuem a síntese de DNA e inibem a fosfolipase A2, que por sua vez inibe a formação de prostaglandinas e leucotrienos. Embora o tratamento tópico seja a primeira escolha, o mesmo, quando prolongado, está relacionado com efeitos colaterais indesejáveis, tais como: atrofia epidérmica e dérmica, hipertricose, aumento da pressão sanguínea, eritema, aumento do risco de infecções, retenção hídrica, telangiectasias (vasos muito finos), dermatite de contato, depressão, imunossupressão, danos ósseos e musculares, dente outros[226,256].

A administração parenteral de corticoides é utilizada somente na psoríase eritrodérmica, artrite psoriática e nas formas mais grave de psoríase, tendo como efeitos colaterais a Sindrome de Cushing, osteoporose, diminuição do cortisol plasmático, dentre outros[258]. O uso desses medicamentos podem causar imunossupressão severa levando a infecções oportunistas, podendo ser necessária a

hospitalização do paciente, o que consequentemente gera aumento dos custos para o governo com a hospitalização e para o paciente com o tratamento, além da debilidade física causada[250,253].

Os corticoides são contraindicados em dermatoses e dermatites em crianças com menos de 1 ano de idade; em infecções cutâneas ou no couro cabeludo não tratadas, na presença de rosácea, acne vulgar e tuberculose da pele; na infecção por herpes simples e varicela; dermatite perioral e prurido genital e perianal[16].

O calcitriol (o metabólito ativo da vitamina D) e o calcipotrieno, outro análogo sintético da vitamina D, auxiliam de forma promissora na redução do processo de maturação e hiperproliferação dos queratinócitos, regulando a expressão gênica[259]. Na psoríase, como já mencionado, existe uma série de fatores pró-inflamatórios que regem à sinalização autoimune. As interleucinas IL-12, IL-23 e TNF desemprenham papel fundamental no processo inflamatório nos casos de psoríase. Os análogos de vitaminas D inibem a biossíntese das citocinas pró-inflamatórias. Essa classe de medicamentos é segura e a maioria dos efeitos colaterais está relacionada a reações nas áreas de aplicação, como eritema, prurido e sensação de queimação[260]. A hipercalcemia é uma contraindicação[16].

Embora os retinoides orais (substâncias naturais ou sintéticas derivadas da vitamina A) tenham sido muito usados nos tratamentos de psoríase anos atrás, hoje a forma tópica está mais frequentemente associada aos protocolos de tratamento. O tarazoteno é um derivado retinoide disponível em gel com concentração a 0,01% e 0,05%. Tem eficácia leve a moderada sendo indicado para psoríase crônica em placas e não está aprovado para uso em crianças com psoríase. Os derivados retinoides tópicos são contraindicados no período de gestação, lactação e quando o paciente possuir hipersensibilidade a outros derivados retinoides (isotretinoína, etretinato, dentre outros)[16]. Podem provocar irritação, queimação ou eritema local[215]. O efeito colateral mais comum é a irritação local na pele[261]. Não deve ser usado na face ou em regiões intertriginosas[215].

1.1.4.6.2 Formas sistêmicas de tratamento

Os medicamentos orais são utilizados em casos que somente os medicamentos tópicos não são suficientes para conter a severidade das lesões. As

drogas sistêmicas mais utilizadas pelos dermatologistas incluem o metotrexato, ciclosporina e acitretina. Na maioria dos casos, medicamentos tópicos e sistêmicos são administrados simultaneamente.

O metrotexato é um antimetabólito, uma droga antifolato, usada no tratamento do câncer e doenças autoimunes, que age inibindo o metabolismo do ácido fólico[262]. Este medicamento é preliminarmente utilizado em pacientes oncológicos, pois inibe a proliferação celular. As prescrições para pacientes com psoríase começaram quando o mesmo foi utilizado em pacientes oncológicos que eram portadores de psoríase em placas. Foi então que os médicos perceberam que ocorria melhora significativa da psoríase e a partir de então por alguns anos o metotrexato foi introduzido no tratamento da doença. O mecanismo de ação do metotrexato na psoríase não está bem estabelecido, porém, é sabido que uma de suas características farmacológicas é a redução da síntese de ácidos nucleicos em linfócitos T ativados e queratinócitos[262]. O metotrexato é um inibidor de enzimas de biossíntese de purinas, pirimidinas e tetraidrofolato, o que influencia os níveis séricos de adenosina. É um antagonista do folato, levando a um bloqueio na síntese de DNA, principalmente em células de rápida divisão[262,263]. Acredita-se que metotrexato induz apoptose e deleção clonal das células T ativadas, supressão da biossíntese de purinas e inibição de citocinas inflamatórias e de moléculas de adesão[264].

O uso do metrotexato foi descontinuado no tratamento da psoríase por conta da excessiva toxicidade e efeitos colaterais. Dentre os efeitos mais importantes, a imunossupressão era o efeito mais preocupante, visto que aumentava o risco de infecções. Função hepática alterada e leucopenia (pela supressão da medula óssea) acompanhavam o pacote de efeitos colaterais causados pelo uso frequente de metotrexato. O metotrexato tem contraindicação absoluta em casos de gestação, lactação e concepção (homens e mulheres), insuficiência hepática e renal graves, síndromes de imunodeficiência, discrasias sanguíneas (hipoplasia medular, leucopenia, trombocitopenia ou anemia)[16].

A acitretina é um fármaco derivado da vitamina A, que atua reduzindo a descamação da pele e induz diferenciação celular. Ela pertence ao grupo dos retinóides e é frequentemente prescrita na forma oral para pacientes com psoríase (10 mg a 25 mg/dia)[262]. O mecanismo de ação ainda não está bem esclarecido, mas é sabido que os retinóides ligam-se em receptores nucleares e alteram a expressão

de vários genes. Seu principal efeito é modulação da proliferação e diferenciação das células da epiderme. Na derme, a acitretina inibe a migração de glóbulos brancos para a epiderme e reduz em aproximadamente 65% os linfócitos T CD25 nas lesões[262].

Dentre os efeitos colaterais mais importantes da acitretina está a teratogenicidade, entretanto, esse medicamento é o agente sistêmico mais seguro para tratamentos a longo prazo. Hiperlipidêmia e toxicidade hepática podem ser recorrentes se o uso for indiscriminado. A acitretina reduz a ocorrência de cânceres cutâneos e é utilizada na quimioprofilaxia em pacientes que tenham desenvolvido carcinomas de pele[253]. Este medicamento é totalmente contraindicado para gestantes, no período de lactação, pacientes com insuficiência hepatica ou renal graves, quadro de hipertrigliceridemia grave e etilismo[16].

Outro imunossupressor de uso oral muito utilizado no tratamento da psoríase é a ciclosporina, um fármaco imunossupressor inibidor da calcineurina, um mediador da síntese de interleucinas, como por exemplo, interleucina 2[265,266]. Extraída de um fungo chamado *Tolypocladium inflatum*, consegue atuar na diminuição da secreção de citocinas pró inflamatórias. Esse fármaco foi desenvolvido e aprovado para prevenção e rejeição de órgãos transplantados. Atualmente, seu papel na terapia da psoríase já está bem estabelecido, exercendo efeito inibitório sobre a ativação dos linfócitos T. Após a ingestão da droga, o agente liga-se a uma imunofilina denominada ciclofilina, formando um complexo que inibe a enzima calcineurina. Esse bloqueio inibe o sinal de transdução celular que por fim inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-2 e IFN-γ. A diminuição dos fatores pro inflamatórios consequentemente reduzem a ativação de linfócitos T, estes sensíveis a ação da ciclosporina[267].

A ciclosporina é uma das substâncias mais rápidas e eficazes na terapia da psoríase em placas moderada a grave em adultos. Sua associação com acitretina e metotrexato era muito recorrente entre os dermatologistas, o que permitia doses menores com maiores chances de eficácia. A combinação de ciclosporina com metotrexato aumentava o efeito terapêutico e minimizava os efeitos adversos que eram produzidos pelo o uso persistente de um único agente. No controle de exarcebações agudas, a associação medicamentosa era muito útil para conter a proliferação queratinócita[268]. Aydin et al[269] conduziram um estudo com 20 pacientes portadores de psoríase em placas, onde os mesmos foram tratados com a combinação de ciclosporina 3,5 mg/kg/dia em duas doses iguais e metotrexato 10 mg

intramuscular como dose única semanalmente. Em aproximadamente 9 semanas a melhora das lesões já eram significativa em 70% dos participantes da pesquisa e em determinados pacientes a resposta ao tratamento foi de imediato[269]. Já a associação feita entre a ciclosporina e a acitretina é realizada com a intenção de minimizar o alastramento das lesões malignas que ocorrem a partir dos efeitos adversos da ciclosporina.

Entretanto, a ciclosporina possui diversas contraindicações, tais como: gravidez e lactação, insuficiência renal, disfunção hepatica, hipertensão, infecções não controladas, doenças malignas, uso concomitante com fototerapia, uso concomitante com agentes imunossupressores, retinoides ou uso prévio, em longo prazo, de metotrexato[49,250]. As medicações sistêmicas têm indicações limitadas, principalmente na infância e durante a gestação, devido aos efeitos cumulativos das drogas, à baixa aceitação e ao risco de teratogenicidade[215]. O uso desses fármacos pode causar imunossupressão severa do paciente, levando a infecções oportunistas, podendo ser necessária a hospitalização, o que consequentemente gera aumento dos custos do tratamento[250,49].

1.1.4.6.3 Compostos Biológicos

Os medicamentos mais sofisticados atualmente disponíveis para tratar psoríase são compostos biológicos, a maioria deles são anticorpos anticitocinas, principalmente anti-TNF, anti-IL-23, anti- IL-17 e anti-IL-12[219,241]. A indicação para o uso se dá quando o paciente já possui idade superior a 18 anos, quando as terapias medicamentosas clássicas se mostrarem ineficazes ou não toleradas e para pacientes com incapacidade física devido a artrite psoriática, porém estes medicamentos têm custo elevado e muitas vezes ainda estão em fase de desenvolvimento. Estes compostos necessitam ser administrados por via injetável, seja por via subcutânea ou intramuscular, pois são proteínas que se administradas por via oral serão digeridas.

Os primeiros produtos biológicos aprovados para tratar psoríase (efalizumab e alefacept) foram dirigidos principalmente contra receptores envolvidos na transmigração ou ativação de células T. Mais tarde, foram lançados o adalimumabe para neutralizar citocinas, tais como o TNF liberado por células Th1 e Th17 e posteriormente, o golimumabe e certolizumabe ampliaram o espectro deste grupo de

medicamentos anti-TNF, sendo aprovados em princípio para o tratamento da psoríase artropática[270,271].

O adalimumabe é um anticorpo monoclonal anti-TNF e foi o primeiro anticorpo monoclonal que veio ao encontro do tratamento da psoríase, desenvolvido pela primeira vez em 2002 na Alemanha[16,272]. Anos posteriores outros nomes apareceram no mercado, tais como: etanercept[273] em 2004, infliximab[274] em 2006 e certolizumab[275] em 2018. Atualmente[16], o etanercept é o único biológico aprovado para o uso em pacientes pediátricos (menores de 17 anos) e esta recomendado como primeira etapa de segunda linha após falha o tratamento tradicional. O bloqueio da produção de TNF ajuda a interromper o ciclo inflamatório da doença psoriática[276]. Infelizmente, da mesma forma que os imunossupressores clássicos, estes medicamentos também estão ligados a certas preocupações quanto à segurança. Apareceram registros de infecções graves e reativação de infecções, principalmente do trato respiratório superior ou tuberculose em pacientes usando antagonistas de TNF para o tratamento da artrite reumatoide e doença de Crohn [277,278]. Pacientes com psoríase tratados com bloqueadores de TNF parecem ter um risco aumentado de câncer de pele não melanoma[279].

O ustekinumabe é um composto biológico aprovado mais recentemente para tratar psoríase que tem alvo sobre citocinas diferentes do TNF. É um anticorpo monoclonal dirigido contra a subunidade p40 presente na IL-23 e IL-12. Desta forma, o ustekinumabe pode inibir o desenvolvimento de respostas Th17 e Th1. Mais de 65% dos pacientes que receberam terapia anti-p40 com ustekinumabe apresentaram uma resposta significativa no PASI a partir da 12ª semana[280]. Infecções graves, malignidades e efeitos adversos cardiovasculares já foram relatados em estudos avaliando compostos biológicos neutralizadores da subunidade p40[281].

As terapias direcionadas anti IL-23 são as mais estudadas recentemente, uma vez que as pesquisas científicas têm mostrado que a IL-23 que induz os linfócitos Th17 a secretar a IL-17, que em nível de queratinócitos aumenta a liberação de quimiocinas e TNF. O primeiro anticorpo monoclonal anti -IL23 foi o ustekinumabe desenvolvido na Suiça[280]. Posteriormente, a indústria farmacêutica colocou no mercado o guselkumab em 2017, que foi o primeiro inibidor da IL-23 aprovado para o tratamento da psoríase em placas e em 2018 foi aprovado para tratamentode artrite psoriática[282], o tildrakizumabe[283] em 2018 e risankizumabe[284] em 2019.

A estratégia do bloqueio da IL-17 em pacientes com psoríase parece ser a mais promissora, pois cada vez mais têm sido evidenciado que esta é a principal citocina efetora na patogênese da doença. Nas lesões psoriáticas existem níveis elevados de IL-17 que por sua vez, na resposta inflamatória, traduz-se no acúmulo de neutrófilos, linfócitos e fatores pró-inflamatórios nas lesões. Atualdois anticorpos monoclonais são capazes de atenuar o eixo da IL-17: o secucinumab[285] desenvolvido em 2015 na Suiça e ixekizumabe[286] desenvolvido em 2017 nos Estados Unidos (EUA). Segundo o CONITEC, o secucinumab é indicado na segunda etapa após a falha, intolerância ou contraindicação ao adalimumabe (antiTNF)[16]. O brodalumab atua diferente, pois boqueia o receptor da IL-17, diminuindo assim a biossinalização mediada pela Il-17[287]. É indicado no tratamento da psoríase em placas na forma moderada a crônica. Apesar de ser um tratamento moderno com diversas possibilidades, esse tratamento pode acompanhar uma serie de efeitos colaterais, tais como: ocorrência de infecções, reações infusionais, reações hematológicas, neurológicas, gastrointestinais, cardiovasculares, entre outros[288].

Em suma, os riscos associados ao tratamento da psoríase com medicamentos biológicos incluem: aumento do risco de infecção no trato urinário, gastrintestinal, infecção no trato respiratório superior e inferior, peles e outros tecidos moles, infecções herpéticas e artrite séptica[289]. Por exemplo, pacientes tratados com inibidores da IL-17 tem risco aumentado de infecção por *Candida albicans*, ao passo que, pessoas com déficit em IL-23 são susceptíveis a Salmonella[290]. Shalom et al[291] observou em seu trabalho que o uso de produtos biológicos em combinação com o metotrexato, pode aumentar o risco de reativação de uma infecção por vários vírus, tendo como exemplo o vírus *Herpes zoster*[291]. A tuberculose é uma das condições mais prevalentes em pacientes em tratamento com biológicos. Esses pacientes costumam aparecer com diagnostico de tuberculose extrapulmonar e disseminada precocemente ou tardiamente podendo levar ao óbito[49].

1.1.5 Ácido betulínico

AB ou ácido (3β) -3-hidroxi-lup-20 (29) -en-28-óico (Figura 39) é uma molécula triterpênica pentacíclica natural do tipo lupano. AB é biossintetizado a partir do isopreno através de vias metabólicas que formam lupeol (R = CH3), betulina (R =

CH2OH) e AB (R = COOH) através de reações catalizadas por oxidases C-28, que são encontradas em certas plantas. Os lupanos compartilham características estruturais com os esteróis (ambos possuem estrutura molecular cíclica terpenoide). Evidências científicas sugerem que ambos compartilhem também múltiplos efeitos fisiológicos, metabólicos e defensivos (antimicrobianos) nas plantas. Estas estruturas moleculares sofrem oxidações adicionais produzindo metabólitos ainda mais potentes[14,292].

Em princípio, AB tem sido isolado de uma série de espécies vegetais, incluindo *Zizyphus joazeiro*[293], *Syzigium clariflorum*[294], *Dillenia indic*a[2] entre outras. Com exceções, AB geralmente é responsável por> 0,1% do peso seco dessas plantas, o que não é suficiente para atender à crescente demanda por ele[14,15,295]. A casca da bétula (*Betulla spp*.) e outros certos gêneros vegetais produzem betulina abundantemente (> 30%) (BA ≤ 2,5%)[14,292]. Comercialmente, AB é geralmente obtido a partir da oxidação de betulina[14]. O número atual de artigos científicos depositados no Pubmed, rastreados utilizando o termo “betulinic acid”, é notável (> 1430 artigos em 2020 por PubMed).

Figura 39 – Estrutura da molécula do ácido betulínico (AB)

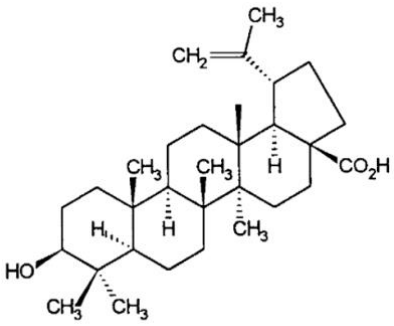


Figura 5. Estrutura química do ácido betulínico.
Fonte: Cho & Gottieb, 2001[296].

O AB (Figura 39) tem sido testado por uma série de efeitos farmacológicos. A vasta maioria dos artigos publicados reconhece sua atividade citotóxica/antitumoral e antiviral. Ainda existem artigos que sugerem atividade anti-flamatória, antidiabética, anti-hiperlipidêmica e outras atividades, como por exemplo efeito benéfico para tratar doenças autoimunes.

1.1.5.1 Citotoxicidade e atividade antitumoral de AB

Desde 1970, muitos artigos têm surgido na literatura estando relacionados com a investigação de AB, nos quais a citotoxicidade têm sido um dos efeitos mais importantes e amplamente estudados na farmacologia do mesmo. Apesar de extensas investigações, o alvo molecular de AB ainda não foi identificado. Especulações sobre os possíveis alvos foram baseadas em alterações das vias das proteínas reguladoras de apoptose da família Bcl-2 e NF-κB. Em estudos nos quais o AB foi testado contra linfoma de células B, ele modulou a função de células B ativadas e teve atividade antiangiogênica[14,297,298].

Existem informações sobre a atividade de AB e seus derivados, tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo*. Parece que, na realidade, pequenas mudanças na estrutura química podem levar a diferenças significativas na especificidade e nos mecanismos de ação de AB. Os estudos mais recentes indicam que os principais mecanismos envolvidos são indução de apoptose e inibição de cinases, ambas acompanhadas por um valioso efeito antioxidante. É possível dizer que AB foi capaz de reduzir muitos dos indicadores de toxicidade de agentes antitumorais, tais como a doxorrubicina, que é conhecida por ter forte atividade cardiotóxica, porque ela causa geração de ROS, produção de citocinas inflamatórias, como a interleucina IL-12 e TNF, alteração do potencial de membrana mitocondrial e várias alterações morfológicas e histoquímicas. Todos estes parâmetros foram inibidos pelo AB[14,299].

1.1.5.2 Atividade antiviral de AB

A maioria absoluta dos artigos originais e revisões recentes que tratam da atividade antiviral de AB têm lidado com sua atividade anti-HIV. AB atua contra o HIV impedindo a clivagem de um peptídeo que forma o capsídeo viral, a proteína Gag. Assim, AB impede a maturação viral. Isso faz com que a célula hospedeira libere vírions sem capacidade infecciosa. Contudo, já foi demonstrado que a eficácia de AB sobre a infecção por HIV é influenciada por vários polimorfismos da proteína Gag. O efeito de AB contra o vírus do herpes, especialmente contra a cepa clínica HSV-1, é um outro exemplo de atividade antiviral de AB. Estes estudos foram realizados

principalmente *in vitro*. Foi demonstrado que após incubar o vírus com AB, tanto as cepas sensíveis quanto as resistentes ao aciclovir perderam sua infectividade[14,292,300,301].

1.1.5.3 Atividade antiinflamatória de AB

Os efeitos anti-inflamatórios do ácido betulínico têm sido extensivamente estudados. Em um estudo anterior, Wang et al[302] procuraram explorar os possíveis efeitos do ácido betulínico sobre a nefropatia diabética, utilizando rins de ratos machos Sprague-Dawley com diabetes induzida pela estreptozotocina e células mesangiais glomerulares em cultura. Os autores concluíram que o ácido betulínico inibiu a ativação de NF-κβ, prevenindo assim a fibrose renal diabética em ratos tratados com 20 mg/kg diariamente por 8 semanas por via intragástrica[302].

Outro estudo do mesmo ano é corroborativo fornecendo informações importantes sobre o mecanismo anti-inflamatório do ácido betulínico. Kim et al[303] avaliaram os efeitos anti-flamatórios de um extrato obtido das folhas de Diospyros kaki Thunb, rica em ácido betulínico, além de testar o composto isolado. Este estudo demonstrou um efeito inibitório do ácido betulinico (5 - 80 µM) sobre a produção de mediadores em enzimas pró-inflamatórias de macrófagos RAW 264.7 em cultura estimulados com lipopolissacarídeo. Os resultados deste estudo mostraram que o ácido betulínico induziu translocação do fator nuclear Nrf2, assim inibindo a ativação do NF-κβ. Porém, os dados demonstraram ainda, que as concentrações testadas mais altas (40 e 80 µM), causaram redução da viabilidade de macrófagos RAW 246.7 (cerca de 20 e 35%, respectivamente)[303].

Em outro estudo anterior, compostos ativos foram isolados da espécie Alphitonia petriei (Rhamnaceae), nominalmente o ácido emólico, alfitólico e ácido betulínico. Os autores relataram que, com exceção do ácido emólico, os demais ácidos testados exibiram potente atividade anti-inflamatória, porém também foi demonstrada alguma citotoxicidade sobre macrófagos RAW 264.7 estimulados por lipopolissacarídeo. O ácido betulínico reduziu as concentrações de óxido nítrico em concentração inibitória 50 (CI50) de 8,3 ± 1,0 µM e fator de necrose tumoral alfa (TNFα) em CI50 de 23,5 ± 3,7 µM, ao passo que houve citotoxicidade sobre os

macrófagos em CI50 de 29,1 ± 4,4 µM. O índice terapêutico calculado em comparação ao efeito sobre o óxido nítrico foi de 3,5[304].

1.1.5.4 Atividade antidiabética

A atividade antidiabética de AB foi descrita contra o diabetes mellitus tipo 2[305]. Com base em diferentes estudos, in vitro e in vivo, o mecanismo de ação de AB foi inferido, incluindo ações sobre a captação de glicose, a resistência à insulina, a sensibilidade à insulina e a biossíntese de glicogênio. Esses aspectos foram revisados recentemente , e nenhum novo item substancial de informação foi encontrado nos dados mais recentes da literatura[300].

1.1.5.5 Atividade anti-hiperlipidêmica

Quando testado em camundongos obesos, AB foi administrado na água dos bebedouros por 15 dias na concentração de 50 mg/L. AB causou diminuição dos níveis séricos de triglicerídeos e colesterol total em animais submetidos a uma dieta rica em gordura. Além dos efeitos sobre a lipidemia dos animais, AB causou diminuição do peso corporal dos camundongos. AB também foi capaz de reduzir a lipogênese e o acúmulo de lipídeos abdominais, o que foi observado durante vários experimentos *in vitro* e *in vivo*[14,306,307].

1.1.5.6 Outras atividades

Além dos efeitos citados do AB, estas moléculas têm sido alvo de outros tipos de estudos e, neste momento vale revisar os dois artigos disponíveis na literatura que testaram o AB e um de seus derivados químicos em modelos animais que mimetizam doenças autoimunes de humanos.

No primeiro artigo, os cientistas lançaram um estudo no qual compararam o efeito de um derivado químico de AB, o qual chamaram de SH479 (20 mg/kg/dia por via intraperitonial) com o efeito de um veículo à base de dimetilsulfóxico em camundongos BALB/C57BL/6 (n = 8) tratados por 28 dias e submetidos a um modelo de encefalomielite autoimune experimental. Este modelo compartilha muitas

semelhanças com a esclerose múltipla de humanos. Os resultados mostraram que SH479 melhorou os sinais clínicos e histológicos dos camundongos, regulando o equilíbrio Th17/Treg. O SH479 reduziu, de forma dependente da dose os fatores pró-inflamatórios de linfócitos esplênicos e aumentou os fatores anti-inflamatórios. Além disso, SH479 inibiu especificamente a viabilidade dos linfócitos esplênicos dos camundongos com encefalomielite, mas não a viabilidade dos linfócitos esplênicos normais. Em nível molecular, SH479 inibiu a diferenciação de linfócitos Th17, regulando o transdutor de sinal e o ativador da transcrição-3 (STAT3), a fosforilação, a atividade de ligação ao DNA e o recrutamento para o promotor IL-17A nas células T CD41. SH479 promoveu a via de sinalização de STAT5 e inibiu a via de sinalização do NF-kB. Os dados sugeriram SH479 como um candidato potencial para o desenvolvimento de um novo medicamento para doenças autoimunes[295].

Já no segundo artigo, os pesquisadores identificaram que AB suprime a resposta Th17 e melhora a inflamação da pele de camundongos com lesão psoriasiformes tratados por via oral com metrotexato (1,0 mg/kg; dose baixa de AB (25mg/kg); doses altas de AB (50mg/Kg). Os animais foram submetidos ao modelo de lesões psoriasiformes induzidas por imiquimode. Os resultados deste estudo sugeriram que o AB reduziu a frequência de células Tγδ que expressam IL-17 e também diminuiu a produção de IL-17 por células $TCD4^{+}$ *in vitro*. O AB suprimiu a produção *in vivo* e *in vitro* de IFN-γ, uma citocina Th1 típica que está amplamente envolvida em várias imunopatologias, incluindo a psoríase. AB inibiu as respostas Th1 e Th17. Desta forma, os pesquisadores concluiram que o AB inibe a proliferação de células T *in vitro* em concentrações que não causam citotoxicidade, sugerindo que o AB é um inibidor de NFκB. Assim, o AB poderia ser usado como um potencial novo imunossupressor para o tratamento da psoríase humana em estudos futuros[11].

1.1.6 Modelos experimentais de lesões psoriasiformes em animais

Os estudos para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da psoríase historicamente encontraram dificuldades, devido à falta de modelos experimentais que recapitulassem a doença como ocorre nos humanos. Daí a escassez de estudos nesta área até os anos 80-90. Sempre foi considerado complicado extrapolar a partir das culturas de células para a situação *in vivo*, pois os

queratinócitos em cultura rapidamente tornam-se hiperproliferativos. O fato de a psoríase ser uma doença que acomete mais de um sistema anatômico simultaneamente, sendo nas formas cutâneas acometido o sistema tegumentar juntamente com uma desordem do sistema imunológico e até o sistema nervoso, tornava muito difícil realizar investigações utilizando sistemas *in vitro*. Avanços no campo experimental foram alcançados quando foi demonstrado que a injeção de células T ativadas podem provocar hiperplasia epidermal em pele pré-psoriática enxertada em camundongos imunodeficientes. Outras abordagens têm usado modelos de roedores equivalentes em termos de pele que, embora não sejam capazes de recapitular completamente o meio celular característico das lesões psoriáticas, podem estratificar a pele[5,308].

O estudo de Nickoloff e Wrone-Smith rompeu uma barreira realçando a possibilidade de indução experimental de lesões psoriáticas em roedores. Mesmo assim, a metodologia proposta ainda tem sido considerada complexa devido aos custos e a dificuldade da manipulação de animais imunodeficientes. Estes experimentos são trabalhosos, caros e requerem considerável experiência e habilidades técnicas. Além disso, a falta de um sistema imune funcional neste modelo de xenoenxerto limita a sua utilização no estudo de abordagens de intervenções imunes[309].

Durante pelo menos uma década, os estudos pré-clínicos realizados para o desenvolvimento de estudos para descoberta de novos fármacos utilizaram outras abordagens, que embora não fossem capazes de recapitular completamente o meio celular característico das lesões psoriáticas, induziam estratificação da pele e paraceratose[310]. Nesse tempo, a maioria dos estudos pré-clínicos utilizavam o modelo de lesões psoriasiformes induzidas por irradiação ultravioleta. Neste modelo não era induzido um processo imunomediado, apenas aumento da paraceratose. O dorso depilado ou a cauda de roedores era irradiado por cerca de 20 min (1,5 J/cm^2) a uma distância vertical de 20 cm com lâmpadas ultravioleta para induzir lesões fotonecróticas[308].

Em 2009, van der Fits et al aprimoraram e apresentaram o modelo de lesões psoriasiformes induzidas por imiquimode. Muitas das limitações dos modelos anteriores foram contornadas e atualmente o modelo de indução de lesões psoriasiformes feito com a administração sobre a pele do fármaco imiquimode em

camundongos tem sido considerado entre os mais vantajosos. O imiquimode é um ligante de receptores do tipo *toll-like* (TLR7 e TLR8), sendo um potente ativador imune. É utilizado em princípio para o tratamento sobre a pele de verrugas genitais e perianais causadas pelo vírus do papiloma humano[311]. As indicações clínicas têm sido adicionalmente ampliadas para incluir o tratamento de outras alterações da pele associada ao vírus, bem como lesões cutâneas pré-cancerosas, tais como queratoses actínicas e carcinomas de células basais superficiais[312,313]. Inicialmente, foi observado que o fármaco causava exacerbação da psoríase em pacientes com psoríase bem controlada, durante o tratamento tópico de queratoses actínicas e carcinomas de células basais superficiais[9]. Foi observado também que a exacerbação ocorria em ambas a área tratada e, interessantemente, também em locais distantes da pele previamente afetada[314]. Através de testes da administração do imiquimode em roedores foi observado que o fármaco leva à indução de lesões psoriasiformes e, que a aplicação de imiquimode na pele de camundongos leva a um influxo (infiltração) rápido de células dendríticas plasmocitoides, atividade do tipo I do interferon alfa e inflamação mediada pelo eixo de citocinas IL 23/ IL 17, todas estas características comuns da doença nos humanos[9,106,315] . Por todos estes motivos, o modelo tem sido considerado entre os melhores para as pesquisas que visam o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento das lesões crônicas causadas pela psoríase.

O modelo de indução de lesões psoriasiformes realizado por meio da administração sobre a pele do fármaco imiquimode em camundongos tem sido considerado entre os mais vantajosos atualmente. O imiquimode é um potente ativador imune, ativando macrófagos, DCs, vias do transdutor de sinal e ativador da proteína de transcrição (STAT)1 e STAT3, sinalização de NF-κB e a produção de IL-23/IL-17[316]. Nas primeiras 12 horas após a aplicação de imiquimode, o fármaco causa migração de células de Langerhans e 24 horas após, é possível observar formação de abscessos, infiltração de neutrófilos, proliferação de queratinócitos e leucócitos, alterações na expressão de queratina e inflamação mediada pelo eixo de citocinas IL 23/IL 17, todas estas características comuns da doença nos humanos[8,316–318]. A IL-23 é induzida em 24 horas e continua a aumentar após a aplicação diária atingindo um pico em torno de 48-72 h. Um aumento da expressão de membros da família de IL-17 e IL-22 também pode ser observado já nas primeiras 24 h depois da aplicação e é dependente de IL-23. Tanto IL-17 como IL-22 agem sobre queratinócitos induzindo

peptídeos antimicrobianos, citocinas e quimiocinas, atuando diretamente nos queratinócitos para induzir hiperproliferação e hiperplasia epidérmica.

Neste modelo, a aplicação diária de imiquimode em camundongos induz a inflamação local e sistêmica. Os eventos inflamatórios deste modelo refletem a indução de características histológicas semelhantes à psoríase, ativação de vias de sinalização pró-inflamatórias e o recrutamento de infiltrados celulares semelhantes. Uma limitação deste modelo é que o tratamento prolongado não é tolerado. Os camundongos tratados topicamente desenvolvem uma resposta inflamatória sistêmica robusta e são particularmente propensos à desidratação e morte[8,319].

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia, segurança e mecanismo de ação de AB aplicado sobre a pele de camundongos com lesões psoriasiformes induzidas por imiquimode.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a severidade das lesões macroscopicamente e microscopicamente em camundongos com lesões psoriasiformes não tratados, tratados com clobetasol ou AB;
- Quantificar o número de linfócitos e granulócitos na região das papilas dérmicas em biópsias das lesões dos animais de diferentes grupos;
- Determinar o tempo necessário para alcançar completa limpeza da pele nos animais de diferentes grupos;
- Medir a concentração das citocinas TNF, IL-17A, IFN-γ, IL-10 e TGF-β em amostras de soro dos animais de diferentes grupos;
- Avaliar a influência do tratamento experimental comparativamente aos grupos-controle sobre a fosforilação da Akt, ERK1 e ERK2;
- Avaliar a segurança do tratamento experimental por meio de um monitoramento da alteração do peso corporal, consumos de água, consumo de ração, padrão de deambulação, pesos dos órgãos, contagem de eritrócitos e leucócitos por mm^3 de sangue e concentração sérica de glicose, colesterol, triglicerídeos, proteínas totais, uréia, atividade da alanina e aspartato-aminotransferase (ALT e AST).

3. MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Este estudo refere-se a um estudo experimental pré-clínico.

3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Para o desenvolvimento deste estudo serão utilizados os seguintes materiais e equipamentos:

- Ácido betulínico (Cat. n. 91466 Merck, EUA)
- Ácido etilenodiaminotetracético EDTA (Sigma-Aldrich, EUA)
- Agitador magnético, vortexador e centrífuga (Quimis®, Brasil)
- Anticorpos primários anti-Akt, anti-fosfo Akt, anti-COX-2, anti-STAT, anti-fosfo STAT, anti-actina e anticorpos secundários conjugados (Santa Cruz, EUA)
- Anticorpos anti-fosfo-Akt1 + 2 + 3 (Santa Cruz biotecnologia (sc) -33437), anti-Akt, anti-fosfo-ERK1 + 2 (sc-23759-R), anti-ERK1 + 2 (M5670), anti-actina (sc-7210) e anticorpo secundário conjugado à HRP.
- Balança analítica (Balança Sartorius. AUY 220, Japão)
- Banho-maria (Fanem, Brasil)
- Bulbo repipetador automático (Shimadzu, Brasil)
- Capela de exaustão
- Contador automatizado de células (Thermo Fisher)
- Centrífuga de microtubos (Eppendorf, Alemanha)
- Centrífuga refrigerada (Solab Científica-405, Brasil)
- Citrato trissódico (Sigma-Aldrich, EUA)
- Clobetasol (C8037, Merck, EUA)
- Coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich, EUA)
- Corante Panótico (Interlab, Brasil)
- Criotubos (Sigma-Aldrich, EUA)
- Etanol (Vetec®, EUA)
- Tubos tipo Eppendorf (BD, Brasil)

- Gaiolas para animais (SoftLab, Brasil)
- Imiquimode (Aldara, 3M Pharmaceuticals)
- Kit de aminotransferase pirúvica (ALT) e oxalacética (AST) (Labtest, Brasil)
- Kit de dosagem de proteínas séricas totais Ref 99 (Labtest, Brasil)
- Kit de coloração Panótico (Laborclin, Brasil)
- Kits de Elisa para dosagem de citocinas (Thermo Fisher)
- Kit para detecção de quimioluminescência (Amersham®)
- Lâminas de vidro
- Leitor de microplacas por espectrofotometria (Quimis®, Brasil),(Perlong DNM-9602).
- Microscópio óptico (CX4, Olympus, Japão)
- Microsoft Excel (Washington, EUA)
- Microtubos (Axygen, EUA)
- Micropipetas (Shimadzu, Brasil)
- Micropipeta multicanal (Shimadzu, Brasil)
- Placas cultura 96 poços (Prolab, Brasil)
- Propionato de Clobetasol (Supelco, Cat. C8037, EUA)
- Proveta graduada, capilares de vidro e lâminas de vidro (Dist, Brasil)
- Reagentes de Western Blot (Sigma-Aldrich, EUA)
- Software Graph Pad Prism® (EUA)
- Salina (ADV®, Brasil)
- Sais/ácidos e bases (substâncias reagentes básicas de laboratório)
- Sistemas de imagem iBright Western Blot (Thermo Fisher).
- Software Excel (Microsolt, EUA)
- Software GraphPad Prism 6 (San Diego, EUA)
- Solução de tampão fosfato-salina (PBS)
- Solução de hematoxilina (Mayer’s)
- Soluções Eosina (Mayer’s)
- Tabletes tampão fosfato-salina (Prolab, Brasil)
- Tubos capilares graduadas (Prolab, Brasil)
- Violeta genciana (ADV®, Brasil)
- Xileno
- Pratos e prateleiras de vidro (ou metal)

3.3 ANIMAIS

Foi utilizada uma espécie de roedores, sendo eles camundongos fêmeas da espécie da classe *Mammalia*; ordem *Rodentia*; Família *Muridae*; Gênero *Mus*; Espécie *Mus musculus*; linhagem Swiss albino, procedentes do biotério setorial do Laboratório de Bioquímica Experimental da Universidade Federal de Santa Catarina (LABIOEX) de acordo com as Diretrizes Nacionais dos EUA para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório e a aprovação pelo comitê de ética da Universidade do Sul de Santa Catarina. Os animais foram adultos jovens, com idade de aproximadamente 60 dias e pesando cerca de 50 gramas. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Neurociências Experimental (LaNEX) da UNISUL, *campus* Pedra Branca, Palhoça, SC em condições controladas (ciclo claro e escuro de 12 horas, temperatura entre 22 ± 2ºC, com aproximadamente 60% de umidade relativa do ar, recebendo ração laboratorial e água *ad libitum).* Ao final do estudo, foi induzida a morte indolor assistida, conforme preconizado pelas Diretrizes Nacionais do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal **(**CONCEA – Brasil)[236,320].

3.4 DETERMINAÇÃO DA DOSE DE ÁCIDO BETULÍNICO

O AB utilizado neste estudo foi proveniente da Merck (91466). Inicialmente, a dose máxima segura aparente de AB foi determinada para aplicação sobre a pele de animais com lesões psoriasiformes (pele com função de barreira comprometida). As lesões foram induzidas pelo imiquimode (Aldara, 3M Pharmaceuticals) em uma área depilada (4 cm^2) das costas dos camundongos (dorso), conforme descrito anteriormente[8]. Nesse momento, a melhor concentração de AB foi determinada através de um experimento piloto, no qual a cada 24 horas por cinco dias o imiquimode (62,5 mg/4 cm^2) era aplicado sobre a pele e, 2 horas depois, os tratamentos eram aplicados. Os camundongos foram alocados em dois grupos e receberam AB na concentração de 1,0 ou 1,5 mg/mL (n = 2/grupo). Dessa forma, a concentração de 0,5 mg/mL de AB foi determinada como a concentração mais apropriada, pois 1,0 ou 1,5 mg/mL de AB mais as doses de imiquimode causaram mortalidade nos animais.

Tabela 2 - Sinais de toxicidade em camundongos fêmeas tratadas topicamente a cada 24h durante 05 dias com AB

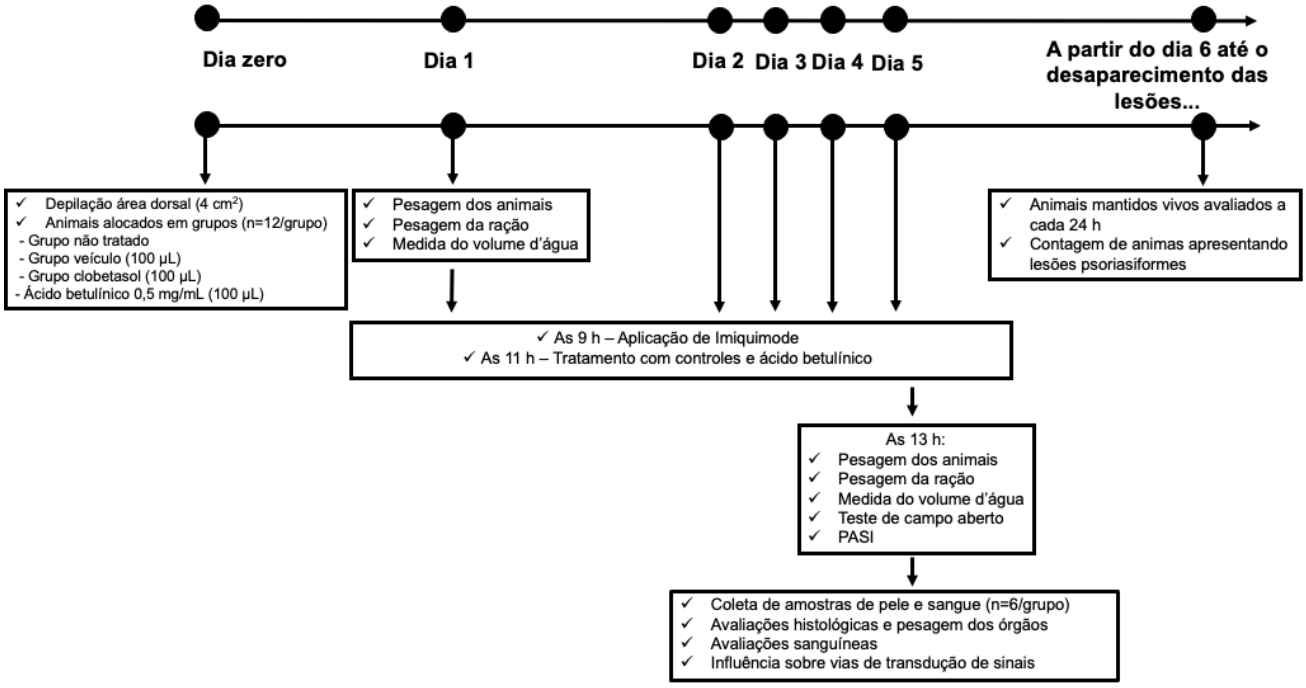
Grupos	Sinais de toxicidade	Mortalidade
1.0 mg/mL ácido betulínico (100 µL)	Aumento da perda de peso (7 ± 3 g) Letargia Piloereção Calafrios / convulsões Diarréia. Mortalidade Consumo de ração reduzido (30%)	50%
1.5 mg/mL ácido betulínico (100 µL)	Aumento da perda de peso (12 ± 3 g) Letargia. Piloereção Calafrios/convulsões Diarréia. Mortalidade Consumo de ração reduzido (50%)	50%

O volume de cada dose foi de 100 µL, suficiente para cobrir toda a área lesada. Os animais foram monitorizados diariamente durante duas horas após a administração de AB. Os indicadores de toxicidade incluíram mortalidade, piloereção, alterações comportamentais (letargia, calafrios, convulsões diarreia), alteração de peso, consumo de água e ração[321].

3.5 DELINEAMENTO DO ESTUDO

No primeiro momento os animais foram alocados em grupos (n = 12/grupo). Os animais foram alocados em 4 grupos: 1) não tratado, 2) veículo, 3) tratado com clobetasol e 4) tratado com AB diariamente por cinco dias. O grupo veículo foi tratado com uma solução aquosa de glicerol a 10% (100 µL/cada volume de dose). O grupo controle positivo foi tratado com clobetasol (0,05 mg/mL) (Sigma-Aldrich Cat. C8037) e o grupo AB foi tratado com 0,5 mg/mL de AB, mesma dose utilizada anteriormente. Os animais foram alojados em duas gaiolas com seis camundongos cada. Após, os animais foram pesados e depilados com creme depilatório. Em seguida, foi realizado a pesagem da ração, quantificado volume de água e realizado o teste de campo aberto (Figura 40).

Figura 40 – Delineamento do estudo (protocolo experimental)



Ao chegar no laboratório, diariamente era verificado a mortalidade dos animais. Em seguida e a cada 24 horas durante os cinco dias (dia 1 ao dia 5). O imiquimode (Aldara, 3 M Pharmaceuticals) era aplicado sobre a pele (exceto no grupo não tratado) em uma área depilada (4 cm^2) do dorso dos camundongos, conforme descrito na literatura[8]. Depois de duas horas, os tratamentos eram aplicados sobre a pele e os camundongos eram monitorados por mais duas horas após os tratamentos. No dia 5, duas horas após o último tratamento, todas as avaliações possíveis de serem realizadas com os animais vivos foram feitas (n = 12/grupo): PASI[8] e cálculo da alteração de peso, consumo de água, consumo de ração e teste de campo aberto[322]. Posteriormente, foram coletadas amostras de sangue e pele de seis camundongos/grupo, enquanto seis camundongos/grupo foram mantidos vivos para determinar o tempo necessário para eliminação completa da lesão sobre a pele[68]. Os indicadores de toxicidade incluíram mortalidade, piloereção, mudanças comportamentais e outras mudanças aparentes, alteração de peso, consumo de água e ração.

3.6 ENSAIOS, TESTES E TÉCNICAS

3.6.1. Avaliação da severidade das lesões

A severidade das lesões por meio do PASI adaptada para camundongos, através da qual a área de pele afetada é sempre a mesma (não considerada no escore total)[8]. Trata-se de uma escala de pontuação visual que avalia o eritema, descamação e espessamento da pele e foram pontuados independentemente em uma escala de 0 a 4, na qual (0) significava nenhuma lesão; lesão leve (1); lesão moderado (2); lesão intensa (3); lesão muito intensa (4). A pontuação cumulativa serviu como uma medida da gravidade da inflamação em uma escala de 0 a 12, na qual 0 significava ausência de lesão, ao passo que 12 significava lesão em intensidade máxima. Para este estudo, a área foi de 4 cm^2 e para quantificar a severidade das lesões os resultados foram expressos por meio da média e desvio padrão obtidos da avaliação de 12 camundongos por grupo.

3.6.2 Ensaio de campo aberto

Possíveis efeitos sobre o padrão locomotor dos animais foram avaliados através do ensaio de campo aberto, do inglês *Open Field Test* realizado no dia um e no dia cinco, a contar do início do experimento com 12 animais. Cada animal era colocado em um dos cantos da arena de PVC 40 x 60 x 50 cm (altura x comprimento x largura) com o piso dividido em 16 quadrados iguais. O número de quadrados cruzados pelo animal (todas as patas). Era contabilizado o número de quadrantes que o animal percorria pelo período de 6 minutos. Os resultados destas avaliações foram expressos através da média e o desvio padrão[323].

3.6.3 Histologia

Amostras de pele de seis camundongos/grupo foram fixadas em formalina a 10% (24 h), embebidas em parafina, seccionadas verticalmente e coradas com hematoxilina e eosina[324]. As fatias foram examinadas em um microscópio Olympus CX41 com um software. Os parâmetros quantificados foram: acantose epidérmica

(triplicatas técnicas), utilizando um índice de severidade de acantose conforme descrito na literatura[325] e quantificação de linfócitos e granulócitos nas regiões das papilas dérmicas em 10 campos de microscópio (0,2 mm^2) por corte histológico[11].

Antes de iniciar o procedimento, os tecidos foram embebidos em parafina, seccionados a 3–5 µm, colocados em banho-maria, recolhidos em lâminas de vidro e colocados em escorregadores. Primeiramente foram colocadas as lâminas de vidro que seguram as seções de parafina nos racks de coloração. Foi limpado a parafina das amostras em três mudanças de xileno por 2 min por alteração. Após, foi inserido as amostras em etanol a 100% por 2 minutos; etanol a 95% por 2 minutos e etanol a 70% durante 2 minutos. Foi realizado a lavagem das lâminas em água corrente à temperatura ambiente por pelo menos 2 minutos e colocado as amostras em solução de hematoxilina por 3 minutos. Depois deste processo foi novamente lavado as lâminas em água corrente à temperatura ambiente por pelo menos 5 minutos e inserido as mesmas em solução de eosina durante 2 minutos e por último, foi limpado as amostras em três trocas de xileno por 2 minutos por alteração. As lâminas foram examinadas sob um microscópio Olympus CX41 com um software. Os parâmetros quantificados foram: (a) acantose (magnificação de 100x); foi quantificado usando um índice publicado anteriormente[325] e quantificado linfócitos e granulócitos (magnificação de 400x) em 10 campos de microscópio (0,2 mm^2) por lâmina[11].

3.6.4 Determinação do tempo para limpeza completa da pele

Seis animais por grupos foram mantidos vivos foram avaliados diariamente para detectar alguma aceleração no tempo necessário para as lesões desaparecerem, por meio de comparações com os grupos-controles onde o tempo de completa limpeza da pele (LCP) foi determinado através de uma contagem de camundongos com lesões cada 24 horas até que a pele de todos os camundongos atingisse LCP. Os dados foram plotados em sistemas de coordenadas cartesianas[2] (número de animais apresentando lesões versus dias após a interrupção do tratamento experimental) para gerar curvas; cada uma correspondendo a um tipo de tratamento (grupo de animais)[326].

3.6.5 Coleta e preparação do sangue e pesagem dos órgãos

Para as análises sanguíneas, a coleta de sangue foi realizada por via retro-orbital[327], tendo os animais sido submetidos a jejum de 6 h[328]. Para obtenção do soro necessário às análises bioquímicas, uma determinada quantidade de sangue era incubada em banho-maria a 37°C até ocorrer a coagulação. Imediatamente após, o sangue foi centrifugado em tubos cônicos por cerca de 10 min (5.000 *g*), sendo alíquotas de soro extraídas e criopreservadas[329,330]. Adicionalmente, alíquotas de sangue total contendo ácido etilenodiamino tetra-acético de sódio (Na EDTA) 1 mg/mL foram preparadas para as análises hematológicas (eritrócitos e leucócitos)[331]. Na sequência, foi realizada a morte indolor assistida dos animais[320]. Os órgãos foram lavados em salina, secos em papel absorventes e pesados imediatamente em balança analítica (Shimadzu), sendo dissecados os órgãos: fígados, pulmões, rins, corações, baços e pâncreas[332].

3.6.6 Dosagem de citocinas IL-17, IL-10, TNF, IFN-γ e TGF-β

Para a determinação sérica das citocinas TNF (Cat. 88-7324), IL-17A (Cat.88-7371), IFN-γ (Cat. 88-7314), IL-10 (Cat. 88-7105) e TGF-β (Cat. 88-8350) (Thermo Fisher) foram utilizado o método de ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA). Esta técnica baseia-se em reações antígeno-anticorpo que são identificadas por meio de reações enzimáticas e leitura em espectrofotômetro conforme sugerido pelo fabricante. As concentrações foram estimadas por interpolação a partir de curvas padrão e medidas a 450 nm em leitor de placas de 96 poços (Perlong DNM-9602).

3.6.7 Imunoeletroforese de proteínas (western blot)

Amostras de pele dorsal foram imersas em nitrogênio líquido, pulverizadas e imediatamente colocadas em tubos contendo tampão RIPA e incubadas em gelo por 30 min. Os tubos contendo os lisados foram centrifugados a 6.000 rpm por 20 min a 4° C e os sobrenadantes foram coletados. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford.

A separação eletroforética foi realizada usando 50 µg de proteína por poço em eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% (SDS-PAGE), executando em um aparelho de célula Mini-PROTEAN® Tetra sob uma fonte de alimentação PowerPac TM HC (ambos da Bio-Rad, CA, EUA). As proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA), bloqueada em 5% de leite desnatado (preparado em tampão TBS-T, pH 7,4; concentração em mmol/L: 20 Tris-HCl , 137 NaCl, 0,1% de Tween 20) e incubados durante a noite a 4° C com anticorpos primários ao coelho anti-p-Erk1 / 2 (1: 1000, sc-23759, Santa Cruz biotecnologia, CA, EUA), coelho anti-p -Akt 123 (1: 1000, sc-33437 Santa Cruz biotecnologia, CA, EUA), mouse anti-Akt 1 (1: 1000, α2967 Cell Signaling Technology, Beverly, MA, EUA), anti-Erk 1/2 ou coelho anti-β-actina-HRP (1:45.000, A3854, Sigma-Aldrich, St Louis, MO).

Após a incubação com anticorpos primários, as membranas foram lavadas três vezes (10 min cada) com solução de TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário específico conjugado à peroxidase de rábano silvestre (HRP) à temperatura ambiente por 1 h. As membranas foram lavadas mais três vezes (10 min cada) com solução de TBS-T e expostas ao substrato HRP (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA), e os complexos imunes foram visualizados por quimioluminescência usando iBright Imaging Systems (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, EUA). As bandas foram quantificadas por densitometria utilizando o software do fabricante (iBright Analysis Software, Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

3.6.8 Demais análises sanguíneas

Amostras de sangue coletadas duas horas após os tratamentos no dia 5, serviram para contagem de eritrócitos e leucócitos realizada por método automatizado (contador de células modulo Condessa IIFL da marca Thermo Fisher). Kits de espectrocolorimetria (Labtest) foram usados para medir as concentrações séricas de glicose, colesterol, triglicerídeos, proteínas totais, uréia e as atividades de aspartato e alanina aminotransferase. Os fígados, pulmões, rins, corações, baços e pâncreas foram dissecados, lavados com PBS, secados em papel absorvente e pesados em balança analítica (Shimadzu)[333].

3.7 VARIÁVEIS DE ESTUDO

Quadro 2 – Variáveis de estudo

Variáveis	**Tipo**	**Natureza**	**Proposta de utilização**
Tratamento com AB	independente	Qualitativa	Sim/não
Modelo Imiquimode	independente	Qualitativa	Sim/não
Severidade das lesões	Dependente	Quantitativa	0-4 pontos
Desaparecimento das lesões	Dependente	Quantitativa	Número de camundongos com lesão
Velocidade de hemossedimentação (VHS)	Dependente	Quantitativa	mm/h média ± desvio padrão
Contagem absoluta de leucócitos	Dependente	Quantitativa	mil/mm^3 média ± desvio padrão
Contagem relativa de leucócitos	Dependente	Quantitativa	Percentual média ± desvio padrão
Proteína-C-reativa (PCR)	Dependente	Quantitativa	pg/mg de proteína média ± desvio padrão
Citocinas	Dependente	Quantitativa	Pg de citocina/mg de proteína média ± desvio padrão
Enzimas aspartato e Alanina-aminotransferase (AST e ALT)	Dependente	Quantitativa	U/L média ± desvio padrão
Ureia	Dependente	Quantitativa	mg/dL média ± desvio padrão
Colesterol	Dependente	Quantitativa	mg/dL média ± desvio padrão
Triglicerídeos	Dependente	Quantitativa	mg/dL média ± desvio padrão
Cinases ativadas por mitógenos (MAPKs);	Dependente	Quantitativa	Pixels média ± desvio padrão
Proteína cinase B (Akt)	Dependente	Quantitativa	Pixels média ± desvio padrão

3.8 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Em relação aos aspectos estatísticos deste estudo, para a determinação do tamanho dos grupos amostrais foi levada em consideração a utilização de um número mínimo possível de animais, haja vista a necessidade de redução, substituição e refinamento do uso de animais em atividades de pesquisa (RN CONCEA n. 17 03.07.2014, Art. 5 Lei n. 11.794 08.10. 2008, RN MCT 30 2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa -

DBCA). Experiências prévias do Grupo ALINDI também foram levadas em consideração[2]. Também, a eficiência do modelo experimental selecionado foi avaliada. Um estudo anterior já havia relatado que a incidência de lesões psoriasiformes induzidas com imiquimode chega a 100% em camundongos (desvio padrão da média praticamente nulo)[315,] algo conformado pelas experiências do Grupo ALINDI. Foi considerado ainda aspectos relativos ao refinamento no uso dos animais. Esta pesquisa utilizou metodologia validada e já padronizada[315]. Os animais utilizados tinham idade e peso equivalentes, foram submetidos às mesmas condições de manutenção desde o nascimento; aspectos que garantiram um nível aceitável de homogeneidade entre os grupos amostrais. Aspectos como estes constituíram os critérios de inclusão obedecidos nesta pesquisa. Além disso, somente foram utilizados animais procedentes de um mesmo biotério, previamente avaliados por um veterinário e com atestado de sanidade. Qualquer desvio foi considerado como critério de exclusão nesta pesquisa.

Análises de poder foram realizadas para o cálculo do número de animais por grupo, utilizando a seguinte equação: n = {[(z alfa + z beta) * s] / sigma} 2. Na equação, n = tamanho da amostra; z alfa = valor tabelado para alfa 0,05 (distribuição normal), z beta= valor tabelado para alfa de 0,20 (distribuição normal), s= desvio padrão, sigma = diferença (s) adotada (s) entre as medias para detecção significativa[334]. O desfecho primário utilizado para os cálculos foi a taxa diária de alteração da severidade das lesões induzidas por imiquimode que é de cerca de 20% ao dia. As análises e poder indicaram que pelo menos 6 camundongos por grupo eram necessários para detectar diferenças em termos de severidade das lesões em um contexto de um poder estatístico de 80%, intervalo de confiança de 95% e probabilidade α de 0,05. Foi realizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk. Os dados foram expressos no geral por médias ± desvios-padrão. A análise estatística foi realizada pelo software GraphPad Prism 6 (San Diego, EUA). As comparações e diferenças dos dados paramétricos foram avaliadas pelos testes de análise de variância ANOVA, complementada pelo teste de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os dados de LCP foram avaliados pelos declives das curvas de regressão por meio de regressão múltipla e área sob as curvas (AUC)[334]. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.9 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

A presente pesquisa obteve o protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-Unisul) sob n. 17.015.4.01.IV, (anexo A) sendo observadas as definições da Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa[105].

4. ARTIGO CIENTÍFICO

A seguir está inserido o artigo científico resultado desta tese, que foi submetido para a revista científica BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS (PRINT) e com fator de impacto de 2.939 (B1 Med II). As normas da Revista estão disponíveis no link: https://www.journals.elsevier.com/biochemical-and-biophysical-research-communications e anexadas ao final da tese.

Ácido betulínico aplicado sobre a pele de camundongos com lesões psoriasiformes induzidas por imiquimode: efeitos locais, biossinalização e potencialmente adversos

Flávia S. Fernandes a, Verônica V. Horewicz a, Maicon R. Kviecinski et al.

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Sul de Santa Catarina, Palhoça, Brasil

*Autor correspondente
Endereço (e-mail): maicon.kviecinski@unisul.br (MR Kviecinski)

Resumo

Introdução: Pacientes psoriáticos descontinuam os tratamentos orais ou injetáveis alegando problemas de eficácia e segurança. O ácido betulínico (AB) forma agregados supramoleculares por automontagem espontânea em veículo hidroalcoólico, que podem potencialmente depositar-se sobre as lesões psoriasiformes da pele dos animais de onde poderia ser liberado, tendo alcance sistêmico e exibindo amplo espectro de ativo, inclusive para os casos moderados e severos de psoríase. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia, segurança e mecanismo de ação de AB aplicado sobre a pele de camundongos com lesões psoriasiformes induzidas por imiquimode. **Metodologia:** A cada 24 h (5 dias), imiquimode era aplicado no dorso depilado dos camundongos (exceto no grupo não tratado); 2 h depois, o veículo (solução aquosa de glicerol a 10%) (100 µL), 0,05 mg/mL de clobetasol ou 0,5 mg/mL de AB eram administrados pela mesma via. Foram avaliados o índice de gravidade por área da psoríase (PASI), peso corporal, consumo de água/ração e deambulação (n = 12/grupo). O tempo para completa limpeza da pele (CSC) foi avaliado (n = 6/grupo) e AB causou sua maior redução (até 40%). Em outros seis camundongos/grupo foram quantificados na pele: acantose epidérmica e o número de linfócitos e granulócitos nas papilas dérmicas. Além disso, fosforilação da Akt e ERK. No sangue foram avaliados: concentração de TNF, IL-17A, IFNγ, IL-10, TGFβ e indicadores de toxicidade. **Resultados:** AB e clobetasol reduziram o PASI ($p < 0,001$) e a acantose (até 3 vezes), normalizando a infiltração de imunócitos e a concentração de TNF, reduzindo IL-17A (≅ 50%) (ambos, $p = 0,01$), p-Akt ($p < 0,01$ e 0,05, respectivamente) e p-ERK2 ($p < 0,001$ e 0,05, respectivamente). Apenas o AB normalizou a concentração de INFγ e foi o único capaz de inibir p-ERK1 ($p < 0,001$), sem intensificar a toxicidade do imiquimode. **Conclusão:** Os dados sugerem que AB pode ser considerado uma molécula candidata para o desenvolvimento de um novo tratamento para psoríase aplicado sobre a pele.

Palavras chave: Ácido betulínico; Lesões psoriasiformes; Tratamento sobre a pele; Eficácia e segurança; Mecanismo de ação.

Abstract

Introduction: Psoriatic patients discontinue oral or injectable medications on the grounds of efficacy and safety problems. Betulinic acid (BA) forms supramolecular aggregates by spontaneous self-assembly in a hydroalcoholic vehicle, which can potentially be deposited on psoriasiform lesions of the animals' skin from which it could be released, having a systemic reach and exhibiting a broad spectrum of benefic effects, including for cases moderate and severe psoriasis. The objective of the study was to evaluate the efficacy, safety of this mechanism of action of BA applied on the skin of mice with psoriasiform lesions induced by imiquimod. **Methodology**: Every 24 h (5 days), imiquimod was applied to the shaved back of the mice (except in the untreated group); 2 h later, the vehicle (10% aqueous glycerol solution) (100 µL), 0.05 mg / ml clobetasol or 0.5 mg / ml AB were administered by the same route. The severity index by area of psoriasis (PASI), body weight, water / feed consumption and walking (n = 12 / group) were evaluated. The time for complete cleaning of the skin (CSC) was evaluated (n = 6 / group) and AB caused its greatest reduction (up to 40%). In six other mice / group, the skin was quantified: epidermal acanthosis and the number of lymphocytes and granulocytes in the dermal papillae. In addition, phosphorylation of Akt and ERK. In the blood were evaluated: concentration of TNF, IL-17A, IFNγ, IL-10, TGFβ and indicators of toxicity. **Results**: AB and clobetasol reduced PASI ($p < 0.001$) and acanthosis (up to 3 times), normalizing immunocyte infiltration and TNF concentration, reducing IL-17A (≅ 50%) (both, $p = 0.01$), p-Akt ($p < 0.01$ and 0.05, respectively) and p-ERK2 ($p < 0.001$ and 0.05, respectively). Only AB normalized the INFγ concentration and was the only one capable of inhibiting p-ERK1 ($p < 0.001$), without intensifying the toxicity of imiquimod. **Conclusion**: The data suggest that AB can be considered a candidate molecule for the development of a new treatment for psoriasis applied to the skin.

Keywords: Betulinic acid; Psoriasiform lesions; Skin treatment; Effectiveness and safety; Mechanism of action.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como considerações finais, nesta seção foram apresentadas as conclusões desta tese à luz dos objetivos pré-definidos. Os dados deste estudo permitem concluir que, em comparação ao grupo veículo:

- AB apresentou menor eritema, acantose e descamação nas lesões psoriasiformes induzidas em camundongos;
- AB e clobetasol inibiram o infiltrado de granulócitos nas papilas dérmicas em potência equivalente;
- O clobetasol causou uma inibição mais acentuada sobre o infiltrado linfocitário nas amostras de tecido das lesões;
- AB causou a aceleração do tempo de limpeza completa da pele dos camundongos;
- AB e clobetasol apresentou uma menor concentração sérica de TNF e IL-17A de forma igualitária;
- AB causou aumentou a concentração sérica de INFγ;
- AB e clobetasol causaram aumento igualitário da concentração sérica de IL-10;
- AB inibiu p-Akt e p-ERK2, sendo o único capaz de inibir p-ERK1;
- AB não intensificou a toxicidade do imiquimode, também não causou efeitos colaterais severos;
- Os dados sugerem que AB pode ser considerado uma molécula candidata para o desenvolvimento de um novo tratamento para psoríase aplicado sobre a pele.

6. PERSPECTIVAS

Finalizado este trabalho, as perspectivas esperadas a partir de agora são:

- Em termos de produção bibliográfica, a perspectiva é de efetivar a publicação do artigo correspondente a esta tese;
- Relativo à seção de revisão da literatura e principalmente em relação aquilo que se refere à revisão do sistema imunológico, da imunodermatologia, dos mecanismos que polarizam as repostas imunes no sentido de respostas de defesa e por outro lado, respostas de tolerância imunológica (autoimunidade), com ênfase nos mecanismos da imunopatogênese da psoríase, pretende-se confeccionar um artigo de revisão narrativa e submeter a um periódico internacional;
- Vislumbra-se ainda a possibilidade de compilar o conteúdo do referencial teórico na forma de um livro didático em português dedicado aos estudantes brasileiros;
- Em termos de continuidade dos estudos científicos sobre o potencial farmacológico do AB aplicado sobre a pele para tratar psoríase, sugere-se aguardar os resultados dos ensaios clínicos de fase I e II de segurança e tolerabilidade de AB sobre a pele (citados na introdução) e então articular o desenvolvimento de ensaios clínicos de fase III e até IV;
- Em termos de ensaios in vitro, utilizando tecnologias ômicas e bioinformática, muita coisa sobre o efeito de AB no tratamento da psoríase ainda pode ser avaliado. Por exemplo, a ligação de AB, com receptores de citocinas secretadas de forma anormal nos pacientes, ou a formação de complexos de AB-citocinas patogênicas, o que eventualmente neutralizaria o efeito das mesmas;
- Por meio de transfecção gênica, e clonagem, seria possível avaliar melhor o efeito do AB sobre o metaboloma das células psoriáticas;
- Estudos populacionais para avaliar a eficácia e segurança de AB em pacientes com diferentes formas clínicas de psoríase;
- Entre outras possibilidades para continuar a investir no desenvolvimento de um medicamento antipsoriático a partir de AB.

REFERÊNCIAS

1. Kviecinski MR, Nunes LF, Felisberto SE, Fernandes F de S, David IMB, Trabold LA, et al. Uso do fruto de Dillenia indica L. com propósito anti-inflamatório por participantes dos grupos da terceira idade e pastorais da saúde na região sul de Santa Catarina, Brasi. Rev Bras Plantas Med. 2016;18(4):899–906.

2. Kviecinski MR, David IMB, De Souza Fernandes F, Correa MR, Clarinda MM, Freitas AF, et al. Healing effect of dillenia indica fruit extracts standardized to betulinic acid on ultraviolet radiation-induced psoriasis-like wounds in rats. Pharm Biol. 2017;55(1).

3. Kumar D, Mallick S, Vedasiromoni JR, Pal BC. Anti-leukemic activity of Dillenia indica L. fruit extract and quantification of betulinic acid by HPLC. Phytomedicine. 2010;17(6):431–5.

4. Shrivastav S, Sindhu RK, Kumar S, Kumar P. Anti-psoriatic and phytochemical evaluation of Thespesia populnea bark extracts. Int J Pharm Pharm Sci. 2009;1:176–85.

5. Vijayalakshmi A, Ravichandiran V, Velraj M, Nirmala S, Jayakumari S. Screening of flavonoid “quercetin” from the rhizome of Smilax china Linn. for anti-psoriatic activity. Asian Pac J Trop Biomed. 2012;2(4):269–75.

6. Dwarampudi LP1, Palaniswamy D, Nithyanantham M RP. Antipsoriatic activity and cytotoxicity of ethanolic extract of Nigella saliva seeds. Pharmacogn Mag. 2012;8(32):268–72.

7. Dhanabal SP1, Muruganantham N, Basavaraj KH, Wadhwani A SN. Antipsoriatic activity of extracts and fractions obtained from Memecylon malabaricum leaves. J Pharm Pharmacol. 2012;64(10):1501–9.

8. Van der Fits L, Mourits S, Voerman JS, Kant M, Boon L, Laman JD, et al. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. J Immunol. 2009;182(9):5836–45.

9. Gilliet M, Conrad C, Geiges M, Cozzio A, Thürlimann W, Burg G, et al. Psoriasis triggered by toll-like receptor 7 agonist imiquimod in the presence of dermal plasmacytoid dendritic cell precursors. Arch Dermatol. 2004;140(12):1490–5.

10. Fernandes F de S. Estudo pré-clínico de toxicidade do extrato acetato de etila do fruto de Dillenia indica padronizado em ácido betulínico e administrado topicamente em

camundongos [dissertação]. Palhoça (SC): Universidade do Sul de Santa Catarina; 2017.

11. Liu C, Chen Y, Lu C, Chen H, Deng J, Yan Y, et al. Betulinic acid suppresses Th17 response and ameliorates psoriasis-like murine skin inflammation. Int Immunopharmacol. 2019;73(5):343–52.

12. Lebwohl MG, Bachelez H, Barker J, Girolomoni G, Kavanaugh A, Langley RG, et al. Patient perspectives in the management of psoriasis: Results from the population-based Multinational Assessment of Psoriasis and Psoriatic Arthritis Survey. J Am Acad Dermatol. 2014;70(5): 871-81.

13. Raychaudhuri SK, Maverakis E, Raychaudhuri SP. Diagnosis and classification of psoriasis. Autoimmun Rev. 2014;13(4–5):490–5.

14. Bildziukevich U, Özdemir Z, Wimmer Z. Recent achievements in medicinal and supramolecular chemistry of betulinic acid and its derivatives. Molecules. 2019;24(19):1–20.

15. Hordyjewska A, Ostapiuk A, Horecka A, Kurzepa J. Betulin and betulinic acid: triterpenoids derivatives with a powerful biological potential. Phytochem Rev. 2019;18(3):929–51.

16. Nestle F, Kaplan D, Barker J. Psoriasis. N Engl J Med. 2009;361(5):496–509.

17. Brasil. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Psoríase. Portaria n. 10 DOU 6 de setembro de 2019 Brasil: Comissão nacional de incorporação de tecnologias no SUS (C0NITEC); 2019 p. 101.

18. Boehncke WH, Schön MP. Psoriasis. Lancet. 2015;386(9997):983–94.

19. Schön M, Boehncke W. Psoriasis. N Engl J Med. 2005; 352(18):1899-912.

20. Silva JH da, Foureaux G, Sá MA de, Schetino LPL, Guerra LB. O ensino-aprendizagem da anatomia humana: avaliação do desempenho dos alunos após a utilização de mapas conceituais como uma estratégia pedagógica. Ciência Educ. 2018;24(1):95–110.

21. Kruse MHL. Anatomia: a ordem do corpo. Rev Bras Enferm. 2004;57(1):79–84.

22. Córdova Martínez A, Alvarez-Mon M. O sistema imunológico (I): conceitos gerais, adaptação ao exercício físico e implicações clínicas. Rev Bras Med do Esporte.

1999;5(3):120–5.

23. A bbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Imunologia celular e molecular. 9ª ed. Elsevier: Rio de Janeiro; 2019. 1–416 p.

24. Qi H, Kastenmüller W, Germain RN. Spatiotemporal Basis of Innate and Adaptive Immunity in Secondary Lymphoid Tissue. Annu Rev Cell Dev Biol. 2014;30:141–67.

25. Flajnik MF, Du Pasquier L. Evolution of innate and adaptive immunity: Can we draw a line? Trends Immunol. 2004;25:640–4.

26. Murphy KM. Imunobiologia de Janeway. 8ª ed. Machado DC, Renard G, Gualdi lucien P, editors. Porto Alegre: Artmed; 2014. 868 p.

27. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. Farmacologia. 6a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007. 829 p.

28. Rang HP Ritter, JM Flower, RJ Henderson G. Pharmacology [Internet]. 2016. 776 p. Acesso em 03/04/2020. Disponível em: http://store.elsevier.com/Rang-and-Dales-Pharmacology/Humphrey-Rang/isbn-9780702053627/

29. Cruvinel W, Mesquita Junior D, Araújo J, Catelan T, Souza A, Silva N, et al. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. Rev Bras Reum. 2010;50(4):434–61.

30. Mesquita Júnior D, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWS de, Cruvinel W de M, Andrade LEC, et al. Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. Rev Bras Reumatol. 2010;50(5):552–80.

31. Souza AWS de, Mesquita Júnior D, Araújo JAP, Catelan TTT, Cruvinel W de M, Andrade LEC, et al. Sistema imunitário: parte III. O delicado equilíbrio do sistema imunológico entre os pólos de tolerância e autoimunidade. Rev Bras Reumatol. 2010;50(6):665–79.

32. Delves PJ, Martin SJ, Burton DR, Roitt IM. Roitt - Fundamentos de Imunologia. 13ª ed. São Paulo: Guanabara; 2018. 576 p.

33. Godfrey DI, Stankovic S, Baxter AG. Raising the NKT cell family. Nat Immunol. 2010;11(3):197-206.

34. Murphy K, Travers P, Walport M, Paula A, Lambert F, Beatriz C. Imunobiologia de Janeway. 7ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2010. 885 p.

35. Ramos RP, Ferreira EVM, Arakaki JSO. Estratégias do tratamento da hipertensão arterial pulmonar TT - Strategies treatment of pulmonary arterial. Pulmäo RJ. 2015;24(2):71–7.

36. Abbas, AK; Lichtman, AH; Pillai S. Imunologia celular e molecular. 8ª ed. Elsevier, editor. Rio de Janeiro; 2015.

37. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. Lancet. 2001;357(9270):1777–89.

38. Sanchez APG. Imunopatogênese da psoríase. An Bras Dermatol. 2010 Oct;85(5):747–9.

39. Pereira E, Azevedo C. Papel da imunidade inata no desenvolvimento e progressão das amiloidoses [dissertação]. Rio de Janeiro (RJ): Programa de Pós- Graduação em Química Biológica. 2015. Acesso em: 20/03/2020. Disponível em: https://www.capes.gov.br/images/stories/download/pct/2016/Mencoes-Honrosas/Ciencias-Biologicas-Estefania-Pereira-Cardoso-Azevedo.PD.

40. Roitt IM. Roitt, fundamentos de imunologia. 12ª ed. Guanabara Koogan, editor. Rio de Janeiro; 2013. 552 p.

41. Kumar, V; Abbas, AK; Aster J. Inflamação e Reparo. In: Elsevier, editor. Patologia Básica Robbins. 9ª ed. Rio de Janeiro; 2013. p. 1–45.

42. Carvalho GB de A; Caldeira JVC; Godas AG de L; Candido MT, Pando SC. Moléculas bioativas derivadas de lipídios relacionadas à resposta inflamatória. Arch Health Invest. 2018;7(8):29. Acesso em:13/04/2020. Disponíbel em: https://www.archhealthinvestigation.com.br/ArcHI/article/view/4107/pdf

43. Isaac C, Ladeira PRS, Rêgo FMP, Aldunate JCB, Ferreira MC. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. Rev Med. 2010;89(3/4):125.

44. Pereira L. Inflamações. In: Gua nabar a Kooga n, editor. Bogliolo, patologia geral [Internet]. 5ª ed. Rio de Janeiro; 2013. p. 1–35. Acesso em: 15/04/2020. Disponível em: https://www.passeidireto.com/arquivo/74768396/bogliolo-patologia-geral-pdf

45. Sousa JR de. Polarização de resposta dos macrófagos e suas possíveis implicações na imunopatogênese da doença de hansen [dissertação]. Belém (PA): Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. 2016. Acesso em:30/05/2020. Disponível em: http://repositorio.ufpa.br/jspui/bitstream/2011/9226/1/Dissertacao_PolarizacaoRespost

aMacrofagos.pdf

46. Roh JS, Sohn DH. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. Immune Netw. 2018;18(4):1–14.

47. Leandro S, Bomfim G, Almeida VM De, Almeida GC De, Moura K. Síntese e avaliação preliminar da atividade antinociceptiva de novas isoxazolil- aril-hidrazonas. Quim. Nova. 2011;34(1):76–81.

48. Tricoli V. Mecanismos envolvidos na etiologia da dor muscular tardia. Rev bras ciênc mov. 2001;9(2): 39-44

49. Brasil. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Psoríase. Portaria n. 10 DOU 6 de setembro de 2019 Brasil: Comissão nacional de incorporação de tecnologias no SUS (C0NITEC); 2019 p. 101.

50. Mitchell J a, Warner TD. Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. Br J Pharmacol. 1999;128(6):1121–32.

51. Garavito RM, Dewitt DL. The cyclooxygenase isoforms: Structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids. 1999;1441(2–3):278–87.

52. Botting RM. Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927-2004). Journal of Thermal Biology. 2006;31(1):209-19.

53. Ryan GB, Majno G. Acute inflammation: a review. Am J Pathol. 1977;24(2):285–305.

54. Iles KE, Forman HJ. Macrophage signaling and respiratory burst. Immunol Res. 2002;26(1–3):95–105.

55. Anderson D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. Mutat Res. 1996;350:103–8.

56. J aneway CAJ, Travers P, Walport M, Schlomchik MJ. The complement system and innate immunity. In: Janeway CAJ, Travers P, Walport M, Schlomchik MJ, editors. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease [Internet]. New York: Garland Science; 2001. Acesso em:30/05/2020. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27100/

57. Kluft C, de Maat MPM. Genetics of C-Reactive Protein. Arterioscler Thromb

Vasc Biol. 2003;23(11):1956–9.

58. Herpers BL, Endeman H, De Jong BAW, De Jongh BM, Grutters JC, Biesma DH, et al. Acute-phase responsiveness of mannose-binding lectin in community-acquired pneumonia is highly dependent upon MBL2 genotypes. Clin Exp Immunol. 2009;156(3):488–94.
59. Ritchie RF, Palomaki GE, Neveux LM, Navolotskaia O, Ledue TB, Craig WY. Reference Distributions for the Negative Acute-Phase Serum Proteins, Albumin, Transferrin and Transthyretin: A Practical, Simple and Clinically Relevant Approach in a Large Cohort. J Clin Lab Anal. 1999;13(2):273–9.
60. Serhan CN, Levy BD. Resolvins in inflammation: Emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. J Clin Invest. 2018;128(7):2657–69.
61. Feghali C a, Wright TM. Cytokines in acute and chronic inflammation. Front Biosci. 1997;2(1):d12–26.
62. Mills CD. Anatomy of a discovery: M1 and M2 macrophages. Front Immunol. 2015;6(5):1–12.
63. Neve EM dos SFT. Macrófago: Biologia , Diversidade e Função [Dissertação]. Porto (Portugal): Universidade Fernando Pessoa; 2015.
64. K Karp G, Iwasa J. Cell signaling and signal transduction: communication between cells. In: Karp G, Iwasa J, Marshall W, editors. Karp's cell and molecular biology: concepts and experiments. New Jersey: John Wiley & Sons; 2015. p. 617–60.
65. Borish LC, Steinke JW. Cytokines and chemokines. J Allergy Clin Immunol. 2003;111(2):460–75.
66. Kourilsky P, Truffa-Bachi P. Cytokine fields and the polarization of the immune response. Trends Immunol. 2001;22(9):502–9.
67. Kalliolias GD, Ivashkiv LB, Program TD. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. Nat Rev Rheumatol [Internet]. 2016;12(1):49–62.
68. Reich K, Iversen L, Bachelez H. Is complete skin clearance in psoriasis the answer ? EMJ Dermatol. 2018;6(1):53–61.
69. Cusabio ® Your Good Partner in Biology Research [Internet]. New York: What a paradoxical TNF signaling pathway-based on different receptors. TNF (Tumor

Necrosis Factor). Acesso em 3/7/2020. Disponível em: 2019. https://www.cusabio.com/c-20809.html

70. Bhat MY, Solanki HS, Advani J, Khan AA, Keshava Prasad TS, Gowda H, et al. Comprehensive network map of interferon gamma signaling. J Cell Commun Signal. 2018;12(4):745–51.
71. Yang L, Dybedal I, Bryder D, Nilsson L, Sitnicka E, Sasaki Y, et al. IFN-γ Negatively Modulates Self-Renewal of Repopulating Human Hemopoietic Stem Cells. J Immunol. 2005;174(2):752–7.
72. Yang S, Wang J, Brand DD, Zheng SG. Role of TNF-TNF receptor 2 signal in regulatory T cells and its therapeutic implications. Front Immunol. 2018;9(abril):artigo 784.
73. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. J Pathol. 2008;214:149–60.
74. Ware CF. The TNF superfamily - 2008. Cytokine Growth Factor Rev. 2008;19(3–4):183–6.
75. Geetanjali Rampal, Namita Khanna, Tarunpreet Singh Thind, Saroj Arora, Adarsh Pal Vig. Role of isothiocyanates as anticancer agents and their contributing molecular and cellular mechanisms. J Med Chem. 2012;3(2):79–93.
76. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. Oncogene. 2007;14;26(22):3279-90.
77. Patterson H, Nibbs R, Mcinnes I, Siebert S. Protein kinase inhibitors in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases. Clin Exp Immunol. 2014;176(1):1-10.
78. Thalhamer T, McGrath MA, Harnett MM. MAPKs and their relevance to arthritis and inflammation. Rheumatology. 2008;47(4):409–414.
79. Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. NF-kB in development and progression of human cancer. Virchows Archiv. 2005;446(5):475-82
80. Glezer I, Marcourakis T, Werneck Avellar MC, Gorenstein C, Scavone C. The role of the transcription factor NF-kB in the molecular mechanisms of action of psychoactive drugs. Rev Bras Psiquiatr. 2000;22(1):26-30.
81. Sun SC. Non-canonical NF-κB signaling pathway. Cell Research. 2011;21(1):71-85.
82. Park S, Chun HJ. Helicobacter pylori infection following partial gastrectomy for gastric

cancer. World J Gastroenterol. 2014;20(11):2765–70.

83. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. Nature Reviews Drug Discovery. 2009; 8(8):627-44.
84. Samadi AK, Bilsland A, Georgakilas AG, Amedei A, Amin A, Bishayee A, et al. A multi-targeted approach to suppress tumor-promoting inflammation. Semin Cancer Biol. 2015;35(May):S151–84.
85. Strzyz P. Cancer biology: TGFβ and EMT as double agents. Nat Rev Mol Cell Biol. 2016;17(4):202–3.
86. Zhu S, Jin J, Gokhale S, Lu AM, Shan H, Feng J, et al. Genetic alterations of TRAF proteins in human cancers. Front Immunol. 2018;9(september).
87. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol1. 1986;136:2348–57.
88. Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. Immunity. 2000;13(5):715–25.
89. Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. Nat Rev Immunol. 2009;9(8):556–67.
90. Patel DD, Kuchroo VK. Th17 Cell Pathway in Human Immunity: Lessons from Genetics and Therapeutic Interventions. Immunity. 2015;43(6):1040–51.
91. Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. Nat Med. 2007;13(2):139–45.
92. Zhang X, Angkasekwinai P, Dong C, Tang H. Structure and function of interleukin-17 family cytokines. Protein Cell. 2011;2(1):26–40.
93. Eyerich S, Eyerich K, Cavani A, Schmidt-Weber C. IL-17 and IL-22: siblings, not twins. Trends Immunol. 2010;31(9):354–61.
94. Yi H, Bai Y, Zhu X, Lin L, Zhao L, Wu X, et al. IL-17A Induces MIP-1α Expression in Primary Astrocytes via Src/MAPK/PI3K/NF-kB Pathways: Implications for Multiple Sclerosis. J Neuroimmune Pharmacol. 2014;9(5):629–41.
95. Vitiello GA, Miller G. Targeting the interleukin-17 immune axis for cancer

immunotherapy. J Exp Med. 2019;16:1–11.

96. Omenetti S, Pizarro TT. The Treg/Th17 axis: A dynamic balance regulated by the gut microbiome. Front Immunol. 2015;6(639):1–8.

97. Knochelmann HM, Dwyer CJ, Bailey SR, Amaya SM, Elston DM, Mazza-McCrann JM, et al. When worlds collide: Th17 and Treg cells in cancer and autoimmunity. Cell Mol Immunol. 2018;15(5):458–69.

98. Zhang M, Zhang X. The role of PI3K/AKT/FOXO signaling in psoriasis. Arch Dermatol Res. 2018;0(0):0.

99. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. Cell. 2007;129(7):1261–1274.

100. Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2005;9(1):59–71.

101. Martini M, De Santis MC, Braccini L, Gulluni F, Hirsch E. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: An updated review. Ann Med. 2014; 46(6):372-83.

102. Lindsley C, Barnett S, Layton M, Bilodeau M. The PI3K/Akt Pathway: Recent Progress in the Development of ATP-Competitive and Allosteric Akt Kinase Inhibitors. Curr Cancer Drug Targets. 2008;8(1):7-18.

103. Silverstein AM. Cellular versus humoral immunology: A century-long dispute. Nat Immunol. 2003;4:425–8.

104. Boehm T, Swann JB. Origin and Evolution of Adaptive Immunity. Annu Rev Anim Biosci. 2014;2:259–83.

105. Probst HC, Muth S, Schild H. Regulation of the tolerogenic function of steady-state DCs. Eur J Immunol. 2014;44:927–33.

106. Palamara F, Meindl S, Holcmann M, Lührs P, Stingl G, Sibilia M. Identification and characterization of pDC-like cells in normal mouse skin and melanomas treated with imiquimod. J Immunol. 2004;173(5):3051–61.

107. Melief C. Immunotherapy by dendritic cells. Immunity. 2008;29(3):372–83.

108. Kurd N, Robey EA. T-cell selection in the thymus: A spatial and temporal perspective. Immunol Rev. 2016;271(1):114–6.

109. Stritesky GL, Jameson SC, Hogquist KA. Selection of self-reactive T cells in the thymus. Annu Rev Immunol. 2012;30:95–114.

110. Nemazee D. Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. Nat Rev Immunol. 2006;6(10):728–40.

111. Mesquita Junior D, Araújo J, Catelan T, Souza A, Cruvinel W, Andrade L, et al. Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. Rev Bras Reum. 2010;50(5):552–80.

112. Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S. Development and maintenance of intestinal regulatory T cells. Immunity. 2013;38(3):414–23.

113. Maillard I, Fang T, Pear WS. Regulation of Lymphoid Development, Differentiation, and Function By the Notch Pathway. Annu Rev Immunol. 2005;23(1):945–74.

114. Clark MR, Mandal M, Ochiai K, Singh H. Orchestrating B cell lymphopoiesis through interplay of IL-7 receptor and pre-B cell receptor signalling. Nat Rev Immunol. 2014;14(2):69–80.

115. Johnson K, Reddy KL, Singh H. Molecular pathways and mechanisms regulating the recombination of immunoglobulin genes during B-Lymphocyte development. Adv Exp Med Biol. 2009;650:133–47.

116. J Janeway CA. Immunobiology: the immune system in health and disease. 6a ed. New York: Garland Science; 2005. 823 p.

117. G Grossman Z, Paul WE. Dynamic tuning of lymphocytes: Physiological basis, mechanisms, and function∗. Annu Rev Immunol. 2015;33(1):677–713.

118. Esensten JH, Helou YA, Chopra G, Weiss A, Bluestone JA. CD28 costimulation: from mechanism to therapy (Author Manuscript). Immunity. 2016;30(45):6347–58.

119. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. Annu Rev Immunol. 2005;23:515–48.

120. Schildberg FA, Klein SR, Freeman GJ, Sharpe AH. Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family. Immunity. 2016;44(5):955–72.

121. Boyman O, Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. Nat Rev Immunol. 2012;12(3):180–90.

122. Klatzmann D, Abbas AK. The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases. Nat Rev Immunol. 2015;15(5):283–94.

123. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. Nat Rev Immunol. 2015;15(8):486–99.
124. Zhang Q, Vignali DA. Co-stimulatory and co-inhibitory pathways in autoimmunity Qianxia. Immunity. 2016;44(5):1034–51.
125. Sun B, Zhang Y. Advances in experimental medicine and biology [Internet]. 2014. p. 841. Acesso em :20/07/2020. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25261209
126. Crotty S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. Immunity. 2014;41(4):529–42.
127. Sallusto F. Heterogeneity of Human CD4+ T Cells Against Microbes. Annu Rev Immunol. 2016;34(1):317-334.
128. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. Nat Immunol. 2005;6(11):1133–41.
129. Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S. Defining the human T helper 17 cell phenotype. Trends Immunol. 2012;33(10):505–12.
130. Sun JC, Lopez-Verges S, Kim CC, De Risi JL, Lanier LL. NK Cells and Immune "Memory." J Immunol. 2011;186(4):1891–1897.
131. Yirmiya R, Goshen I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. Brain Behav Immun. 2011;25(2):181–213.
132. Schimitt N, Ueno H. Regulation of Human Helper T Cell Subset Differentiation by Cytokines. Curr Opin Immunol. 2015;6(34):130–6.
133. Kearley J, Barker JE, Robinson DS, Lloyd CM. Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. J Exp Med. 2005;202(11):1539–47.
134. Carneiro S, Azevedo VF, Bonfiglioli R, Ranza R, Gonçalves CR, Keiserman M, et al. Recomendaçoes sobre diagnóstico e tratamento da artrite psoriásica. Rev Bras Reum. 2013;53(3):227–41.
135. Ozawa PMM, Reis DAS, Kurauti MA, Simões TMG, Oda JMM, Carneiro NK, et al. Vírus linfotrópico de células T humano tipo 1 (HTLV-1): implicações em doenças autoimunes. Semin Ciências Biológicas e da Saúde. 2012;33(1):83-95.
136. Ruiz DG, Azevedo MNL de, Santos OL da R. Artrite psoriásica: entidade

clínica distinta da psoríase ? Rev Bras Reumatol. 2012;52(4):623–38.

137. Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M, Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets. Eur J Immunol. 2013;43(11):2797–809.
138. Gutzeit C, Chen K, Cerutti A. The enigmatic function of IgD: some answers at last. Eur J Immunol. 2018;48(7):1101–13.
139. Kurosaki T, Shinohara H, Baba Y. B cell signaling and fate decision. Annu Rev Immunol. 2010;28(1):21–55.
140. Von Boehmer H, Melchers F. Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease. Nat Immunol. 2010;11(1):14–20.
141. Anderson MS, Su MA. AIRE expands: New roles in immune tolerance and beyond. Nat Revi Immunol. 2016;16(4):247–58.
142. Rudin CM, Thompson CB. B-cell development and maturation. Semin Oncol. 1998;25(4):435–46.
143. Billingham RE, Brent L, Medawar PB. "Actively acquired tolerance" of foreign cells. Nature. 1953;172(4379):603-6
144. Bilate AM, Lafaille JJ. Induced CD4 +Foxp3 + regulatory T cells in immune tolerance. Annu Rev Immunol. 2012;30(2):733–58.
145. Mueller DL. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. Nat Immunol. 2010;11(1):21–7.
146. Bandyopadhyay S, Soto-Nieves N, Macián F. Transcriptional regulation of T cell tolerance. Semin Immunol. 2007;19(3):180–7.
147. Stelzhammer V, Ozcan S, Michael G, Steeb H, Hodes GE, Guest C, et al. Central and peripheral changes underlying susceptibility and resistance to social defeat stress – A proteomic profiling study. Diagnostics in Neuropsychiatry [Internet]. 2015;88–93. Acesso em: 14/09/2020. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.dineu.2015.08.001
148. Buttari B, Profumo E, Facchiano F, Ozturk EI, Segoni L, Saso L, et al. Resveratrol prevents dendritic cell maturation in response to advanced glycation end products. Oxid Med Cell Longev [Internet]. 2013, ID 574029, p.12. Acesso em: 14/09/2020. Disponível em: http://downloads.hindawi.com/journals/omcl/2013/574029.pdf
149. Pavlos R, Mallal S, Ostrov D, Buus S, Metushi I, Peters B, et al. T Cell–

Mediated Hypersensitivity Reactions to Drugs. Annu Rev Med. 2015;66(1):439–54.

150. Gubin M, Artyomov M, Mardis E, Schreiber R. Tumor neoantigens: building a framework for personalized cancer immunotherapy. J Clin Invest. 2015;125(9):3413–3421.
151. B Baxter AG, Hodgkin PD. Activation rules: The two-signal theories of immune activation. Nat Rev Immunol. 2002;2(6):439–46.
152. Mizoguchi A, Mizoguchi E, Smith RN, Preffer FI, Bhan AK. Suppressive role of B cells in chronic colitis of T cell receptor α mutant mice. J Exp Med. 1997;186(10):1749–56.
153. Mizoguchi A, Bhan AK. A Case for Regulatory B Cells. J mmunol. 2006;176(2):705–10.
154. Mauri C, Ehrenstein MR. The “short” history of regulatory B cells. Trends Immunol. 2008;29(1):34–40.
155. Michael L, Lo B, Lucas CL. Genomics of immune diseases and new therapies. Physiol Behav. 2016;34(20):121–49.
156. Lucas CL, Lenardo MJ. Identifying genetic determinants of autoimunity and immune dysregulation. Curr Opin Immunol. 2015;37:28–33.
157. Chervonsky A V. Influence of microbial environment on autoimmunity. Nat Immunol. 2010;11(1):28–35.
158. Korman NJ. Management of psoriasis as a systemic disease: what is the evidence? Br J Dermatol. 2020;182(4):840–8.
159. Pugliese A. Advances in the etiology and mechanisms of type 1 diabetes. Discov Med. 2014;18(98):141–50.
160. Ransohoff RM, Hafler DA, Lucchinetti CF. Multiple sclerosis—a quiet revolution Richard. Nat Rev Neurol. 2015;11(3):134–42.
161. 170. Boehncke W-H, Katsambas A, Ortonne J-P, Puig L. EADV preceptorship: advances in dermatology. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2010;24(5):2-24.
162. Zenewicz LA, Abraham C, Flavell RA, Cho JH. Unraveling the Genetics of Autoimmunity. Cell. 2010;140(6):791–7.
163. Marson A, Housley WJ, Hafler DA, Marson A, Housley WJ, Hafler DA. Genetic basis of autoimmunity Find the latest version : Genetic basis of autoimmunity. 2015;125(6):2234–41.

164. Negroni A, Pierdomenico M, Cucchiara S, Stronati L. NOD2 and inflammation: current insights. J Inflamm Res. 2018;11:49–60.
165. Leffler J, Bengtsson AA, Blom AM. The complement system in systemic lupus erythematosus: An update. Ann Rheum Dis. 2014;73(9):1601–6.
166. Xu WD, Xie QB, Zhao Y, Liu Y. Association of Interleukin-23 receptor gene polymorphisms with susceptibility to Crohn's disease: A meta-analysis. Sci Rep. 2015;5(18584):1–11.
167. Ngo ST, Steyn FJ, McCombe PA. Gender differences in autoimmune disease. Front Neuroendocr. 2014;35(3):347–69.
168. Forrester J V., Xu H, Lambe T, Cornall R. Immune privilege or privileged immunity? Mucosal Immunol. 2008;1(5):372–81.
169. Wekerle H, Sun DM. Fragile privileges: Autoimmunity in brain and eye. Acta Pharmacol Sin. 2010;31(9):1141–8.
170. Smatti MK, Cyprian FS, Nasrallah GK, Al Thani AA, Almishal RO, Yassine HM. Viruses and autoimmunity: A review on the potential interaction and molecular mechanisms. Viruses. 2019;11(8):1–18.
171. Cunningham MW. Streptococcus and rheumatic fever. Curr Opin Rheumatol. 2012;24(4):408–16.
172. Tabarkiewicz J, Pogoda K, Karczmarczyk A, Pozarowski P, Giannopoulos K. The Role of IL-17 and Th17 Lymphocytes in Autoimmune Diseases. Arch Immunol. 2015;63(6):435–49.
173. Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA. Th17 cells in human disease. Immunol Rev. 2008;223(1):87–113.
174. Adami S, Cavani A, Rossi F, Girolomoni G. The role of interleukin-17A in psoriatic disease. BioDrugs. 2014;28(6):487–97.
175. Hot A, Miossec P. Effects of interleukin (IL)-17A and IL-17F in human rheumatoid arthritis synoviocytes. Ann Rheum Dis. 2011;70(5):727–32.
176. Ghilardi N, Ouyang W. Targeting the development and effector functions of TH17 cells. Semin Immunol. 2007;19(6):383–93.
177. Stumhofer JS, Silver J, Hunter CA. Negative regulation of Th17 responses. Semin Immunol. 2007;19(6):394–9.
178. Noack M, Miossec P. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. Autoimm Rev. 2014;13(6):668–77.

179. Lee GR. The balance of th17 versus treg cells in autoimmunity. Int J Mol Sci. 2018;19(3):1-14.
180. Eisenstein EM, Williams CB. The Treg/Th17 cell balance: A new paradigm for autoimmunity. Pediatr Res. 2009;65(5):26R-31R.
181. Zhu J, Paul WE. Peripheral CD4 T cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. Immunol Rev. 2010;238(1):247–62.
182. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. Nature. 2006;441(7090):235–8.
183. Kolarsick PAJB, Kolarsick MA, Goodwin CA-B. Anatomy and Physiology of the Skin. Dermatology Nurses. 2011;3(4):203–13.
184. Kolarsick P, Kolarsick M, Goodwin C. Anatomy and physiology of the skin. In: James W, Berger T, Elston D, editors. Diseases of the skin: Clinical dermatology. 10ª ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006. p. 1–11.
185. Hato T, Dagher PC. How the innate immune system senses trouble and causes trouble. Clin J Am Soc Nephrol. 2015;10(8):1459–69.
186. Breitkreutz D, Koxholt I, Thiemann K, Nischt R. Skin basement membrane: The foundation of epidermal integrity - BM functions and diverse roles of bridging molecules nidogen and perlecan. Biomed Res Int. 2013;179784:1–16.
187. Mendonça R da SC, Rodrigues GB de O. As principais alterações dermatológicas em pacientes obesos. ABCD Arq Bras Cir Dig. 2011;24(1):68–73.
188. Barcaui E de O, Carvalho ACP, Piñeiro-Maceira J, Barcaui CB, Moraes H. Estudo da anatomia cutânea com ultrassom de alta frequência (22 MHz) e sua correlação histológica. Radiol Bras. 2015;48(5):324–9.
189. Bangert C, Brunner PM, Stingl G. Immune functions of the skin. Clin Dermatol. 2011;29(4):360–76.
190. Mueller SN, Zaid A, Carbone FR. Tissue-resident T cells: Dynamic players in skin immunity. Front Immunol. 2014;5 (332):1-6.
191. Chu D. Overview of biology, development, and structure of skin. In: McGraw-Hill, editor. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. 8ª ed. New York; 2012. p. 55–73.

192. Zomer HD, Trentin AG. Skin wound healing in humans and mice: Challenges in translational research. J Dermatol Sci. 2018;90(1):3–12.

193. Gaur M, Dobke M, Lunyak V V. Mesenchymal stem cells from adipose tissue in clinical applications for dermatological indications and skin aging. Int J Mol Sci. 2017;18(1):208.

194. Najor NA. Desmosomes in Human Disease. Annu Rev Pathol. 2018;13(24):51–70.

195. Souza, ESA; Galdino, EMP; Filho, JOT; Filho, RS; Trajano, VNT; Costa H. Análise histológica comparativa entre epitélios saudáveis e doentes com psoríase e líquen plano. Rev Ciênc Saúde Nov Esperança. 2016;14(3):59-73.

196. Filho G. Bongliolo patologia. 8ª ed. Belo Horizonte: Guanabara Koogan; 2012. 1245 p.

197. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. Eur J Dermatol. 2002;12(4):390–9; quiz 400–1.

198. Wysocki AB. Skin anatomy, physiology, and pathophysiology. Nurs Clin North Am. 1999;34(4):777–97.

199. Pasparakis M, Haase I, Nestle FO. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. Nat Rev Immunol. 2014;14(5):289–301.

200. Iberg CA, Hawiger D. Natural and Induced Tolerogenic Dendritic Cells. J Immunol. 2020;204(4):733–44.

201. Rizzon D. O Sistema imune do recém-nascido: destacando aspectos fetais e maternos. Rev Pediatr. 2011;12(1):12–5.

202. Stamatas GN, Nikolovski J, Luedtke MA, Kollias N, Wiegand BC. Infant skin microstructure assessed in vivo differs from adult skin in organization and at the cellular level. Pediatr Dermatol. 2010;27(2):125–31.

203. Rosa MSDO, Richter AMHD, Bercini. RR. Como prot eger a criança de 0 a 24 meses contra a infecção. Rev Bras Enferm. 1979;32:271–95.

204. Ryan C, Korman NJ, Gelfand JM, Lim HW, Elmets CA, Feldman SR, et al. Research gaps in psoriasis: Opportunities for future studies. J Am Acad Dermatol. 2014;70(1):146–67.

205. Mahil SK, Capon F, Barker JN. Update on psoriasis immunopathogenesis and targeted immunotherapy. Semin Immunopathol. 2016;38(1):11–27.
206. Dermatologia SB. Profile of dermatological consultations in Brazil (2018). An Bras Dermatol [Internet]. 2018;93(6):916–28. Available from: http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L625215487%0Ahttp://dx.doi.org/10.1590/abd1806-4841.20188802
207. Trabold LA. Qualidade de vida em pacientes com psoríase: relação com comorbidades, severidade dos casos e nível de conhecimento sobre a doença [dissertação]. Palhoça (SC): Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Sul de Santa Catarina; 2017.
208. Ministério da Saúde (Brasil), Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS. Brasília: Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas - Psoríase; 2013 p. 405–41.
209. Gelfand JM, Neimann AL, Shin DB, Wang X, Margolis DJ, Troxel AB. Risk of myocardial infarction in patients with psoriasis. J Am Med Assoc. 2006;296(14):1735-41.
210. LEO Innovation Lab and The Happiness Research Institute. World psoriasis happiness report 2017 [Internet]. Copenhagen, Denmark; 2017. Available from: https://psoriasishappiness.report/static/documents/world-psoriasis-happiness-report-2017.pdf
211. Renzi C, Di Pietro C, Tabolli S. Participation, satisfaction and knowledge level of patients with cutaneous psoriasis or psoriatic arthritis. Clin Exp Dermatol. 2011;36(8):885–8.
212. Wahl AK, Moum T, Robinson HS, Langeland E, Larsen MH, Krogstad AL. Psoriasis patients' knowledge about the disease and treatments. Dermatol Res Pract. 2013;2013.
213. Deng Y, Chang C, Lu Q. The Inflammatory Response in Psoriasis: a Comprehensive Review. Clin Rev Allergy Immunol. 2016;50(3):377–89.
214. Sabbag C, Solis M, Junior M. Psoríase para profissionais da saúde: enfermagem, nutrição, podologia e psicologia. 1ª ed. Yendis, editor. São Caetano do Sul; 2010. 70–9 p.
215. Romiti R, Arnone M, Maragno L, Takahashi M. Psoríase na infância e na adolescência*. 2009;84(1):9–20.
216. Arruda C, Nogueira E, Oliveira M, Pereira E, Silva R. Avanços e desafios da

enfermagem na produção científica sobre psoríase. Rev Bras Enferm. 2011;64(1):186–75.

217. Ayala F. Clinical presentation of psoriasis. Reumatismo. 2007;59(1):40–5.

218. Moll J, Wright V. Psoriatic arthritis. Semin Arthritis Rheum. 1973;3(1):55–78.

219. Sociedade Brasileira de Dermatologia. Consenso Brasileiro de Psoríase 2012 - Guias de avaliação e tratamento. 2012. 131–37 p.

220. Carvalho M, Pires R, Florindo W, Cavalcanti A. Evidências para o uso de Indigo naturalis no tratamento da psoríase tipo placa : uma revisão sistemática. Nat line. 2010;8(3):127–31.

221. Lima B, Cunha M, Oliveira M. Aspetos imunológicos da psoríase [Internet]. Heal Environ World Congr. 2013;115–8. Acesso em: 30/05/2020. Disponível em: http://copec.eu/congresses/shewc2013/proc/works/25.pdf

222. Paixão MP, Ito LM, Machado CDA, Enokihara MMSS . Linear pustular psoriasis X ILVEN - Case report. An Bras Dermatol. 2005;80(6):607–10.

223. Robinson A, Van Voorhees AS, Hsu S, Korman NJ, Lebwohl MG, Bebo BF, et al. Treatment of pustular psoriasis: From the medical board of the National Psoriasis Foundation. Journal of the American Academy of Dermatology. 2012;67(2): 279-288.

224. Ramesh Bhat Y, Kakkar S, Balachandran C, Rao L, Roopasree S. Erythrodermic psoriasis. Eur J Pediatr Dermatology. 2013; 2016; 6: 93–104.

225. Bandeira AM. Psoríase: estudo de alterações de parâmetros da imunidade celular e a influência de sintomas de ansiedade. 2005;80(4):437-43.

226. Ferreira ACAF, Anjos FSA, Yoshino PM, Hall LS, Pinto SCC LR. Psoríase Eritrodérmica: relato de caso e revisão bibliográfica. Revista.FMRP 2015;47(2):185–93.

227. Lima EDA, Lima MDA. Imunopatogênese da psoríase: revisando conceitos. An Bras Dermatol. 2011;86(6):1151–8.

228. Osório F, Magina S FA. Imunopatogênese da psoríase. 2011;69(1):11–24.

229. Morizane, S; Yamasaki, H; Muhleisen, B; Kotol,P.F; Murakami, M; Aoyama, Y; Iwatsuki, K; Hata, T; Gallo R. Cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 in psoriasis enables keratinocyte reactivity against TLR9 ligands. J Invest Dermatol. 2012;132(1):135–43.

230. Lourenço ELb, Muller JC, Boareto AC, Gomes C, Lourenço AC, Calloi Palozi RA, et al. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor derived from tropaeolum majus L. in rat preimplantation embryos: Evidence for the dehydroepiandrosterone and estradiol role [Internet]. Evidence-based Complement Altern Med ;2014. Acesso em:30/05/2020. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3979065/pdf/ECAM2014-209207.pdf

231. Fasching P, Stradner M, Graninger W, Dejaco C, Fessler J. Therapeutic potential of targeting the Th17/Treg axis in autoimmune disorders. Molecules. 2017;22(1):134.

232. Medema RH, Bos JL. The role of p21_ras_ in receptor tyrosine kinase signaling. CritRevOncog. 1993;4(6):615-61.

233. Nelson DL, Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry 5ª ed. Book. 2008. p. 1–1294.

234. Hemmings BA, Restuccia DF. The PI3k-PKB/Akt pathway. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2015; 7(4): a026609.

235. Vyse TJ, Todd JA. Genetic analysis of autoimmune disease. Cell. 1996; 85(3):311-8.

236. Parmar KM, Itankar PR, Joshi A, Prasad SK. Anti-psoriatic potential of Solanum xanthocarpum stem in Imiquimod-induced psoriatic mice model. J Ethnopharmacol. 2017;198:158–66.

237. Tsoi LC, Spain SL, Knight J, Ellinghaus E, Stuart PE, Capon F, et al. Identification of 15 new psoriasis susceptibility loci highlights the role of innate immunity. Nat Genet. 2012;44(12):1341–8.

238. Elder JT, Bruce AT, Gudjonsson JE, Johnston A, Stuart PE, Tejasvi T, et al. Molecular dissection of psoriasis: integrating genetics and biology. J Invest Dermatol. 2010;130(5):1213–26.

239. Weinstein GD, McCullough JL, Ross P. Cell Proliferation in Normal Epidermis. J Invest Dermatol. 1984;82(6):623–8.

240. Zenz R, Eferl R, Kenner L, Florin L, Hummerich L, Mehic D, et al. Psoriasis-like skin disease and arthritis caused by inducible epidermal deletion of Jun proteins. 2005;437(7057):369–75.

241. Eberle FC, Brück J, Holstein J, Hirahara K, Ghoreschi K. Recent advances in

understanding psoriasis. F1000Research. 2016;5(0):770.

242. Sano S, Chan KS, Carbajal S, Clifford J, Peavey M, Kiguchi K, et al. Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. Nat Med. 2005;11(1):43–9.

243. Gudjonsson JE, Karason A, Antonsdottir AA, Runarsdottir EH, Gulcher JR, Stefansson K, et al. HLA-Cw6-positive and HLA-Cw6-negative patients with Psoriasis vulgaris have distinct clinical features. J Invest Dermatol. 2002;118(2):362–5.

244. Elder JT. PSORS1: linking genetics and immunology. J Invest Dermatol. 2006;126(6):1205–6.

245. Mallon E, Bunce M, Savoie H, Rowe A, Newson R, Gotch F, et al. HLA-C and guttate psoriasis. Br J Dermatol. 2000;143(6):1177–82.

246. Griffiths CEM. Psoriasis: Future research needs and goals for the twenty-first century. Dermatologic Clinics. 2004; 22(4):493-9.

247. Marrakchi S, Guigue P, Renshaw BR, Puel A, Pei X-Y, Fraitag S, et al. Interleukin-36-receptor antagonist deficiency and generalized pustular psoriasis. N Engl J Med. 2011;365(7):620–8.

248. Danilenko D. Review paper: Preclinical models of psoriasis. Vet Pathol. 2008;45(4):563-75.

249. Fredriksson T, Pettersson U. Severe psoriasis--oral therapy with a new retinoid. Dermatologica. 1978;157(4):238–44.

250. Belge K, Brück J, Ghoreschi K. Advances in treating psoriasis. F1000Prime Rep. 2014;6(4):2–9.

251. Brasil. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite B e coinfecções. Ministério da Saúde, 2016.

252. Jacobi A, Langenbruch A, Purwins S, Augustin M, Radtke MA. Prevalence of Obesity in Patients with Psoriasis: Results of the National Study PsoHealth3. Dermatology. 2015;231:231–8.

253. Martins GA, Arruda L, Mugnaini ASB. Validation of life quality questionnaires for psoriasis patients. An Bras Dermatol. 2004;79(5):521–35.

254. Duarte I, Buense R, Kobata C. Fototerapia. An Bras Dermatol. 2006;81(1):74–82.

255. Simplicio F, Maionchi F, Hioka N. Terapia Fotodinâmica: Aspectos Farmacológicos, Aplicações e Avanços Recentes no Desenvolvimento de Medicamentos. Quim Nov. 2002;25(5):801–7.

256. Silverman A, Menter A, Hairston JL. Tars and anthralins. Dermatol Clin. 1995;13(4):817–33.

257. Paghdal K V., Schwartz RA. Topical tar: Back to the future. Journal of the American Academy of Dermatology. 2009; 61(2):294-302.

258. Cather J, Menter A. Novel therapies for psoriasis. Am J Clin Dermatol. 2002;3(3):159–73.

259. Highton A, Quell J. Calcipotriene ointment 0.005% for psoriasis: A safety and efficacy study. J Am Acad Dermatol. 1995;32(1):67–72.

260. McKenna KE, Stern RS. Photosensitivity associated with combined UV-B and calcipotriene therapy. Arch Dermatol. 1995;131(11):1305–7.

261. Talpur R, Cox K, Duvic M. Efficacy and safety of topical tazarotene: a review. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2009;5(2):195–210.

262. Warren RB, Griffiths CEM. Systemic therapies for psoriasis: methotrexate, retinoids, and cyclosporine. Clin Dermatol. 2008;26(5):438–47.

263. Chan ESL, Cronstein BN. Methotrexate—how does it really work? Nat Rev Rheumatol. 2010;6(3):175–8.

264. Dalmarco EM. Análise da atividade antiinflamatória do metotrexato e da ciclosporina a, no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos [dissertação]. Florianópolis (SC): Universidade Federal de santa catarina; 2003.

265. Schreiber SL, Crabtree GR. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. Immunol Today. 1992;13(4):136–42.

266. Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stähelin H. Biological effects of cyclosporin A: A new antilymphocytic agent. Agents Actions. 1994;43(3–4):179–86.

267. Carneiro S. Psoríase: mecanismos de doença e implicações terapêuticas[dissertação]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2007.

268. Denise M, Takahashi F, Romiti R. Sociedade brasileira de dermatologia. Consenso brasileiro de psoríase. consenso brasileiro de psoríase. Guias de avaliação e tratamento. 2nd ed. Rio de Janeiro; 2012. 172 p.
269. Aydin F, Canturk T, Senturk N, Turanli AY. Methotrexate and ciclosporin combination for the treatment of severe psoriasis. Clin Exp Dermatol. 2006 Jun;31(4):520–4.
270. Kavanaugh A, van der Heijde D, McInnes IB, Mease P, Krueger GG, Gladman DD, et al. Golimumab in psoriatic arthritis: one-year clinical efficacy, radiographic, and safety results from a phase III, randomized, placebo-controlled trial. Arthritis Rheum. 2012;64(8):2504–17.
271. Mease PJ, Fleischmann R, Deodhar AA, Wollenhaupt J, Khraishi M, Kielar D, et al. Effect of certolizumab pegol on signs and symptoms in patients with psoriatic arthritis: 24-week results of a Phase 3 double-blind randomised placebo-controlled study (RAPID-PsA). Ann Rheum Dis. 2014;73(1):48–55.
272. Saurat JH, Stingl G, Dubertret L, Papp K, Langley RG, Ortonne JP, et al. Efficacy and safety results from the randomized controlled comparative study of adalimumab vs. methotrexate vs. placebo in patients with psoriasis (CHAMPION). Br J Dermatol. 2008;158(3):558–66.
273. Tyring S, Gordon KB, Poulin Y, Langley RG, Gottlieb AB, Dunn M, et al. Long-term safety and efficacy of 50 mg of etanercept twice weekly in patients with psoriasis. Arch Dermatol. 2007;143(6):719–26.
274. Reich K, Nestle FO, Papp K, Ortonne JP, Evans R, Guzzo C, et al. Infliximab induction and maintenance therapy for moderate-to-severe psoriasis: A phase III, multicentre, double-blind trial. Lancet. 2005;366(9494):1367–74.
275. Gottlieb AB, Blauvelt A, Thaçi D, Leonardi CL, Poulin Y, Drew J, et al. Certolizumab pegol for the treatment of chronic plaque psoriasis: Results through 48 weeks from 2 phase 3, multicenter, randomized, double-blinded, placebo-controlled studies (CIMPASI-1 and CIMPASI-2). J Am Acad Dermatol. 2018;79(2):302-314.e6.
276. Maia C, Takahashi M, Romiti R. Consenso Brasileiro de Psoríase - Guias de avaliação e tratamento Sociedade Brasileira de Dermatologia [Internet]. 2ª ed. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Dermatologia; 2012. 172 p. Available

from: http://formsus.datasus.gov.br/novoimgarq/24326/4057388_345331.pdf

277. Burmester GR, Mease P, Dijkmans BAC, Gordon K, Lovell D, Panaccione R, et al. Adalimumab safety and mortality rates from global clinical trials of six immune-mediated inflammatory diseases. Ann Rheum Dis. 2009;68(12):1863–9.

278. Dommasch ED, Abuabara K, Shin DB, Nguyen J, Troxel AB, Gelfand JM. The risk of infection and malignancy with tumor necrosis factor antagonists in adults with psoriatic disease: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. J Am Acad Dermatol. 2011;64(6).

279. Mariette X, Matucci-Cerinic M, Pavelka K, Taylor P, van Vollenhoven R, Heatley R, et al. Malignancies associated with tumour necrosis factor inhibitors in registries and prospective observational studies: a systematic review and meta-analysis. Ann Rheum Dis. 2011;70(11):1895–904.

280. Leonardi CL, Kimball AB, Papp KA, Yeilding N, Guzzo C, Wang Y, et al. Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 76-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 1). Lancet. 2008;371(9625):1665–74.

281. Gordon KB, Papp KA, Langley RG, Ho V, Kimball AB, Guzzo C, et al. Long-term safety experience of ustekinumab in patients with moderate to severe psoriasis (Part II of II): Results from analyses of infections and malignancy from pooled phase II and III clinical trials. J Am Acad Dermatol. 2012;66(5):742–51.

282. López-Sánchez C, Puig L. Guselkumab in the treatment of moderate-to-severe plaque psoriasis. Immunotherapy. 2020;12(6): 355–371.

283. Reich K, Papp KA, Blauvelt A, Tyring SK, Sinclair R, Thaçi D, et al. Tildrakizumab versus placebo or etanercept for chronic plaque psoriasis (reSURFACE 1 and reSURFACE 2): results from two randomised controlled, phase 3 trials. Lancet. 2017;390(10091):276–88.

284. Gordon KB, Strober B, Lebwohl M, Augustin M, Blauvelt A, Poulin Y, et al. Efficacy and safety of risankizumab in moderate-to-severe plxaaque psoriasis (UltIMMa-1 and UltIMMa-2): results from two double-blind, randomised,

placebo-controlled and ustekinumab-controlled phase 3 trials. Lancet. 2018;392(10148):650–61.

285. Langley RG, Elewski BE, Lebwohl M, Reich K, Griffiths CEM, Papp K, et al. Secukinumab in plaque psoriasis - Results of two phase 3 trials. N Engl J Med. 2014;371(4):326–38.
286. Gordon KB, Blauvelt A, Papp KA, Langley RG, Luger T, Ohtsuki M, et al. Phase 3 trials of ixekizumab in moderate-to-severe plaque psoriasis. N Engl J Med. 2016;375(4):345–56.
287. Blair HA. Brodalumab: A Review in Moderate to Severe Plaque Psoriasis. Drugs. 2018;78(4):495–504.
288. da Mota LMH, Cruz BA, Brenol CV, Pollak DF, Pinheiro G da RC, Laurindo IMM, et al. Safe use of biological therapies for the treatment of rheumatoid arthritisand spondyloarthritides. Rev Bras Reumatol. 2015;55(3):281–309.
289. Quartuccio L, Zabotti A, Del Zotto S, Zanier L, De Vita S, Valent F. Risk of serious infection among patients receiving biologics for chronic inflammatory diseases: Usefulness of administrative data. J Adv Res. 2019;19(15):87-93.
290. Blauvelt A, Lebwohl MG, Bissonnette R. IL-23/IL-17A Dysfunction Phenotypes Inform Possible Clinical Effects from Anti-IL-17A Therapies. J Invest Dermatol. 2015;135(8):1946–1953.
291. Shalom G, Zisman D, Bitterman H, Harman-Boehm I, Greenberg-Dotan S, Dreiher J, et al. Systemic therapy for psoriasis and the risk of herpes zoster: A 500000 person-year study. Dermatology. 2015;151(5):533-8.
292. Yogeeswari P, Sriram D. Betulinic Acid and Its Derivatives: A Review on their Biological Properties. Curr Med Chem. 2010;12(6):657–66.
293. Schühly W, Heilmann J, Calis I, Sticher O. New triterpenoids with antibacterial activity from Zizyphus joazeiro. Planta Med. 1999;65(8):740–3.
294. Fujioka T, Kashiwada Y, Kilkuskie RE, Cosentino LM, Ballas LM, Jiang JB, et al. Anti-AIDS agents, 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from Syzigium claviflorum, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids. J Nat Prod. 1994;57(2):243-7.
295. Li J, Jing JJ, Bai Y, Li Z, Xing R, Tan B, et al. SH479, a betulinic acid derivative, ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by regulating the T helper 17/regulatory T cell balance. Mol Pharmacol.

2017;91(5):464–74.

296. Suk Hyung Cho, Keith Gottlieb US. * EP000717983B1 *Cosmetic compositions containing betulinic acid [Internet]. Acesso em:20/4/20. Disponível em:https://patents.google.com/patent/EP0717983B1/em

297. Selzer E, Pimentel E, Wacheck V, Schlegel W, Pehamberger H, Jansen B, et al. Effects of betulinic acid alone and in combination with irradiation in human melanoma cells. J Invest Dermatol. 2000;114(5):935–40.

298. Selzer E, Thallinger C, Hoeller C, Oberkleiner P, Wacheck V, Pehamberger H, et al. Betulinic acid-induced Mcl-1 expression in human melanoma - Mode of action and functional significance. Mol Med. 2002;8(12):877–884.

299. Ali-Seyed M, Jantan I, Vijayaraghavan K, Bukhari SNA. Betulinic Acid: Recent Advances in Chemical Modifications, Effective Delivery, and Molecular Mechanisms of a Promising Anticancer Therapy. Chem Biol Drug Des. 2016;87(4):517–36.

300. Ríos JL, Máñez S. New Pharmacological Opportunities for Betulinic Acid. Planta Med. 2018;84(1):8–19.

301. Aiken C, Chen CH. Betulinic acid derivatives as HIV-1 antivirals. Trends Mol Med. 2005;11(1):31–6.

302. Wang S, Yang Z, Xiong F, Chen C, X C, J H, et al. Betulinic acid ameliorates experimental diabetic-induced renal inflammation and fibrosis via inhibiting the activation of NF-κB signaling pathway. Mol Cell Endocrinol. 2016;434:135–43.

303. Kim K, Lee D, Kim D, Yoon C, W K, Oh H, et al. Anti-Inflammatory Effects and Mechanisms of Action of Coussaric and Betulinic Acids Isolated from Diospyros kaki in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Macrophages. Molecules. 2016;21(9):1206.

304. Raju R, Gunawardena D, Ahktar M, Low M, Reddell P, Münch G. Anti-Inflammatory Chemical Profiling of the Australian Rainforest Tree Alphitonia petriei (Rhamnaceae). Molecules. 2016;21(11)1521.

305. Silva FSG, Oliveira PJ, Duarte MF. Oleanolic, Ursolic, and Betulinic Acids as Food Supplements or Pharmaceutical Agents for Type 2 Diabetes: Promise or Illusion? J Agric Food Chem. 2016;64(15):2991–3008.

306. Thomas C, Gioiello A, Noriega L, Strehle A, Oury J, Rizzo G, et al. TGR5-Mediated Bile Acid Sensing Controls Glucose Homeostasis. Cell Metab.

2009;10(3):167–177.

307. Quan HY, Kim DY, Kim SJ, Jo HK, Kim GW, Chung SH. Betulinic acid alleviates non-alcoholic fatty liver by inhibiting SREBP1 activity via the AMPK-mTOR-SREBP signaling pathway. Biochem Pharmacol. 2013;85(9):1330–40.
308. Vogel G, Vogel W. Drug discovery and evaluation: Pharmacological assays. 2ª ed. Berlag S, editor. Berlin; 2002. 1325 p.
309. Nickoloff BJ, Wrone-Smith T. Injection of pre-psoriatic skin with CD4+ T cells induces psoriasis. Am J Pathol. 1999;155(1):145–58.
310. McFarland KL, Klingenberg JM, Boyce ST, Supp DM. Expression of genes encoding antimicrobial proteins and members of the toll-like receptor/nuclear factor-??B pathways in engineered human skin. Wound Repair Regen. 2008;16(4):534–41.
311. Menter A, Korman NJ, Elmets CA, Feldman SR, Gelfand JM, Gordon KB, et al. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis. Section 3. Guidelines of care for the management and treatment of psoriasis with topical therapies. J Am Acad Dermatol. 2009;60(4):643–59.
312. Lebwohl M, Dinehart S, Whiting D, Lee PK, Tawfik N, Jorizzo J, et al. Imiquimod 5% cream for the treatment of actinic keratosis: Results from two phase III, randomized, double-blind, parallel group, vehicle-controlled trials. J Am Acad Dermatol. 2004;50(5):714–21.
313. Geisse JK, Rich P, Pandya A, Gross K, Andres K, Ginkel A, et al. Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: A double-blind, randomized, vehicle-controlled study. J Am Acad Dermatol. 2002;47(3):390–8.
314. Wu JK, Siller G, Strutton G. Psoriasis induced by topical imiquimod. Australas J Dermatol. 2004;45(1):47–50.
315. van der Fits L, Mourits S, Voerman JSA, Kant M, Boon L, Laman JD, et al. Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice Is Mediated via the IL-23/IL-17 Axis. J Immunol. 2009;182(9):5836–45.
316. Flutter B, Nestle FO. TLRs to cytokines: Mechanistic insights from the imiquimod mouse model of psoriasis. Eur J Immunol. 2013;43(12):3138–46.
317. Baek JO, Byamba D, Wu WH, Kim TG, Lee MG. Assessment of an imiquimod-induced psoriatic mouse model in relation to oxidative stress. Arch Dermatol

Res. 2012;304(9):699–706.

318. Kim HR, Lee A, Choi EJ, Hong MP, Kie JH, Lim W, et al. Reactive oxygen species prevent imiquimod-induced psoriatic dermatitis through enhancing regulatory T cell function. PLoS One. 2014;9(3):1–14.
319. Hawkes JE, Gudjonsson JE, Ward NL. The Snowballing Literature on Imiquimod-Induced Skin Inflammation in Mice: A Critical Appraisal. J Invest Dermatol. 2017;137(3):546–9.
320. Ministério da Saúde (Brasil), Diretrizes da prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle na Experimentação Animal. Brasília: 2013 p. 2–8.
321. David IMB, de Souza Fernandes F, dos Santos Silva Ferreira JB, Lüdtke DD, Martins DF, Bobinski F, et al. Dietary supplementation with procyanidin-rich Pinus pinaster extract is associated with attenuated Ehrlich tumor development in mice. Nutr Res. 2019;62:41–50.
322. Choleris E, Thomas AW, Kavaliers M, Prato FS. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: Effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. Neurosci Biobehav Rev. 2001;25(3):235–60.
323. Choleris E. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. Neurosci Biobehav Rev. 2001;25(3):235–60.
324. Yuan B, Wang X, Wang Z, Wei J, Qing C, Lu S. Comparison of fibrogenesis caused by dermal and adipose tissue injury in an experimental model. Wound Repair Regen. 2010;18(2):202–10.
325. Fraki J, Briggaman R, Lazarus G. Transplantation of psoriatic skin onto nude mice. J Invest Dermat. 1983;80:31s-35s.
326. Mayne JT, Johnson NJ, Kluwe WM, Lencoski DL, Polzer RJ. A study of the phototoxic potential of trovafloxacin in BALB/c mice. J Antimicrob Chemother. 1997;39 Suppl B:67–73.
327. Fernández I, Peña A, Del Teso N, Pérez V, Rodríguez-Cuesta J. Clinical biochemistry parameters in C57BL/6J mice after blood collection from the submandibular vein and retroorbital plexus. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2010;49(2):202–6.

328. Han BG, Hao C-M, Tchekneva EE, Wang Y-Y, Lee CA, Ebrahim B, et al. Markers of glycemic control in the mouse: comparisons of 6-h- and overnight-fasted blood glucoses to Hb A1c. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2008;295(4):E981-6.

329. Rowley PT. Williams Hematology. In: American journal of human genetics. Am J Hum Genet. 1995; 57(2): 514.

330. Dyer SM, Cervasio EL. An Overview of Restraint and Blood Collection Techniques in Exotic Pet Practice. Vet Clin North Am Exot Anim Pract. 2008;11(3):423-43.

331. Failace R. Hemograma: Manual de Interpretação. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2009. 425 p.

332. De Mello FB, Langeloh A, De Mello JRB. Toxicidade pré-clínica de fitoterápico contendo Passiflora alata, Erythrina mulungu, Leptolobium elegans e Adonis vernalis. Lat Am J Pharm. 2007;26(2):191–200.

333. Fernandes FS, da Silva GS, Hilel AS, Carvalho AC, Remor KVT, Schlindwein AD, et al. Study of the potential adverse effects caused by the dermal application of Dillenia indica L. fruit extract standardized to betulinic acid in rodents. PLoS One. 2019;14(5):e0217718.

334. Daniel W, Cross C. Biostatistics: a foundation for analysis in health sciences. 11ª ed. New York: John Wiley & Sons; 2018. 720 p.

335. Parmar KM, Itankar PR, Joshi A, Prasad SK. Anti-psoriatic potential of Solanum xanthocarpum stem in Imiquimod-induced psoriatic mice model. J Ethnopharmacol. 2017;198:158–66.

336. Hawkes J, Gudjonsson J, Ward N. The Snowballing Literature on Imiquimod-Induced Skin Inflammation in Mice: A Critical Appraisal. J Invest Dermatol. 2017;137(3):546–9.

337. Huang SJ, Hijnen D, Murphy GF, Kupper TS, Calarese AW, Mollet IG, et al. Imiquimod enhances ifn-γ production and effector function of T cells infiltrating human squamous cell carcinomas of the skin. J Invest Dermatol. 2009;129(11):2676–85.

338. Han G, Williams CA, Salter K, Garl PJ, Li AG, Wang J. Role of TGFβ signaling in the pathogenesis of psoriasis. J Invest Dermatol. 2010;130(2):371–7.

339. El-Khattouti A, Selimovic D, Hannig M, Taylor EB, Abd Elmageed ZY, Hassan SY, et al. Imiquimod-induced apoptosis of melanoma cells is mediated by ER stress-dependent Noxa induction and enhanced by NF-κB inhibition. J Cell Mol Med. 2016;20(2):266–86.
340. Chamcheu JC, Adhami VM, Esnault S, Sechi M, A. I, Siddiqui1, et al. Dual inhibition of PI3K/Akt and mTOR by the Dietary Antioxidant Delphinidin Ameliorates Psoriatic Features In-vitro and in an Imiquimod-induced Psoriasis-like Disease in Mice. Antioxid Redox Signal. 2017;10(26):49–69.

ANEXO A - Parecer aprovação do Comitê de Ética

CEUA Comissão de Ética no Uso de Animais

UNISUL

Pró Reitoria de Ensino, Pesquisa, Pós-Graduação, Extensão e Inovação
Comissão de Ética no Uso de Animais (Res. CONSUN 46/2009)

Palhoça, 16 de Agosto de 2018
Registro na CEUA (código): 17.015.4.01.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Maicon Roberto Kviecinski

Prezado(a),

Viemos por meio deste, certificar que a emenda proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Avanço no desenvolvimento de um fitoterápico inovador para psoríase: Fase de validação de princípio ativo e teste de formas farmacêuticas", registrada com o n°17.015.4.01.IV, sob a responsabilidade de Maicon Roberto Kviecinski - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) desta Instituição, em reunião de 16 de Agosto de 2018.

A CEUA/UNISUL tem por finalidade cumprir e fazer cumprir, no âmbito da UNISUL e nos limites de suas atribuições, os dispostos na legislação Federal aplicável à criação, manutenção e a utilização de animais em atividades de ensino e de pesquisa, realizadas pelos corpos docente, discente e técnico-administrativo da UNISUL e pesquisadores de outras instituições, caracterizando-se a sua atuação como educativa, consultiva, de assessoria e fiscalização nas questões relativas à matéria, sob os aspectos: I - Ético; II - Legal: enquadramento na legislação vigente.

Gostaríamos de salientar que, embora aprovado, qualquer alteração dos procedimentos e metodologias que houver durante a realização do projeto em questão, deverá ser informada imediatamente à Comissão.

Atenciosamente,

Prof. Sandro Melim Sgrott
Coordenador da Comissão

UNISUL - *Campus* Grande Florianópolis,
Avenida Pedra Branca, 25, Cidade Universitária, CEP 88137-270, Palhoça, SC.
Fone: (48) 3279-1036 / E-mail: ceua@unisul.br

ANEXO B – Produção científica publicada durante o período do doutorado

Uso do fruto de *Dillenia indica* L. com propósito anti-inflamatório por participantes dos grupos da terceira idade e pastorais da saúde na região sul de Santa Catarina, Brasil

KVIECINSKI, M.R.[1]; NUNES, L.F.[2]; FELISBERTO, S.E.[2]; FERNANDES, F.S.[1]; DAVID, I.M.B.[1]; TRABOLD, L.A.[1]; DA SILVA, J.[1]; SCHLINDWEIN, A.D.[1]; KANIS, L.A.[1], REMOR, K.V.T.[3]; GRINEVÍCIUS, V.M.A.S.[1]; PEDROSA, R.C.[3]

*[1]Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS), Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL). Campus Pedra Branca, Palhoça, Brasil. [2]Curso de Farmácia, Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL). Campus Tubarão, Brasil. [3]Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Florianópolis, Brasil. *E-mail: maicon.kviecinski@gmail.com ou maicon.kviecinski@unisul.br*

RESUMO: Na região sul de Santa Catarina (Brasil) é possível ouvir alegações populares sobre importantes propriedades anti-inflamatórias curativas de *Dillenia indica* L. O objetivo do presente trabalho foi realizar um estudo etnofarmacológico para avaliar o uso popular de *Dillenia indica* L. com fins medicinais, registrando o nome popular mais utilizado para reconhecimento da espécie por pessoas participantes dos grupos da terceira idade e pastorais da saúde na região sul do estado de Santa Catarina (Brasil). Uma amostra não probabilística intencional de pessoas (n=111) foi entrevistada utilizando um questionário criado pelos autores inspirado em estudos anteriores. Foram incluídas questões referentes ao perfil dos entrevistados (sexo, idade, número de filhos/netos, município da residência em área rural ou urbana) e ao uso de plantas medicinais, incluindo *Dillenia indica* L., o nome comum atribuído à espécie, as partes da planta utilizadas, as formas de preparo, o modo de administração e a frequência de uso em caso de necessidade. A grande maioria dos entrevistados, domiciliados em zona rural ou urbana, afirmou utilizar plantas medicinais no seu dia-a-dia e reconheceu *Dillenia indica* L. pelo nome comum "Coco-de-Adão" (>95%). Os resultados indicaram uma alta frequência de pessoas que relataram conhecer e usar o fruto de *Dillenia indica* L. para preparar garrafadas, principalmente macerações etanólicas para uso **tópico** no tratamento de inflamações superficiais ou cutâneas (57%), dores nas articulações (48%), dores musculares (27%), feridas (17%) e psoríase (2%), sendo que alguns entrevistados alegaram mais que uma das finalidades mencionadas. A maioria dos entrevistados relatou considerar apropriado administrar as preparações em uma frequência entre duas a três vezes por dia. Concluindo, este estudo registrou relatos populares que apoiam e incentivam o desenvolvimento de pesquisas para avaliação da atividade anti-inflamatória de substâncias presentes principalmente no fruto de *Dillenia indica* L.

Palavras-chave: *Dillenia indica* L., Uso popular medicinal, Anti-inflamatório, Maçã de Elefante, Coco-de-Adão.

ABSTRACT: Traditional use of *Dillenia indica* L. fruits with anti-inflammatory purposes by participants of the elderly and pastoral healthcare groups in the Southern region of Santa Catarina, Brazil. In the Southern region of Santa Catarina (Brazil) people claims some important curative anti-inflammatory properties of *Dillenia indica* L. The aim of this study was to perform an ethnopharmacological study to evaluate the traditional use of parts of *Dillenia indica* L. for medicinal purposes and to identify the most popular vernacular name used for recognition of the species by people participating in the groups of seniors and health pastoral in Santa Catarina state in Brazil. A non-probabilistic sample of people was interviewed using a questionnaire created by the authors inspired by previous studies. Questions were asked addressing the respondent's profile (age, gender, number of children/ grandchildren and type of residence, rural or urban) and the use of medicinal plants, including *Dillenia indica* L., its vernacular name, the plant parts used, how it is prepared and how often to use in case of need. Respondents recognized the plant by the local name "Coco-de-Adão." The results revealed a high frequency of people who reported recognition and use of fruits of *Dillenia indica* L. (> 95

Recebido para publicação em 13/06/2016
Aceito para publicação em 20/03/2017

10.1590/1983-084X/ 0081

Pharmaceutical Biology

ISSN: 1388-0209 (Print) 1744-5116 (Online) Journal homepage: http://www.tandfonline.com/loi/iphb20

Healing effect of Dillenia indica fruit extracts standardized to betulinic acid on ultraviolet radiation-induced psoriasis-like wounds in rats

Maicon Roberto Kviecinski, Isabela Machado Barbosa David, Flávia de Souza Fernandes, Marina dos Reis Correa, Morgana Miranda Clarinda, Amanda Fernandes Freitas, Jane da Silva, Marta Gava, Simony Davet Müller, Drielly Florentino, Fabrícia Petronilho, Diego Moterle, Luiz Alberto Kanis & Rozangela Curi Pedrosa

To cite this article: Maicon Roberto Kviecinski, Isabela Machado Barbosa David, Flávia de Souza Fernandes, Marina dos Reis Correa, Morgana Miranda Clarinda, Amanda Fernandes Freitas, Jane da Silva, Marta Gava, Simony Davet Müller, Drielly Florentino, Fabrícia Petronilho, Diego Moterle, Luiz Alberto Kanis & Rozangela Curi Pedrosa (2017) Healing effect of Dillenia indica fruit extracts standardized to betulinic acid on ultraviolet radiation-induced psoriasis-like wounds in rats, Pharmaceutical Biology, 55:1, 641-648, DOI: 10.1080/13880209.2016.1266672

To link to this article: http://dx.doi.org/10.1080/13880209.2016.1266672

© 2016 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

Published online: 12 Dec 2016.

Submit your article to this journal

Article views: 62

View related articles

View Crossmark data

Tropical Journal of Pharmaceutical Research December 2016; 15 (12): 2595-2602
ISSN: 1596-5996 (print); 1596-9827 (electronic)
© Pharmacotherapy Group, Faculty of Pharmacy, University of Benin, Benin City, 300001 Nigeria.
All rights reserved.

Available online at http://www.tjpr.org
http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v15i12.9

Original Research Article

Ehrlich ascites tumor-bearing mice treated with aqueous ethanol plant extract from Euphorbia tirucalli showed signs of systemic toxicity

Maicon R Kviecinski[1,2]*, Júlia R dos Santos[2], Bruna G Magagnin[2], Marina R Correa[2], Morgana M Clarinda[2], Luciana A Trabold[1], Isabela MB David[1], Flávia S Fernandes[1], Jane da Silva[3], Luiz A Kanis[1,2], Eduardo B Parisotto[4], Luiza SEW Castro[4], Fabiana O da Silva[4] and Rozangela C Pedrosa[4]

[1]Postgraduate Program in Health Sciences, Universidade do Sul de Santa Catarina, Palhoça, SC, [2]Pharmacy School, Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, SC, [3]Allergy Service, University Hospital Professor Polydoro de São Thiago, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianopolis, SC, [4]Department of Biochemistry, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

For correspondence:* ***Email:* *maiconkviecinski@gmail.com;* ***Tel:*** *+55 48 32791167*

Received: 17 September 2016 *Revised accepted: 22 November 2016*

Abstract

Purpose: *To evaluate the antitumor effect of a latex extract from Euphorbia tirucalli Linn. (Euphorbiaceae) and its toxicity.*
Methods: *Aqueous ethanol and petroleum ether extracts were obtained through maceration. Maximum tolerated dose was determined in healthy mice. Antitumor activity was measured in Ehrlich ascites tumor-bearing mice treated with the extract through intraperitoneal injection (62.5, 125 or 250 mg/kg) every 48 h (four doses). Efficacy was assessed by weight gain, abdominal circumference, volume of ascitic fluid and packed tumor cells, tumor cell viability and survival. Toxicity indicators were serum glucose, triglycerides, total proteins, activity of alanine and aspartate aminotransferases and mass of heart, spleen, kidney and liver. A hemolysis assay was also performed.*
Results: *Doses of 62.5 and 125 mg/kg caused no antitumor activity, while 250 mg/kg dose reduced weight gain (3-fold), abdominal circumference and volume of ascitic fluid (> 50 %) and packed cells (50 %), but lowered tumor cell viability (40 %). However, mice treated with the extract survived for a shorter time than control mice. Furthermore, the 250 mg/kg dose caused cardiac atrophy, splenomegaly and fasting hyperglycemia. The extract caused hemolysis, and the half-maximal effective concentration (EC_{50}) was 1.6 (0.9 – 2.7) mg/mL.*
Conclusion: *Euphorbia tirucalli extract inhibits Ehrlich ascites tumor in mice, but the therapeutic dose is also harmful to non-tumor tissues.*

Keywords: *Euphorbia tirucalli, Ehrlich ascites tumor-bearing mice, Antitumor, Toxicity, Cardiac atrophy, Splenomegaly*

Tropical Journal of Pharmaceutical Research is indexed by Science Citation Index (SciSearch), Scopus, International Pharmaceutical Abstract, Chemical Abstracts, Embase, Index Copernicus, EBSCO, African Index Medicus, JournalSeek, Journal Citation Reports/Science Edition, Directory of Open Access Journals (DOAJ), African Journal Online, Bioline International, Open-J-Gate and Pharmacy Abstracts

INTRODUCTION

Some ethnobotanical articles reported that people from different communities and rural workers in Brazil have used the latex of *Euphorbia tirucalli* Linn. (Euphorbiaceae) for the traditional treatment of cancer. In most cases, the recommendation is to dilute some drops of latex into water and take it orally [1-3]. In Brazil, *Euphorbia tirucalli* (*E. tirucalli*) is known as

Accepted Manuscript

Dietary supplementation with procyanidin-rich Pinus pinaster extract is associated with attenuated Ehrlich tumor development in mice

Isabela Machado Barbosa David, Flávia de Souza Fernandes, Juliana Barreto dos Santos Silva Ferreira, Daniela Dero Lüdtke, Daniel Fernandes Martins, Franciane Bobinski, Thiago Bezerra Gaspar Carvalho da Silva, Luiza Daux Buffon, Maria Biatriz Rodrigues Kopper, Gustavo Silveira da Silva, Rodrigo Costa Zeferino, Rozangela Curi Pedrosa, Maicon Roberto Kviecinski

PII: S0271-5317(17)31044-8
DOI: https://doi.org/10.1016/j.nutres.2018.11.005
Reference: NTR 7960

To appear in: *Nutrition Research*

Received date: 13 November 2017
Revised date: 28 August 2018
Accepted date: 8 November 2018

Please cite this article as: Isabela Machado Barbosa David, Flávia de Souza Fernandes, Juliana Barreto dos Santos Silva Ferreira, Daniela Dero Lüdtke, Daniel Fernandes Martins, Franciane Bobinski, Thiago Bezerra Gaspar Carvalho da Silva, Luiza Daux Buffon, Maria Biatriz Rodrigues Kopper, Gustavo Silveira da Silva, Rodrigo Costa Zeferino, Rozangela Curi Pedrosa, Maicon Roberto Kviecinski , Dietary supplementation with procyanidin-rich Pinus pinaster extract is associated with attenuated Ehrlich tumor development in mice. Ntr (2018), https://doi.org/10.1016/j.nutres.2018.11.005

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Free Radical Biology and Medicine
Volume 120, Supplement 1, 20 May 2018, Page S56

P-37 - *Tropaeolum majus* L. extract rich in anthocyanins reduces oxidative damage in psoriasis-like wounds in mice accelerating healing

Juliana B.S.S. Ferreira [1, 2], Fláv ia S. Fernandes [1, 2], Gustavo S. Silva [1, 2], Maicon R. Kviecinski [1, 2], Rozangela C. Pedrosa [1, 2]

⊞ Show more

https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.184

Get rights and content

Psoriasis pathogenesis includes immune activ
plant rich in antioxidant anthocyanins. This st
majus extracts on psoriasis-like wounds. The e
were obtained by maceration. Their anthocyan
method. Mice were allocated in normal and ne
glycerol and groups receiving extract (50 mg/m
half of each group was euthanized to collect sk
peroxidation, protein carbonylation and reduced glutathione (GSH). The other half was kept to determine the time for wounds' clearance. Anthocyanins concentration was 0.6 ± 0.1; 6.9 ± 0.9 and 10.9 ± 0.6 mg/g in ethyl acetate, ethanolic and hydroethanolic extracts. Wounds severity was reduced by 35% and up to 45% by the ethanolic and hydroethanolic extracts, as well as the time for clearance. Concentration of TNF-α and IL-1β was normalized by these extracts, along with lipid peroxidation and protein carbonylation. Extracts caused recovery of GSH, mainly the hydroethanolic one. The antipsoriatic activity was associated with antioxidant action.

Start tracking your Reading History

Sign in and never lose track of an article again.

Register for free >

A Construção de Identidade(s) Profissional(is) de Formandos em Educação Física

The Build of Professional Identity(ies) of Physical Education Graduates

Alexandre Vanzuita
Universidade Federal do Paraná e
Instituto Federal Catarinense
alexandre.vanzuita@ifc.edu.br

Tânia Regina Raitz
Universidade do Vale do Itajaí
raitztania@gmail.com

Mara Regina Zluhan
Avantis
mara.zluhan@avantis.edu.br

Danilo José Ferreira
Instituto Federal Catarinense Campus Camboriú
danilo.ferreira@ifc.edu.br

Flávia De Souza Fernandes
Instituto Federal Catarinense Campus Camboriú
flavia.fernandes@ifc.edu.br

PAJAR 2019 volume 7 number 1 e32090
http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/pajar/

Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul
Institute of Geriatrics and Gerontology
Biomedical Gerontology Graduate Program

https://doi.org/10.15448/2357-9641.2019.1.32090

PAJAR
Pan American Journal of Aging Research

ORIGINAL ARTICLE Open Access

Instituições de longa permanência e centros dia para idosos em Camboriú e Balneário Camboriú-SC

Long-term institutions and day centers for the elderly in Camboriú and Balneário Camboriú-SC

Instituciones de larga permanencia y centros de día para mayores en Camboriú y Balneario Camboriú-SC

Alessandra Domingues Malheiro [1] ✉, **Daiana Caroline Prestes Feil** [2], **Paulo Roberto Ribeiro Nunes** [1], **Maria Inês Conceição da Silva** [1], **Flávia de Souza Fernandes** [1]

[1] Instituto Federal Catarinense – IFC. Videira, SC, Brasil.
[2] Secretaria da Pessoa Idosa da Prefeitura de Balneário Camboriú. Balneário Camboriú, SC, Brasil.

ARTICLE INFO

Article history
Received: 29/09/2018
Accepted: 28/12/2018
Published: 21/05/2019

✉ ***Correspondent Author***
Alessandra Domingues Malheiro
Rua Santa Catarina, 118 ap. 08 – Centro
89560000, Videira, SC, Brasil
alessandramalheiro1979@gmail.com

© *2019 All rights reserved*

Editors
Alfredo Cataldo Neto
Paula Engroff

RESUMO

OBJETIVO: O presente estudo teve como objetivo geral analisar as instituições asilares e lares dia dos municípios de Camboriú-SC e Balneário Camboriú-SC.

MÉTODO: Trata-se de estudo descritivo. Foram realizadas entrevistas com os dirigentes das clínicas. Os entrevistados responderam perguntas abertas e fechadas sobre a modalidade e natureza dos locais, capacidade de atendimento, ocupação das vagas, estrutura e características gerais dos moradores, entre outras.

RESULTADOS: Verificou-se que a maior parte dos moradores tem mais de 70 anos e são mulheres. Foi encontrado apenas um local que oferecia a modalidade Centro Dia, e era privado.

CONCLUSÃO: Como oferta do poder público identificou-se a Secretaria da Pessoa Idosa em Balneário Camboriú que oferece mais de 80 oficinas voltadas para idosos com pouca ou nenhuma dependência.

PALAVRAS-CHAVE: Instituição de Longa Permanência para Idosos; Centros-Dia de Assistência à Saúde para Adultos; Idoso.

ABSTRACT

AIM: The present study had as general objective to analyze the asylum and daycare institutions of the municipalities of Camboriú-SC and Balneário Camboriú-SC.

METHOD: This is a descriptive study. Interviews were conducted with clinic leaders. Respondents answered open and closed questions about the modality and nature of the places, capacity of attendance, occupancy of vacancies, structure and general characteristics of the residents, among others.

RESULTS: It has been found that most of the residents are over 70 and are women. It was found only one place that offered the modality home day and was private.

CONCLUSION: As an offer of public power, the Secretariat of the Elderly Person in Balneário Camboriú was identified, offering more than 80 workshops aimed at the elderly with little or no dependency.

KEYWORDS: Homes for the Aged; Adult Day Care Centers; Elderly.

RESUMEN

OBJETIVO: El presente estudio tuvo como objetivo general analizar las instituciones asilares y hogares de día de las ciudades de Camboriú-SC y Balneario Camboriú-SC.

This work is licensed under a Creative Commons – Attribution 4.0 International.
http://creativecommons.org/licenses/by/4.0

Relato de Experiência

Atividades educativas de primeiros socorros para estudantes de escolas públicas de Camboriú - SC

Alessandra Domingues Malheiro – alessandra.malheiro@ifc.edu.br
Flávia de Souza Fernandes– flavia.fernandes@ifc.edu.br

RESUMO

Trata-se de projeto de extensão que teve como objetivo desenvolver oficinas de primeiros socorros junto a estudantes do ensino fundamental de escolas públicas do município de Camboriú (SC). As oficinas foram elaboradas e aplicadas por alunos do curso de Técnico de Segurança do Trabalho do Instituto Federal Catarinense (IFC), câmpus Camboriú, com orientação e supervisão das professoras do curso. As atividades foram importantes para a comunidade, pois os alunos do curso Técnico de Segurança do Trabalho do IFC tiveram a oportunidade de aprimorar conhecimentos adquiridos na disciplina de primeiros socorros e atuaram como multiplicadores nas escolas de ensino fundamental do município, preparando outros estudantes para que possam ajudar suas famílias e comunidades em situações de urgência/emergência.

PALAVRAS-CHAVE

Primeiros socorros. Escolas. Estudantes.

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

Study of the potential adverse effects caused by the dermal application of *Dillenia indica* L. fruit extract standardized to betulinic acid in rodents

Flávia S. Fernandes, Gustavo S. da Silva, Alexandre S. Hilel, Ana C. Carvalho, Karina V. T. Remor, Aline D. Schlindwein, Luiz A. Kanis, Daniel F. Martins, Maicon R. Kviecinski*

Universidade do Sul de Santa Catarina, Postgraduate Program in Health Sciences, Palhoça, Santa Catarina, Brazil

* maicon.kviecinski@gmail.com, maicon.kviecinski@unisul.br

Check for updates

OPEN ACCESS

Citation: Fernandes FS, da Silva GS, Hilel AS, Carvalho AC, Remor KVT, Schlindwein AD, et al. (2019) Study of the potential adverse effects caused by the dermal application of *Dillenia indica* L. fruit extract standardized to betulinic acid in rodents. PLoS ONE 14(5): e0217718. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217718

Editor: Hans-Joachim Lehmler, University of Iowa, UNITED STATES

Received: February 18, 2019

Accepted: May 16, 2019

Published: May 31, 2019

Copyright: © 2019 Fernandes et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All data was shown in the manuscript.

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

This study aimed to evaluate the potential adverse effects of the dermal administration of *Dillenia indica* Linnaeus (*D. indica*) fruit extract in healthy rodents; the extract was standardized to betulinic acid. In the initial phase, the acute effects were evaluated on the skin application site of a single extract dose. A skin irritation test was performed in male *Wistar* rats (n = 8/group) receiving the extract (50–150 mg/mL) with betulinic acid (0.5–1.5%, respectively). A photosensitivity test was performed in male BALB/c mice (n = 6/group) receiving the extract (150 mg/mL). Afterwards, other BALB/c mice (n = 20, male:female, 1:1) were used to assess the systemic alterations caused by 14 daily repeated doses (150 mg/mL) by monitoring the effects on mortality, body morphology, behavior, nutrition status, neuromotor reactions, organ morphology and weight, and blood tests. At this time, 0.5 mg/mL clobetasol was used as the positive control. The skin irritation index suggested that negligible skin irritation had occurred, even when the extract was applied to the rat skin at 150 mg/mL. However, the extract acted as a photosensitizer on mouse skin, showing a photosensitizing activity close to that of 10 mg/mL 5-methoxypsoralen. Repeated doses caused no mouse mortality, aggressiveness, piloerection, diarrhea, convulsions, neuromotor alterations or nutrition status changes. The mouse organ weights did not change, and the mice did not have alterations in their blood compositions. Clobetasol caused a reduction in the mononuclear leukocyte numbers. In general, the data suggest that the extract was safe in healthy rodents but indicate that caution should be taken with the photosensitizing activity; in addition, this activity should be further explored as it may be useful for phototherapeutic drug development.

Introduction

This work was originated from an interest in natural products that could be sources of innovative drugs for the treatment of immune-mediated dermatological disorders, such as psoriasis. Psoriasis is currently the most prevalent autoimmune disease worldwide [1,2]. The available

CAPÍTULO 1

A ENFERMAGEM NA PROMOÇÃO DA SAÚDE BUCAL DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE DIABETES MELLITUS

Flávia de Souza Fernandes
Enfermeira Mestre em Ciências da Saúde. Professora básico, técnico e tecnológico do Instituto Federal Catarinense- Campus Camboriú

Hevelin Aline da Silva
Enfermeira Especialista em Auditoria (MBA). Representante de produtos hospitalares (FUFA/SC)

Ana Cristina Oliveira da Silva Hoffmann
Enfermeira Mestre em Saúde e Gestão do Trabalho, Coordenadora do Curso de Enfermagem do Centro Universitário Estácio de SC.

RESUMO: Esta pesquisa apresenta uma análise conceitual sobre o tratamento e as orientações que são fornecidas aos usuários do Serviço Único de Saúde – SUS durante uma consulta de enfermagem. Buscou-se, através de pesquisa qualitativa de caráter descritivo exploratório, apresentar dados efetivos da saúde bucal de indivíduos portadores de Diabetes Mellitus, usuários de uma Unidade Básica de Saúde do município de Biguaçu, e a atuação do profissional de enfermagem na promoção da saúde bucal, bem como identificar possíveis falhas e procedimentos inadequados para que estes possam ser analisados e possivelmente corrigidos. Tal preocupação se dá ao fato de a doença Diabetes Mellitus ser considerada uma das principais doenças crônicas que afetam o homem moderno. Através de uma revisão bibliográfica apresentou-se conceitos e práticas que possibilitaram embasar um melhor entendimento desta doença, a fim de facilitar a análise dos dados expostos pelos proponentes da pesquisa, bem como entender e estudar ações de outros profissionais que obtiveram sucesso num tratamento adequado e de qualidade para seus usuários. Para implementação deste estudo, utilizamos como instrumento um questionário de caráter semi-estruturado com perguntas abertas e fechadas. Durante a análise dos dados, percebemos a falta de orientação e pouco conhecimento sobre a saúde bucal dos entrevistados, pois, quando perguntados sobre a técnica correta de escovação, grande parte dos entrevistados não sabia e quando perguntados sobre a importância da escovação dentária relacionado com o Diabetes Mellitus, cinco responderam que não tinham esse conhecimento. Além disso, evidenciou-se que as orientações e os cuidados neste âmbito não foram realizadas durante a consulta de enfermagem e que a participação do enfermeiro na promoção da saúde bucal dos pacientes portadores dessa doença não está fortemente relacionada como o preconizado pelo ministério da saúde, que diz que os profissionais de saúde devem ter

21 - A CONSTRUÇÃO DE IDENTIDADE(S) PROFISSIONAL(IS) DE FORMANDAS EM PEDAGOGIA

ALEXANDRE VANZUITA, IDORLENE DA SILVA HOEPERS,
FABIOLA SANTINI TAKAYAMA, FLÁVIA DE SOUZA FERNANDES
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense,
Camboriú, Santa Catarina, Brasil, alexandre.vanzuita@ifc.edu.br

doi:10.16887/90.a1.21

Introdução

Nos últimos anos, investigações realizadas por Vanzuita (2016a; 2016b); Vanzuita; Raitz (2016), Vanzuita (2018a; 2018b) analisaram a relação da pesquisa como princípio educativo nos processos de formação inicial e inserção profissional com a finalidade de considerar como essa articulação contribuiu na construção de identidade(s) profissional(is). Na presente pesquisa, considerou-se relevante analisar o contexto da formação inicial e inserção profissional de formandas do curso de Licenciatura em Pedagogia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense – IFC Campus Camboriú, uma vez que a perspectiva da pesquisa como princípio educativo e criação de métodos e metodologias são experimentados de maneira não integral no processo formativo e de inserção profissional nas pesquisas referenciadas.

O desenvolvimento da presente investigação foi orientado a partir da seguinte questão problema: Como as experiências de formação inicial e inserção profissional de formandas em Pedagogia do IFC Campus Camboriú contribuem para a construção de identidade(s) profissional(is)?

Objetivos

O objetivo geral da presente pesquisa delimitou-se da seguinte forma: Analisar como as experiências no contexto de formação inicial e inserção profissional de formandas em Pedagogia do IFC Campus Camboriú contribuem para a construção de identidade(s) profissional(is). Elaborou-se os objetivos específicos: Descrever o contexto de formação inicial em Pedagogia das formandas do IFC Campus Camboriú; Caracterizar as experiências das formandas em Pedagogia no seu contexto de formação inicial e inserção profissional; Identificar se existe a articulação dos processos de pesquisa e criação de métodos e metodologias na construção de identidade(s) profissional(is).

Metodologia

A abordagem da presente pesquisa é qualitativa de caráter analítico-descritiva e interpretativa. A produção de dados aconteceu por meio de um grupo focal (GATTI, 2012) realizado com formandas do curso de Licenciatura em Pedagogia do IFC Campus Camboriú no ano de 2018 e análise documental do Projeto Pedagógico de Curso (PPC, 2018).

No processo de análise dos dados foram criadas as unidades de análise, posto que durante a leitura da transcrição dos depoimentos foram revelando-se as relações e aproximações relativas aos processos de formação inicial e inserção profissional. No desenvolvimento desse trabalho, criou-se as unidades de análise de maneira intuitiva, permitindo relacionar os conteúdos discutidos no grupo focal.

A presente investigação foi submetida no dia 28 de maio de 2018, por meio de projeto de pesquisa, ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) do IFC Campus Camboriú. Sem ressalvas foi aprovada, na data de 12 de julho de 2018, com o número do parecer 2.770.213 e registro CAAE 90413818.8.0000.8049.

Foram selecionadas(os) onze (11) formandas do sétimo período do curso. Levou-se em consideração como critérios de escolha três dimensões: a) estar no último ano do curso de Licenciatura em Pedagogia; b) ser assídua durante o processo formativo; e c) disponibilidade de participação na técnica do grupo focal.

Para manter o sigilo das participantes, inventou-se códigos de nomes relacionados a espécies de "flores", no sentido de preservar a identidade pessoal e profissional das formandas do curso de Licenciatura em Pedagogia do IFC Campus Camboriú (Quadro 1). No quadro abaixo descreveu-se os nomes criados, local de nascimento e a idade das formandas. O grupo é heterogêneo com relação as experiências de educação, assim como com relação as experiências profissionais. Grande parte das formandas já trabalha na área da educação.

Quadro 1

Códigos criados pelos pesquisadores	Local de Nascimento	Idade
Margarida	Vacaria (RS)	43
Bromélia	Itajaí (SC)	46
Cravo	Monte (SC)	24
Hortência	Itajaí (SC)	23
Orquídea	Curitiba (PR)	21
Begônia	Brasília (DF)	54
Rosa	Camboriú (SC)	23
Camélia	Tijucas (SC)	38
Azaleia	Remanso (BA)	32
Amarílis	Camboriú (SC)	21
Crisântemo	Cornélio Procópio (PR)	25

Fonte: Dados obtidos pelos pesquisadores por meio do grupo focal.

Foi possível categorizar os dados levantados no grupo focal, tendo como base outras pesquisas (VANZUITA, 2016a; VANZUITA, 2018a; 2018b). Neste sentido, o presente texto apresentará os resultados e discussões a seguir.

Resultados e Discussões

Com o intuito de elucidar os dados coletados, se fez necessário descrever o campo no qual as formandas estavam inseridos, isto é, o IFC Campus Camboriú. Para tanto, recorreu-se ao PPC (2018) reelaborado pelo colegiado do curso no período de 2016 a 2018. Neste sentido, analisou-se nesse documento os aspectos a seguir: os objetivos de formação, o perfil dos egressos, a concepção na qual o curso está filiada e os métodos utilizados para produzir a aprendizagem.

Contextualização do Curso de Licenciatura em Pedagogia do IFC

Conforme o PPC (2018), a Licenciatura em Pedagogia do IFC – Campus Camboriú, fomenta, de forma particular, a construção da formação inicial no sentido de possibilitar experiências relacionadas à docência, assim como experiências de pesquisa e construção de conhecimento. Para tal, propõe articular ensino, pesquisa e extensão como fator imprescindível no

Editora CRV
Compartilhando informações e experiências por um mundo melhor!

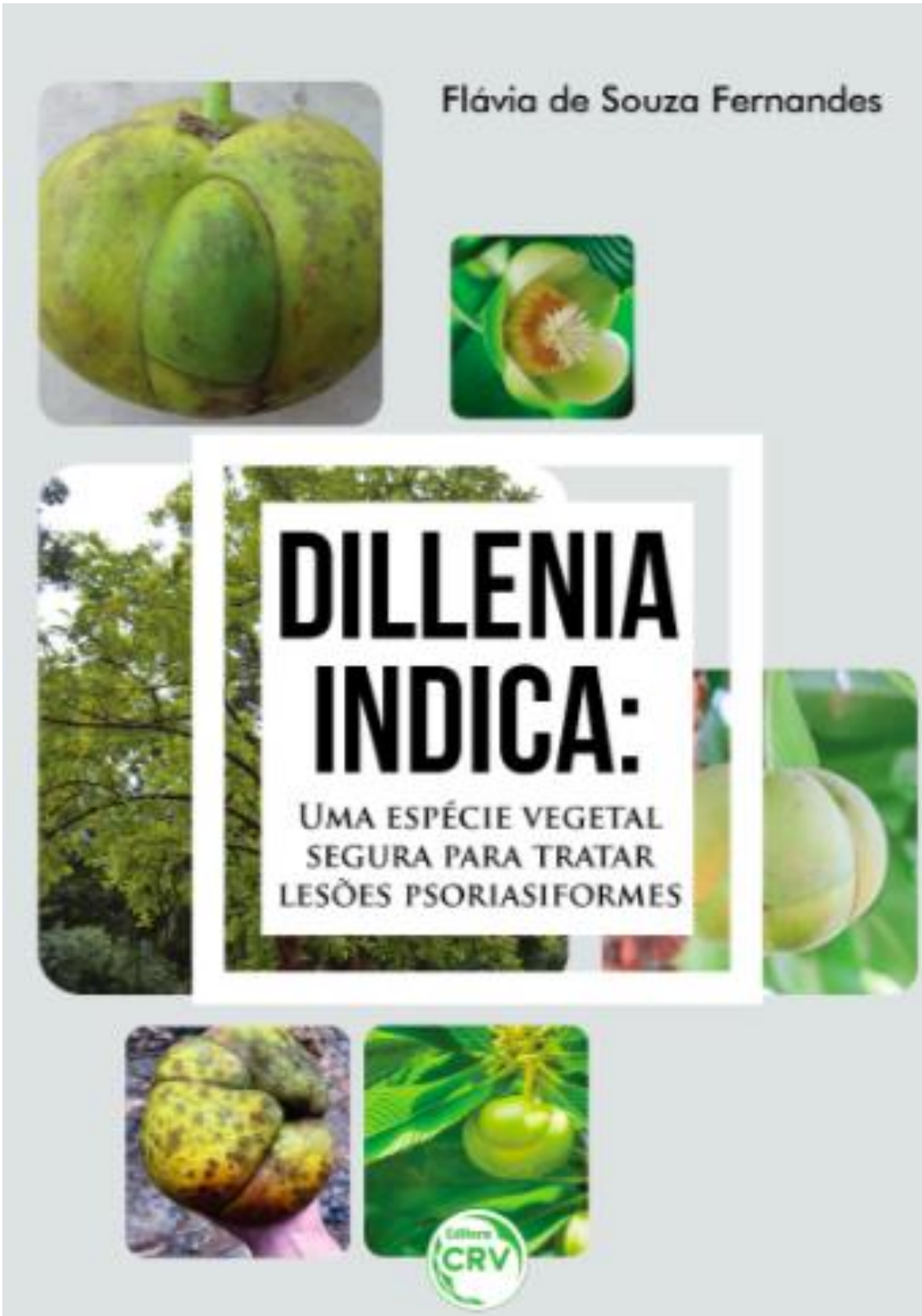
DECLARAÇÃO

Declaramos a quem possa interessar que a professora **FLAVIA DE SOUZA FERNANDES** é autora do livro intitulado **"DILLENIA INDICA: UMA ESPÉCIE VEGETAL SEGURA PARA TRATAR LESÕES PSORIASIFORMES", ISBN 978-85-444-3588-5** apreciado e aceito pelo nosso Conselho Editorial, previsto para ser publicado em 2019.

Curitiba, 03 de setembro de 2019.

Por ser verdade, assino

Railson Moura
CPF: 901.417.256-72
Editor-Chefe
Editora CRV Ltda.


Flávia de Souza Fernandes
DILLENIA INDICA:
UMA ESPÉCIE VEGETAL SEGURA PARA TRATAR LESÕES PSORIASIFORMES
CRV

Editora CRV
Compartilhando informações e experiências por um mundo melhor!

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que o livro intitulado "**PERCEPÇÃO DOS IDOSOS FRENTE AS POLÍTICAS PÚBLICAS OFERECIDAS NO MUNICÍPIO DE BALNEÁRIO CAMBORIÚ**" foi apreciado e revisto entre os pares, aceitos pelo nosso Conselho Editorial e Científico, sendo publicado pela Editora CRV no ISBN 978-85-444-3943-2.

Atenciosamente,

Railson Moura
Editor-Chefe
Editora CRV Ltda.

Alexandre Vanzuita

Professor do Instituto Federal Catarinense (Programa de Pós-Graduação em Educação) e Pós-Doutor em Educação.

Flávia de Souza Fernandes

Professora do Instituto Federal Catarinense (Setor de Saúde e Segurança do Trabalho) e Doutoranda em Ciências da Saúde.

Uma homenagem para quem acredita que a vida é o maior prêmio.

Prêmio Profissional Destaque de Enfermagem 2019

Ander Elisiario Fernandes
São José

Carmen Ruggi Bonfim Santoro
Florianópolis

Claudia Regina Lopes
Florianópolis

Cleonice de Oliveira
Florianópolis

Dalvair de Lara Ongaratto
São Miguel da Boa Vista

Edenilson Goeten
Blumenau

Edson Guimarães
São José

Elizangela V. da Silva Soares
Garuva

Erci Bohrer
Cacador

Fernando José Delai
Ipumirim

Flávia de Souza Fernandes
Balneário Camboriú

Geovane Miranda de Souza
Araquari

Giovani Duarte de Souza
Florianópolis

Inara Marques Fluck
Joinville

Isabel Cristina da Silva
São José

Izabel Cristina Bezerra Cabral
Florianópolis

Ivone Peruchi
Criciúma

Janine Terezinha Santos
Florianópolis

Josiane Espindola
Florianópolis

Josimeri da Silva Scheidt
Florianópolis

Juliana Vanselto
Pinhalzinho

Katiuscia Schvambach Wanka
Brusque

Lusly Kadewaki Katto
Curitibanos

Maria do Carmo Vicensi
Campos Novos

Maria Itayra C. de S. Padilha
Florianópolis

Maria Izabel Machado Costa
Florianópolis

Marinez Maria Zancanaro
Xanxerê

Marisa Isaias
Rio do Sul

Marlene Amélia Alves
Tubarão

Micheli Beninca Trentin
São Miguel do Oeste

Nelise Dias Vieira da Silva
Garuva

Olivia Costa Rocha
Itajaí

Ricardo Rocha dos Santos
Florianópolis

Rosimeri Geremias Farias
Rio do Sul

Shirley Nunes Tarouco
Joinville

Simone Vidal Santos
Florianópolis

Teresinha Torizete T. Wendorff
Jaraguá do Sul

Terezinha de Oliveira
São Bento do Sul

Valéria Silvana F. Madureira
Chapecó

Vera Radünz
Florianópolis

O Prêmio Profissional Destaque de Enfermagem é um reconhecimento prestado aos profissionais que, com dedicação e competência, fizeram a diferença em seus locais de trabalho.

Coren SC

www.corensc.gov.br