



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
ALEXANDRE SANTANA HILEL

**ESTUDO COMPARATIVO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE LOÇÕES DE USO
EXTERNO DE CLOBETASOL EM VEÍCULO CONVENCIONAL E LIPOSSOMAL
EM UM MODELO DE LESÕES PSORIASIFORMES EM CAMUNDONGOS**

ALEXANDRE SANTANA HILEL

**ESTUDO COMPARATIVO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE LOÇÕES DE USO
EXTERNO DE CLOBETASOL EM VEÍCULO CONVENCIONAL E LIPOSSOMAL
EM UM MODELO DE LESÕES PSORIASIFORMES EM CAMUNDONGOS**

LINHA DE PESQUISA: Investigação de agravos crônicos à saúde

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

Orientadora: Profa. Franciane Bobinski, Dra.

Palhoça
2021

H54 Hilel, Alexandre Santana, 1961-
Estudo comparativo da atividade biológica de loções de uso externo de clobetasol em veículo convencional e lipossomal em um modelo de lesões psoriasiformes em camundongos / Alexandre Santana Hilel. – 2021.
75 f. : il. color.; 30 cm

Tese (Doutorado) – Universidade do Sul de Santa Catarina, Pós-graduação em Ciências da Saúde.
Orientação: Prof.^a Dr.^a Franciane Bobinski

1. Psoríase. 2. Lipossomas. 3. Clobetasol. 4. Nanotecnologia. I. Bobinski, Franciane. II. Universidade do Sul de Santa Catarina. III. Título.

CDD (21. ed.) 616.526



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - DOUTORADO

Título da Tese

Estudo comparativo da atividade biológica de loções de uso externo de clobetasol em veículo convencional e lipossomal em um modelo de lesões psoriasiformes em camundongos

ALEXANDRE SANTANA HILEL
AUTOR

Aprovado pela Banca Avaliadora de Defesa da Tese em 29 de setembro de 2021.

Doutora Franciane Bobinski (Orientador) Franciane Bobinski

Doutor Eduardo Cargnin Ferreira (Avaliador externo - IFSC) – *presente por videoconferência*

Doutor Luiz Alberto Kanis (Avaliador externo - Airela Pharmaceutica) – *presente por videoconferência*

Doutora Clarissa Martinelli Comim (Avaliador interno - PPGCS) – *presente por videoconferência*

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

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

- Unisul - Universidade do Sul de Santa Catarina, Sede, Reitoria - Av. José Acácio Moreira, 787, Bairro Dehon - 88704-900, Tubarão, SC - Fone 48 3621.3000
- Unisul Região Sul
 - Campus Tubarão - Avenida José Acácio Moreira, 787, Bairro Dehon, Caixa Postal 370 - 88704-900, Tubarão, SC - Fone 48 3621.3000
 - Campus Araranguá - Rodovia Governador Jorge Lacerda, 3201, Bairro Urussanguinha - 88905-355, Araranguá, SC - Fone 0800 970 7000 - 48 3521-3000
 - Campus Braço do Norte - Rodovia SC 370, 1023, Rio Bonito - 88750-000, Braço do Norte, SC - Fone 0800 970 7000 - 48 3621-3925
 - Campus Içara - Rua Linha Três Ribeirões, Loteamento Centenário, 250, Bairro Liri - 88820-000, Içara, SC - Fone 0800 970 7000 - 48 3621-3460
- Unisul Região Grande Florianópolis
 - Campus Pedra Branca - Avenida Pedra Branca, 25, Cidade Universitária Pedra Branca, 88137-270, Palhoça, SC - Fone 48 3279.1000
 - Campus Florianópolis - Rua DIB Mussi, 366, Centro - 88015-110, Florianópolis, SC - Fone 48 3279.1000
 - Rua Trajano, 219, Centro - 88010-010, Florianópolis, SC - Fone 48 3279.1000
 - Campus Unisul Digital - Av. Pedra Branca, 25 - Cidade Universitária Pedra Branca - 88137-900, Palhoça, SC - Fone 48 3279.1200

Dedico esse trabalho, fruto de toda a minha dedicação acadêmica e de meu grupo de estudo, a todos os pacientes que sofrem da forma cutânea de psoríase, tendo como foco buscar novos horizontes para o seu tratamento de forma mais segura e eficaz e com menos efeitos colaterais, uma patologia de certa forma mutilante, considerando suas manifestações na pele e suas implicações estéticas.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC).

Agradeço à minha orientadora Dra. Franciane Bobinski, que me adotou e mostrou como era fácil entender o meio acadêmico de uma maneira dinâmica e contemporânea. Meu especial apreço por toda dedicação durante este processo; sua paciência, sua praticidade, seu companheirismo e sua amizade.

Ao Professor Dr. Maicon Roberto Kwiecinski, por também me adotar no meio do caminho, ajudar-me na escolha de uma nova linha de pesquisa sem abandonar para tanto o foco nos nanocarreadores de fármacos, utilizados por mim na fase inicial do doutorado para pesquisas em doenças inflamatórias intestinais e, agora, em doenças de pele, reafirmando o potencial desse trabalho.

À Professora Verônica Vargas Horewicz que me coorientou e ensinou as fronteiras de um laboratório e seus potenciais em fazer ciência. Agradeço também ao Professor Dr. Daniel Fernandes Martins pela contribuição no experimento e realização das análises.

Ao Professor Luis Kanis, que me iniciou no mundo da nanotecnologia farmacêutica, desde o aprendizado em como utilizar as nanopartículas de ouro numa abordagem da doença de Crohn e na retocolite ulcerativa, sendo essas incursões as primeiras de meu doutorado.

Aos meus colegas de Doutorado, em especial ao formando do Curso de Fisioterapia da UNISUL (estudante de iniciação científica) Gustavo Silveira da Silva, que colaboraram em todos os momentos dos experimentos, além da parceria e troca de conhecimentos.

Agradeço a todos os membros e colegas do Grupo de Pesquisa em Alergia, Inflamação e Doenças Infecciosas (Alindi, UNISUL), por partilharem seus conhecimentos.

À minha família de sangue e de coração, em especial minha mãe, que sempre me ensinou a persistência e resiliência nos obstáculos da vida. Ao meu amigo Rafael Lima e minha mana de coração Cristiane Pinto, por sempre me estenderem as mãos em todos os momentos difíceis dessa jornada.

A todos, o meu muito obrigado de “coração e alma”. Vocês todos agora fazem parte da minha história e dos avanços alçados pelo presente estudo!

“Todo o mundo ama um dia... todo o mundo chora...

Um dia a gente chega, no outro vai embora...

Cada um de nós compõe a sua história.

E cada ser em si carrega o dom de ser capaz, de ser feliz...”

(Almir Sater)

RESUMO

Introdução: Psoríase é uma doença multifatorial manifestada por hiperproliferação de queratinócitos na epiderme e inflamação local persistente associada a secreção de citocinas pró-inflamatórias.

Objetivo: Avaliar a eficácia, segurança e potência farmacológica do tratamento com clobetasol em veículo lipossomal (VL) em camundongos com lesões psoriasiformes, além de caracterizar o mecanismo de ação anti-inflamatório.

Métodos: Estudo pré-clínico experimental com análises *in vivo* e *ex vivo*. Lesões psoriasiformes foram induzidas em camundongos Swiss fêmeas (n = 12/grupo) com imiquimode (62,5 mg) aplicado em 2 cm² de pele do dorso (ou veículo nos grupos Sham) por 5 dias. Duas horas após a aplicação os animais foram tratados por via tópica com clobetasol 0,5 mg/mL em veículo convencional (VC), comparando-se às doses de 0,1; 0,25 e 0,5 mg/mL em VL. Foram avaliados parâmetros de eficácia e segurança e quantificadas as concentrações de citocinas pelo método ELISA e proteínas cinase por *Western Blotting* em amostras de pele.

Resultados: Lesões induzidas foram reduzidas macroscopicamente e microscopicamente sem alterar a temperatura da pele entre os grupos tratados em VL ou VC. Clobetasol nos dois veículos, em diferentes concentrações, promoveu a limpeza completa da pele. No entanto, o tempo necessário ao desaparecimento das lesões psoriasiformes foi menor no grupo tratado com clobetasol a 0,5 mg/mL em VL. Clobetasol em VL a 0,1 e 0,5 mg/mL atenuou os níveis de IL17-A e IFN- γ , efeito similar ao observado com clobetasol em VC (0,5 mg/mL). Os níveis de IL-10, reduzidos nos animais com lesões psoriasiformes, aumentaram no grupo tratado com clobetasol (0,25 mg/mL) em VL. A fosforilação da proteína Akt foi maior nos animais com lesões psoriasiformes e menor após tratamento com clobetasol 0,5 mg/mL em VC ou VL, sem diferença de eficácia entre eles. Os tratamentos se mostraram seguros, não alterando a maioria dos parâmetros hematológicos, peso corporal e de órgãos ou locomoção.

Conclusão: VL em doses usuais de clobetasol (0,5 mg/mL) ou menores (0,1 e 0,25 mg/mL) demonstraram eficácia farmacológica e segurança, abrindo possibilidades para ensaios clínicos no sentido de aumentar a potência farmacológica e diminuir as

doses utilizadas no tratamento tópico da psoríase através da utilização dos VL, em especial os nanolipossomas de fosfatidilcolina.

Descritores: Psoríase. Lipossomas. Clobetasol. Nanotecnologia.

ABSTRACT

Introduction: A psoriasis is a multifactorial disease manifested by hyperproliferation of keratinocytes in the epidermis with persistent local inflammation associated with secretion of pro-inflammatory cytokines.

Objective: To assess the efficacy, safety and pharmacological potency elicited by treatment with clobetasol in a liposomal vehicle (LV) in mice with psoriasiform lesions and to characterize the mechanism of anti-inflammatory action.

Methods: Pre-clinical experimental study with *in vivo* and *ex vivo* analyzes. Lesions were induced in female Swiss mice (n=12/group) with imiquimode (62.5 mg) applied in 2 cm² of back skin (or vehicle in Sham groups) for 5 days. Two hours after applying the imiquimode mice were treated by topical route with clobetasol 0.5 mg/mL in conventional vehicle (CV), compared with doses of 0.1; 0.25 and 0.5 mg/mL in LV. Efficacy and safety parameters were evaluated, cytokines and kinase proteins quantified by the ELISA method Western Blotting, respectively, in dorsal skin samples.

Results: The induced-lesions macroscopically and microscopically reduced without changing the skin temperature between groups treated in LV or CV. Clobetasol promoted complete cleansing of the skin in both vehicles at different concentrations. The clearance time was shorter in the group treated with 0.5 mg/mL clobetasol in LV. Clobetasol in LV at 0.1 and 0.5 mg/mL attenuated the levels of IL17-A and IFN- γ , similar to the effects observed in CV (0.5 mg/mL). IL-10 levels, which were reduced in animals with psoriasiform lesions, were increased in the group treated with 0.25 mg/mL clobetasol in LV. Akt protein phosphorylation was higher in animals with psoriasiform lesions and lower following clobetasol 0.5 mg/mL in CV and LV, with no difference in efficacy between them. All treatments were shown to be safe, not altering hematological parameters, body and organ weight or locomotion.

Conclusion: LV in usual doses of clobetasol (0.5 mg/mL) or lower doses (0.25 mg/mL and 0.1 mg/mL) demonstrated pharmacological efficacy and safety, suggesting the possibility for clinical trials to increase the pharmacological potency and decrease the doses of drugs used in the topical treatment of psoriasis through the use of LV, in particular, the phosphatidylcholine nanoliposomes.

Keywords: Psoriasis. Liposomes. Clobetasol. Nanotechnology.

LISTAS

Lista de abreviaturas e siglas

Akt	Proteína cinase B
AUC	Área sob a curva (do inglês, <i>area under the curve</i>)
CDs	Células dendríticas
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERK	Cinase ativada por sinal extracelular (do inglês, <i>extracellular signal-regulated kinases</i>)
EROs	Espécies reativas de oxigênio
HPV	Vírus do papiloma humano
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IL-1 β	Interleucina 1 beta
JAKs	Janus cinases
MAPKs	Proteínas cinases ativadas por mitógenos (do inglês, <i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>)
MCH	Hemoglobina corpuscular média
MCHC	Concentração média de hemoglobina corpuscular
MCV	Volume corpuscular médio
Na EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético de sódio
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
PASI	Índice Severidade da Psoríase por Área (do inglês, <i>Psoriasis Area Severity Index</i>)
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
Th	Linfócitos T auxiliares (do inglês, <i>T helper</i>)
TLR	Receptores do tipo <i>toll like</i> (do inglês, <i>toll-like receptor</i>)
TNF	Fator de necrose tumoral

Lista de quadros

Quadro 1 – Variáveis de estudo.....	54
-------------------------------------	----

Listas de figuras

Figura 1 – Característica da pele normal e psoriática.....	22
Figura 2 – O microambiente da placa psoriática.....	23
Figura 3 – Estrutura molecular do propionato de clobetasol.....	29
Figura 4 – Estrutura molecular da betametasona.....	29
Figura 5 – Pele humana versus pele de camundongos.....	30
Figura 6 – Possíveis vias para a entrega de fármacos através do estrato córneo....	31
Figura 7 – Vias de administração de fármacos sobre a pele normal: tópica e transdérmica.....	32
Figura 8 – Administração de fármacos sobre a pele normal: via tópica (A) e transdérmica (B). Administração tópica de fármacos sobre a pele psoriática (C).....	33
Figura 9 – Lipossomas de fosfolipídios.....	34
Figura 10 – Estrutura química de 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina.....	37
Figura 11 – Desenho experimental.....	46

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO	20
1.1.1 Psoríase	20
1.1.2 Tratamento da psoríase e limitações	26
1.1.3 Clobetasol.....	29
1.1.4 Segurança da corticoterapia de uso externo.....	30
1.1.5 Administração de fármacos através da pele	31
1.1.6 Lipossomas como sistemas de transporte de fármacos.....	35
1.1.7 Um veículo lipossomal disponível comercialmente.....	39
1.1.8 Modelos animais de lesões psoriasiformes	40
2. OBJETIVOS.....	42
2.1 OBJETIVO GERAL	42
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
3. MÉTODOS	43
3.1 TIPO DE ESTUDO	43
3.2 LOCAL E DATAS	43
3.3 MATERIAL E EQUIPAMENTOS	43
3.4 ANIMAIS.....	44
3.5 FORMULAÇÕES E FORMAS DE APRESENTAÇÃO.....	45
3.6 DELINEAMENTO DE ESTUDO	46
3.6.1 Grupos experimentais.....	47
3.6.2 Tamanho amostral.....	48
3.7 INDUÇÃO DE LESÕES PSORIASIFORMES POR IMIQUIMODE.....	49
3.8 TRATAMENTOS COM CLOBETASOL	49
3.9 ENSAIOS/TESTES/TÉCNICAS	50
3.9.1 Avaliação da eficácia dos tratamentos.....	50
3.9.1.1 Coleta de sangue, pele e órgãos.....	51
3.9.1.2 Análise histológica da pele	51
3.9.2 Avaliação dos mecanismos de ação	52
3.9.2.1 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática	52
3.9.2.2 Ensaio de <i>Western Blotting</i>	52

3.9.3 Avaliação da segurança dos tratamentos.....	53
3.11 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS.....	56
3.12 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	56
4. ARTIGO CIENTÍFICO	57
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
REFERÊNCIAS.....	62
ANEXO A – PARECER APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA	72
ANEXO B – PRODUÇÃO CIENTÍFICA PUBLICADA DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO.....	73

1. INTRODUÇÃO

A psoríase é considerada atualmente a doença autoimune mais prevalente no mundo¹. Trata-se de uma condição crônica inflamatória que promove prejuízos físicos e psicossociais, podendo apresentar-se sob várias formas, estando as alterações dermatológicas entre as mais comuns (superior a 90% dos casos), representando as principais causas de visitas aos dermatologistas².

O processo patológico da psoríase envolve uma atividade autorreativa mediada por células, incluindo os linfócitos T e outras células fagocitárias, sendo dirigida pela produção anômala de citocinas pró-inflamatórias, como o interferon gama (IFN- γ), o fator de necrose tumoral (TNF) e outras citocinas do eixo interleucina (IL)-23/IL-17, podendo ter origem nos queratinócitos, células do sistema imunológico ou nervoso, entre outros³.

Nas lesões psoriáticas a epiderme é composta por queratinócitos em um estado de “maturação regenerativa”, normalmente observado somente no reparo de feridas. As lesões psoriáticas, na maioria das vezes, apresentam-se sob a forma de placas epidérmicas fortemente espessas, eritematosas e descamativas, que contêm cones alongados (acantose), formados por queratinócitos hiperplásicos, células endoteliais ativadas e infiltrado linfocitário proeminente. Ainda, é observado um processo hiperproliferativo que faz com que o estrato córneo seja formado por queratinócitos com diferenciação incompleta que retêm, de maneira aberrante, o núcleo celular: um estado denominado de paraceratose⁴.

Os casos mais graves são, com certa frequência, tratados de forma sistêmica através de fármacos de uso interno, sejam corticosteroides, imunossupressores e até agentes biológicos, como por exemplo, anticorpos monoclonais anticitocinas^{5,6}. O tratamento com anti-inflamatórios não esteroidais tem efeito muito aquém do desejado, pois as lesões exigem resolução por meio de uma reprogramação celular^{5,7}. A abordagem sistêmica é evitada para o tratamento das lesões psoriáticas da pele devido aos inúmeros efeitos colaterais, sendo preferido o tratamento de uso externo⁶.

O arsenal de fármacos de uso externo indicado para o tratamento da psoríase inclui: corticosteroides (principalmente o clobetasol e a betametasona); e, indutores de diferenciação e apoptose celular (como derivados da vitamina A e D,

respectivamente)^{5,6}. Contudo, a despeito dos avanços alcançados no tratamento desta doença, existe por parte dos pacientes um descontentamento relacionado à falta de eficácia e segurança dos medicamentos disponíveis. Recentemente, Lebwohl e colaboradores revelaram que até 46% dos pacientes consideram os efeitos colaterais da terapia atual disponível como sendo piores do que aqueles da própria doença. Ainda, cerca de 85% destes acreditam na necessidade do desenvolvimento de novos medicamentos ou formulações farmacêuticas⁸.

Os corticosteroides de uso externo estão entre os principais fármacos utilizados no tratamento de lesões psoriáticas de pele, apresentando múltiplos efeitos ao atenuar a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias: anti-inflamatório; antiproliferativos; e, imunossupressores. Mesmo assim, restrições desta modalidade terapêutica incluem limitações em termos de eficácia e inúmeros efeitos colaterais^{5,6,9}.

Especificamente, o clobetasol é o fármaco de uso externo mais utilizado nas lesões psoriáticas da pele. Ele representa a primeira escolha como princípio ativo das abordagens tópicas para psoríase, sendo sua atividade glicocorticoide a mais potente, associada a uma baixa atividade mineralocorticoide^{10,11}. As loções viabilizam a administração do fármaco sobre a área afetada, sendo a loção de clobetasol a preferida para o tratamento de lesões psoriáticas disseminadas no couro cabeludo¹². Dentre os exemplos de loções disponíveis comercialmente estão: Clob-X® (Galderma); o Therapsor® (Theraskin); e, o Psorex® (GlaxoSmithKline). As formas de apresentação destes medicamentos nos veículos convencionais normalmente utilizados possuem limitações, uma vez que nas placas psoriáticas o espessamento epidérmico característico dificulta o acesso dos fármacos aos queratinócitos alterados e germinativos encontrados nas camadas mais profundas da epiderme. Neste caso, o fármaco ideal seria aquele capaz de permear a crosta das lesões (camadas de células córneas) e alcançar as regiões comprometidas pela patologia, o que inclui células e moléculas¹³. Este fato, eventualmente, permitiria o emprego de doses de fármacos mais baixas, associadas a uma concentração plasmática que promova menores efeitos adversos^{9,14-17}.

Uma abordagem inovadora que tem sido testada no campo experimental caracteriza-se pela preparação de formulações à base de excipientes nanoestruturados, funcionando como carreadores de fármacos. Neste sentido, pesquisadores tem prestado esforços para o desenvolvimento de uma variedade de

produtos desta natureza¹⁸⁻²⁰. O termo “nanoestruturado” refere-se ao uso de matérias-primas de natureza diversa, com tamanho reduzido e raio variando de 50 e 450 nm. Tem-se como exemplo os biopolímeros, metais e outras biomoléculas, como os fosfolipídios²¹⁻²³. Os fosfolipídios, que são lipídios anfipáticos, têm sido particularmente foco de interesse uma vez que, quando utilizados no preparo de formulações, podem gerar lipossomas capazes de carrear fármacos²⁴.

Fórmulas contendo clobetasol e betametasona (os principais fármacos utilizados para tratamento local de psoríase) em veículos lipossomais têm sido testadas em estudos com intuito de desenvolver medicamentos mais eficazes e seguros para os mais variados contextos^{18,20,23-26}. Silva e colaboradores²⁰ compararam a penetração *in vitro* de clobetasol em solução aquosa e veículo lipossomal à base de fosfolipídios de lecitina (fosfatidilcolina) em diferentes camadas da pele íntegra da orelha de porcos. Os resultados indicaram um alto potencial dos lipossomas para carrear o clobetasol através das camadas, principalmente o estrato córneo, que atuou como um reservatório de fármaco, podendo levar a altas concentrações de clobetasol na pele remanescente durante esquemas de administração crônica. Vários outros investigadores também evidenciaram melhorias da segurança de corticosteroides de uso tópico por meio de formulações feitas com fosfolipídios da lecitina, principalmente a fosfatidilcolina^{24,27-29}. A fosfatidilcolina é o componente mais comumente usado nessas formulações porque originalmente constitui um componente natural/estrutural das membranas biológicas; sendo biocompatível^{24,27-29}.

Os lipossomas têm sido amplamente pesquisados^{18,20,23-26}, mas somente uma pequena parcela deles já está disponível em formulações dermocosméticas. Não obstante, eles têm chamado a atenção de pesquisadores para o tratamento da psoríase, pois apresentam características vantajosas que vão de acordo com o desenvolvimento do medicamento ideal para uso externo. Na área da dermatologia, os lipossomas vêm sendo utilizados tanto para aumentar a permeação de substâncias ativas nos tecidos quanto como veículo para liberação controlada de princípios ativos. Devido à estrutura em bicamadas dos lipossomas à base de fosfolipídios, semelhante à estrutura das membranas celulares, os lipossomas têm alto potencial de interagir de forma particular com o tecido cutâneo³⁰.

Neste sentido, destaca-se um produto inovador que recentemente foi disponibilizado no mercado, sendo um veículo lipossomal à base de óleo e água,

constituído por fosfatidilcolina. O veículo recebeu o nome comercial de Pentravan®, sendo produzido pelo laboratório holandês Fagron³¹. Até o presente momento, o veículo foi estudado somente para seu uso/aplicação sobre pele íntegra e em mucosas^{31,32}. Previamente, estudos realizados *in vitro* com pele humana demonstraram que o veículo é capaz de favorecer a permeação de fármacos através do estrato córneo, tais como o cetoprofeno e a testosterona³³. Considerando a inovação que este produto representa e a carência de dados científicos que possam ratificar sua aplicação clínica, propõe-se através dessa tese a sua aplicação como carreador de betametasona em lesões psoriasiformes em camundongos.

Clinicamente o referido veículo tem sido prescrito para possibilitar a permeação de hormônios esteroidais, considerando a existência de comprovações científicas de eficácia e segurança neste contexto³⁴⁻³⁷. O sucesso relatado por estes estudos, relacionado à incorporação de moléculas esteroidais em lipossomas para aplicação sobre a pele, somado aos aspectos críticos apresentados no tratamento da psoríase, levaram à hipótese de que o clobetasol administrado em uma loção lipossomal de fosfatidilcolina pode apresentar melhor eficácia e segurança no tratamento de lesões psoriasiformes. Esta hipótese considera a possibilidade de uma maior permeação do fármaco através do estrato córneo da epiderme. Assim, eventualmente, seria possível o uso de doses mais baixas relacionadas à biodisponibilidade e com menores efeitos colaterais. Assim, tem-se como pergunta de pesquisa da presente tese: A administração de clobetasol em loção lipossomal de fosfatidilcolina permite a melhor eficácia e segurança em doses mais baixas aplicadas sobre a pele de camundongos com lesões psoriasiformes?

O desenvolvimento deste estudo representa o avanço na área do tratamento para psoríase com medicamentos de uso externo, além de poder contribuir significativamente com dados importantes para investigações clínicas futuras. O ineditismo deste estudo está relacionado ao fato das formulações contendo clobetasol em lipossomas de fosfatidilcolina terem sido pouco estudadas, além de serem testadas, neste caso, em pele não íntegra (psoriasiforme), a qual sabidamente possui função de barreira alterada¹³.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Psoríase

O termo “psoríase” origina-se do idioma grego *psoriasis*, que significa “erupção sarnenta”, sendo reconhecido desde os tempos mais remotos, sendo inclusive descrito no Papiro de Ebers, datado de 1550 a.C. Por mais de mil anos, a doença foi confundida com a hanseníase (“lepra”), sendo somente diferenciada no século XVIII como uma nova patologia. No século XIX, acreditava-se que a psoríase se originava de um processo de regulação anormal do crescimento dos queratinócitos. Em 1970, quando avanços na imunologia celular demonstraram uma participação de células imunológicas da corrente sanguínea na doença, a teoria sistêmica da psoríase passou a ser investigada. A partir de 1982, outras investigações mostraram a presença e importante ativação de células T nas lesões psoriáticas. Assim, a doença passou a ser vista como um distúrbio imune autorreativo baseado em achados imunohistológicos na camada córnea da pele psoriática^{38,39}.

Do ponto de vista epidemiológico, estima-se que a psoríase seja a doença autoimune mais prevalente no mundo⁴⁰. Estudos afirmam que a prevalência de psoríase é de aproximadamente 1 a 3%⁴¹, variando de acordo com a idade e região geográfica (sendo mais frequente em países mais distantes da linha equatorial) e conforme características demográficas¹. Esses achados epidemiológicos vêm contribuindo para uma melhor compreensão da carga da doença⁴².

A psoríase, como uma doença crônica inflamatória recorrente de caráter universal, apresenta-se sob formas clínicas variadas, sendo que as mais comuns são as formas dermatológicas ou cutâneas (com acometimento superior a 90%). O espectro clínico da doença, associado ao tipo de lesão provocada na pele, produziu uma classificação plausível, considerando o aspecto morfológico em suas manifestações cutâneas que, através de uma avaliação dermatopatológica, pode ser útil para confirmar o diagnóstico e conduzir ao melhor tratamento⁴³.

Sabe-se que as manifestações clínicas da psoríase na pele são proteicas^{40,44,45}, levando a lesões primárias que podem variar entre máculas, pápulas, placas e até pústulas. A doença pode não estar necessariamente restrita à pele e unhas. Por exemplo, cerca de 30% dos pacientes podem desenvolver artrite

inflamatória. As manifestações cutâneas podem ser limitadas ou extensas, monomórficas ou polimórficas. Tal espectro da doença inclui diversas formas de aparência clínica que servem de critérios para diagnóstico, auxiliando o clínico na melhor abordagem terapêutica, visto que a etiologia e patogênese da psoríase são pouco compreendidas. Os fenótipos clínicos da psoríase foram classificados com base em diversas características, tais como a idade de início da doença, o grau de envolvimento da pele, o padrão morfológico e o envolvimento predominante de localização anatômica específica do corpo⁴⁰. As principais formas dermatológicas foram classificadas em: psoríase vulgar; psoríase gutata; psoríase inversa; psoríase pustular; e, psoríase eritrodérmica. Além disso, as formas artríticas são classificadas em: artrite psoriática simétrica; assimétrica; interfalângica distal; espondilite; e, artrite mutilante⁴⁰.

A psoríase vulgar ou do tipo placa é a mais prevalente e se manifesta em cerca de 90% dos casos, sendo caracterizada pelo aparecimento de lesões na pele de cor avermelhada e descamativa, bem demarcadas^{40,43}. As escamas geralmente têm cor “prateada” e, quando retiradas por curetagem, apresentam aspecto e consistência semelhante a raspas de parafina (“sinal da vela”), exibindo em seguida pequenos pontos hemorrágicos⁴⁶ conhecido como sinal de Auspitz (“orvalho sangrante”). A psoríase inversa ocorre em áreas intertriginosas, usualmente desprovidas de escamas devido à fricção e umidade características dessas áreas. A forma pustulosa é caracterizada pela presença de pústulas subcórneas e pode ser generalizada, localizada ou acometer as palmas das mãos e plantas dos pés⁴⁶. Já a psoríase gutata surge de maneira abrupta com inúmeras pápulas e placas pequenas disseminadas (tipo mais comum observado em crianças)^{47,48}. A psoríase eritrodérmica é a forma mais grave e se caracteriza por eritema e descamação generalizados, envolvendo até 90% da superfície corpórea⁴⁶. Este tipo afeta mais comumente as superfícies extensoras dos membros, o tronco e o couro cabeludo.

Na artrite psoriática, considerando sua manifestação sistêmica, há acometimento das articulações, em particular joelhos e cotovelos, bem como os fenômenos isomórficos de Koebner, onde o aparecimento de placas de psoríase em locais de trauma físico demonstra também a necessidade de uma abordagem tópica. Nesses casos, a doença não se limita só à pele, causando inflamações dolorosas articulares e no tecido conjuntivo, sendo uma inflamação crônica de fator reumatoide negativo⁴⁹. Importante mencionar, a condição está associada em sua forma grave

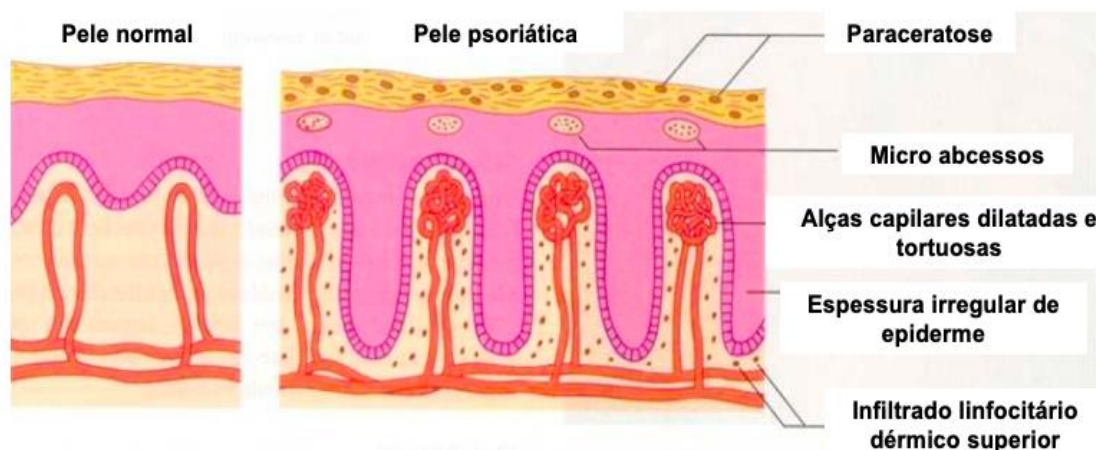
com o risco aumentado de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, deficiência psicossocial significativa, além de impactar significativamente a qualidade de vida dos pacientes⁵⁰.

As bases moleculares da psoríase vêm sendo esclarecidas, embora apresente-se de forma heterogênea. Sabe-se que a doença resulta de uma interação complexa entre genética, ambiente, comprometimento da barreira cutânea e disfunção imunológica⁴⁰. Por muitos anos, discutiu-se a possibilidade de o processo primário envolver queratinócitos hiperplásicos com ativação imune secundária ou vice-versa. Em parte, esse debate foi alimentado pela falta de conhecimento sobre os mecanismos terapêuticos dos agentes comumente usados, como os corticosteroides e o metotrexato⁵¹. Relativamente, pouca atenção foi dada à identificação de fenótipos clínicos ou compreensão sobre a história natural e prognóstico da doença. No entanto, no último quarto de século, avanços substanciais foram alcançados em relação à compreensão da genética e mecanismos moleculares patológicos¹⁴. Atualmente, 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 células dendríticas, os macrófagos e as células T a produzirem citocinas que iniciam uma cascata de eventos que envolve a ativação de células imunes, desregulação epidermal com acantose, angiogênese, eritema, espessamento e descamação⁵². Estudos prévios demonstraram que tanto o trauma físico, quanto as infecções pelo vírus da imunodeficiência humana, o estresse emocional, antimaláricos, betabloqueadores, lítio, alguns anti-inflamatórios e inibidores da enzima conversora de angiotensina são fatores desencadeadores e/ou de exacerbação da doença^{53,54}.

Destaca-se ainda que, nas formas dermatológicas de psoríase, podem ser observadas alterações relacionadas aos queratinócitos e um papel alterado dos sistemas imunológico e nervoso⁴⁰. Na pele psoriática os queratinócitos são encontrados em um estado hiperproliferativo e com diferenciação anormal, levando a um espessamento marcado da epiderme que se apresenta de forma descamativa e eritematosa, com cones epiteliais alongados (acantose). As papilas dérmicas também se tornam alongadas e edemaciadas. A camada granulosa da epiderme está fortemente diminuída ou ausente nas lesões psoriáticas e, assim, o extrato córneo é formado por queratinócitos com diferenciação incompleta que ainda retêm, de maneira aberrante, o núcleo celular, um estado denominado de paraceratose⁵⁵⁻⁵⁸.

Dentro das placas psoriáticas existem queratinócitos hiperplásicos, imunócitos infiltrantes (ocorrendo um notório infiltrado de linfócitos T citotóxicos na epiderme) e células endoteliais ativadas (angiogênese psoriática)⁵⁹. As características da pele normal em comparação à pele psoriática são ilustradas na Figura 1.

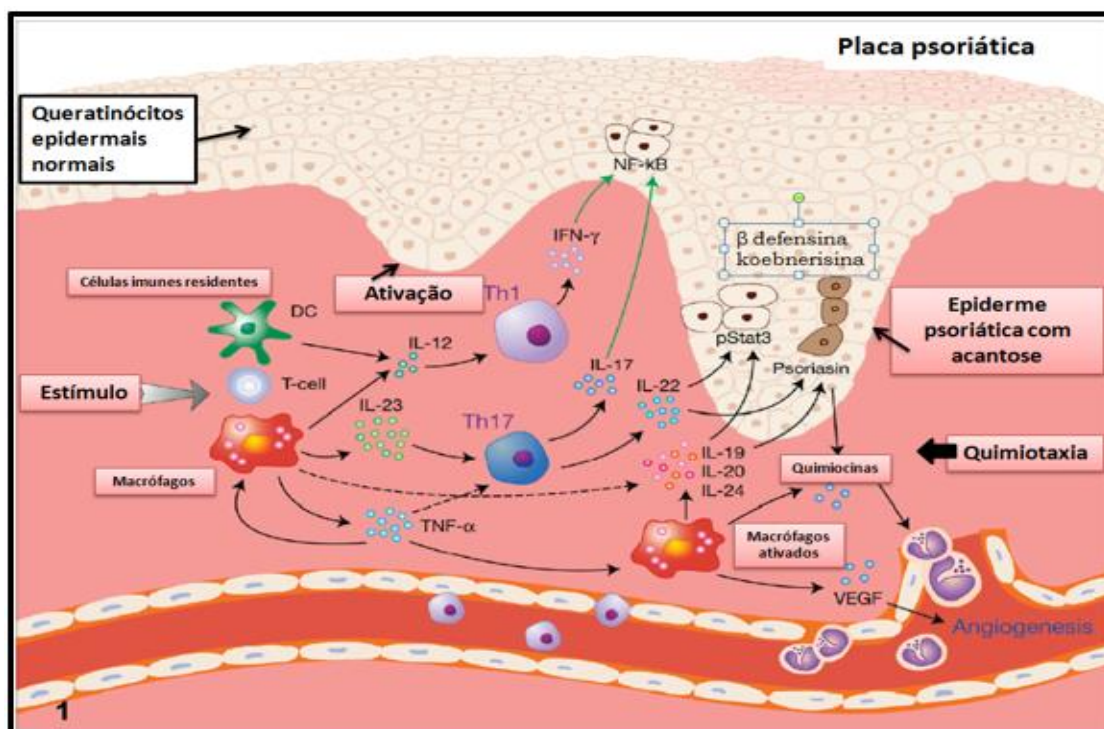
Figura 1 – Característica da pele normal e psoriática.



Fonte: Adaptado de Eberle et al³⁰.

Evidências robustas apontam a psoríase como uma doença com fortes traços hereditários caracterizados pela “agregação familiar”, ou seja, traços hereditários dentro de uma mesma família. Os aspectos genéticos desta doença assinalam a psoríase como uma genodermatose multifatorial, poligênica e influenciada pelo meio ambiente⁶⁰. Estudos conduzidos na década de 90 não foram capazes de identificar os genes específicos envolvidos na doença. No entanto, em 2004, Lowes et al. focaram sua revisão sobre a psoríase no papel da “via Th1” como modelo patogênico dominante. À época, foi percebido a existência da importante modulação do IFN- γ juntamente com TNF na patogenia das lesões psoriáticas³. Recentemente, estudos clínicos conduzidos com antagonistas individuais de citocinas sugeriram um papel também importante de linfócitos auxiliares, ativados em linfócitos Th17 que secretam IL-17 em resposta à IL-23, na evolução patológica da doença (Figura 2). É de amplo conhecimento a grande complexidade envolvendo a biossinalização na patogenia da psoríase e, por este motivo, novos estudos estão sendo realizados para melhor entender o conjunto de vias e de moléculas que agora são estabelecidas como reguladoras-chave da inflamação da pele presente na psoríase, empregando para isso antagonistas terapêuticos e estudos genéticos³.

Figura 2 – O microambiente da placa psoriática.



Fonte: Adaptado de Danilenko⁶¹.

Citocinas dos linfócitos T auxiliares (*T helper*) (Th1, Th17 e até Th22), quimiocinas, moléculas de adesão, fatores de crescimento, neuropeptídeos e subpopulações específicas de células T, juntamente com seus receptores, agem de forma integrada para evoluir em processos inflamatórios e proliferativos típicos da psoríase⁴⁰. A Figura 2 apresenta um esquema dos principais elementos celulares e moleculares envolvidos na patologia imunomediada da psoríase. A partir do estímulo, células fagocíticas, tais como células de Langherans, macrófagos e células dendríticas (CDs), podem ser ativadas e começar a secretar citocinas, tais como TNF, que levam a uma cascata de produção de novas citocinas. A IL-12 produzida pelas CDs e pelos macrófagos induz uma resposta imune por parte dos linfócitos Th1 que se caracteriza pela produção de IFN- γ , ao passo que a interleucina IL-23 também liberada pelas CDs e macrófagos, induz uma resposta por parte dos linfócitos Th17 que é caracterizada pela produção das interleucinas IL-17 e IL-22^{3,41}.

Ainda, observa-se um mecanismo primário iniciado pela sinalização persistente envolvendo TNF e incluindo outras citocinas pró-inflamatórias, entre elas o IFN- γ e a interleucina 1 beta (IL-1 β). Essas, tem relação com a ativação do fator

kappa B nuclear (NF- κ B), uma família de fatores de transcrição que controla um grande número de genes inflamatórios responsáveis pela neogênese linfóide, de grande importância clínica pela exacerbação dos processos inflamatórios que promovem a psoríase.⁴⁵ Nas lesões psoriáticas, o processo hiperproliferativo é dirigido pela cascata de sinalização de citocinas inflamatórias que alteram as vias de transdução de sinais nos queratinócitos e células imunes (Figura 2). Em especial, a via da Janus cinase (JAKs) envolve um papel de enzimas responsáveis pela transmissão de sinais de citocinas, hormônios ou fatores de crescimento. Esta família compreende quatro proteínas intracelulares: JAK1; JAK2; JAK3; e, tirosina cinase 2. Cada uma destas está associada a diferentes receptores de cinases que, quando ativados, fosforilam os resíduos de tirosina possibilitando a ligação de proteínas responsáveis pela transdução do sinal, ativação da transcrição, proliferação e diferenciação celular^{45,63}.

Outra via também relacionada com a inflamação psoriática é a via de proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs). No contexto fisiológico, a via das MAPKs atua em processos de sobrevivência e proliferação celular⁶⁴. Sua ativação depende da interação entre um ligante (fator de crescimento) e um receptor do tipo tirosina-cinase na superfície das células. Esta interação leva o receptor a uma autofosforilação que torna o sítio ativo disponível, de modo que a enzima é capaz de fosforilar resíduos de tirosina de outras proteínas-alvo. Desta forma, a ERK 1 (cinase regulada por sinal extracelular, pertencente à via das MAPKs), quando ativada, medeia alguns dos efeitos biológicos de fatores de crescimento ao entrar no núcleo e fosforilar proteínas como a Elk-1. Esta, se ativada, modula a transcrição de cerca de 100 genes mediados por este fator, regulando a proliferação e diferenciação celular⁶⁵.

A via de sinalização da proteína cinase B (Akt), semelhante à via das MAPKs, também parece envolvida na fisiopatologia da psoríase. Fisiologicamente, esta via funciona a partir da interação de algum fator de crescimento com um receptor do tipo tirosina-cinase que sofre autofosforilação. Esta via de sinalização é conhecida como uma das mais importantes vias que regulam a sobrevivência celular; desempenhando 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 angiogênese^{66,67}.

1.1.2 Tratamento da psoríase e limitações

O tratamento atualmente disponível para psoríase conta com várias opções terapêuticas; a maioria delas farmacológicas. A definição de qual tratamento será prescrito depende da forma clínica da doença, da gravidade e extensão, da idade, sexo, escolaridade e das condições do paciente em relação à saúde geral, comorbidades associadas e situação socioeconômica^{68,69}. Independentemente da modalidade terapêutica, sabe-se que todas elas têm efeito somente paliativo e podem exibir efeitos colaterais importantes. Assim, o clínico precisa avaliar criteriosamente tanto a eficácia como a segurança, dependendo de vários fatores como: o tipo de lesão; tempo de manifestação; localização; a adesão do paciente aos tratamentos utilizados; dentre outros^{12,70,71}.

Normalmente, os pacientes são categorizados em dois grupos principais: casos leves ou casos moderados a severos, dependendo do acometimento clínico das lesões, da percentagem de área corporal afetada e do comprometimento da qualidade de vida. Tudo isto pode ser avaliado clinicamente com auxílio de uma variedade de índices, sendo o mais utilizado o Índice de Área e Severidade da Psoríase, do inglês *Psoriasis Area and Severity Index (PASI)*⁷², utilizado também para monitorar a resposta ao tratamento¹².

A psoríase de grau moderado à grave geralmente requer tratamento sistêmico. A presença de comorbidades, como a artrite psoriática, também é altamente relevante na seleção do mesmo. A fototerapia deve ser a primeira opção terapêutica para casos moderados a severos, constituindo na aplicação de radiação ultravioleta, que causa imunossupressão local, reduz a hiperproliferação epidérmica, além de provocar a apoptose de linfócitos. Seu mecanismo de ação inclui a atividade antiproliferativa, anti-inflamatória e imunossupressora. A fototerapia pode incluir a associação de psoralenos (fármacos fotossensibilizantes) e radiação ultravioleta tipo A, sendo também conhecida como terapia fotodinâmica⁷³. No entanto, esta técnica pode causar efeitos adversos devido seu efeito fototóxico relacionado à liberação de energia, podendo causar danos celulares e geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs)⁷⁴.

O metotrexato, a ciclosporina A e os fármacos retinoides constituem as opções terapêuticas sistêmicas clássicas da psoríase. Todos estes fármacos são administrados geralmente por via oral, com exceção do metotrexato que também

está disponível para administração subcutânea¹². A classe de fármacos de alcance sistêmico utilizada para tratar psoríase passou a incluir nos últimos anos compostos biológicos, que na maioria das vezes são anticorpos monoclonais dirigidos contra citocinas envolvidas na patogênese da doença, tais como o TNF, IL-17, IL-23, entre outros⁶. Por princípio, estes fármacos devem ser indicados somente em caso de inegável necessidade, quando não há resposta satisfatória da fototerapia ou quando houver comprometimento de outros órgãos, como na artrite psoriática. O motivo da prescrição controlada desta forma é que estes fármacos têm baixo índice terapêutico e causam efeitos colaterais importantes⁶⁸.

O metotrexato é um antagonista do folato e tem efeito inibidor sobre enzimas da biossíntese de purinas, pirimidinas e tetraidrofolato. Ele apresenta excessiva toxicidade e efeitos colaterais como: náuseas; leucopenia; e, aumento da atividade das transaminases hepáticas⁷⁵. A ciclosporina é um derivado peptídico inibidor da calcineurina, extraído de um fungo (*Tolypocladium inflatum*). A ciclosporina liga-se a um receptor citoplasmático chamado ciclofilina, formando um complexo ciclosporina-ciclofilina que inibe a atividade de uma enzima fosfatase-chave conhecida como calcineurina, responsável pela desfosforilação do fator nuclear de células T ativadas^{53,76,77}. Dentre os efeitos colaterais mais expressivos da ciclosporina estão a hipertensão, toxicidade renal, câncer, aumento da resistência vascular e imunossupressão^{77,78}.

Efeitos adversos também têm sido relatados para as terapias biológicas, incluindo infecções graves, principalmente respiratórias, reativação de tuberculose, susceptibilidade a formação de melanomas, doenças cardiovasculares, entre outras⁷⁹. Infelizmente, a terapia biológica apresenta restrições também relacionadas ao seu alto custo. O tratamento com produtos disponíveis no mercado, como o infliximabe, apresenta um custo estimado entre 12 e 20 mil dólares/ano, por paciente. Esse fato coloca os compostos biológicos entre os medicamentos de altíssimo custo para países em desenvolvimento como o Brasil, fato que torna questionável a sua aplicabilidade⁷⁰.

Por outro lado, a grande maioria dos casos de psoríase é constituída por pacientes com quadros de comprometimento leve a moderado (superior a 80% dos casos)⁸⁰. Estes pacientes, assim como alguns casos moderados a severos, são tratados com fármacos de uso externo. A terapia de uso externo para psoríase é feita principalmente pelo uso de glicocorticoides (principalmente o clobetasol e a

betametasona), análogos da vitamina D (por exemplo, o calcipotrieno), inibidores da calcineurina (por exemplo, o tacrolimus), retinoides (tazaroteno), queratolíticos (salicilatos/ácido láctico) e fototerapia, podendo ser utilizados individualmente ou em associação^{6,12,82}. Assim, os tratamentos de uso externo são considerados como de primeira-linha para a maioria dos doentes com psoríase⁶⁸, além de também serem indicados para manifestações cutâneas em associação com a fototerapia ou terapêutica sistêmica convencional ou biológica. No contexto do uso exclusivo de terapia de uso externo, existe a possibilidade de minimizar os efeitos colaterais associados à exposição a medicação sistêmica⁸².

No tratamento da psoríase, os corticosteroides tópicos são considerados a “pedra fundamental”⁸³. Além de constituírem um tratamento de primeira-linha para psoríase leve à moderada, são eficazes em áreas onde outros tratamentos podem induzir irritação, como as pregas cutâneas⁸⁴. Na psoríase, as células-alvo dos corticosteroides são os queratinócitos, as células imunológicas e os fibroblastos da derme, onde os receptores de glicocorticoides estão localizados⁴. Tendo atingido as células-alvo, a afinidade pelo receptor de corticosteroide irá determinar o efeito clínico^{83,84}. Os corticosteroides de uso tópico, introduzidos no início da década de 1950, são eficazes porque interferem com vários mediadores da resposta inflamatória, nomeadamente através da fosfolipase A2, prevenindo a liberação de ácido araquidônico na membrana celular e a formação de prostaglandinas e leucotrienos. Eles têm também atividade imunossupressora e antimitótica, além de inibirem a atividade fibroblástica e a síntese de colágeno⁸⁵.

O efeito dos corticosteroides de uso tópico está diretamente relacionado à sua capacidade de absorção percutânea, que depende dos seguintes fatores: 1) do estado da pele em que são aplicados (variam numa relação direta com a temperatura, humidade e existência de lesão prévia, além da espessura da camada córnea, que encontra-se espessada na psoríase); 2) da potência e concentração da substância ativa; 3) do veículo usado; 4) da associação a outras substâncias potencializadoras; 5) do modo de aplicação (quantidade, frequência, oclusão, etc.). Para a correta utilização dos corticosteroides de uso tópico é fundamental o conhecimento dos seus graus de potência, permitindo seleccionar o corticosteroide mais adequado à cada situação e à cada local de aplicação. A escolha do tipo de veículo a prescrever em cada caso deve levar em consideração a área da pele a

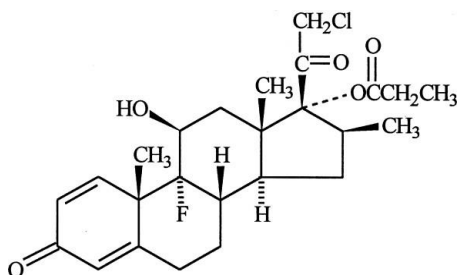
tratar, sem esquecer que o veículo em que os corticosteroides estão formulados influencia muito em sua potência⁸⁵.

Wiedersberg, Leopold e Guy⁸⁶ revisaram os principais fatores que influenciam a eficácia e a segurança de corticosteroides de uso externo, destacando fatores que vão desde a estrutura da barreira da pele, modificações na estrutura do corticosteroide, efeitos do veículo ou formulação e métodos para determinar sua biodisponibilidade. Ainda, Katz e Shaikh⁸⁷ descreveram o significado da liberação (difusão fora do veículo) e penetração (difusão para a barreira da pele) para o desenho de produtos de uso externo com base em corticosteroides, destacando que esses dois processos dependem principalmente das propriedades físico-químicas da droga e do veículo.

1.1.3 Clobetasol

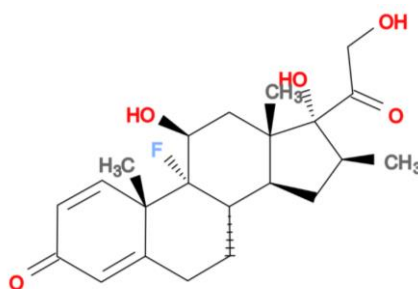
Dos corticosteroides tópicos utilizados na psoríase, o propionato de clobetasol (clobetasol) é o mais potente atualmente disponível. É considerado, na maioria dos casos, a primeira opção para tratamento tópico da doença. Trata-se de uma molécula pequena, derivada da prednisolona, com alta atividade para receptores de glicocorticoides e baixa atividade sobre receptores de mineralocorticoides. É lipofílico (solubilidade em água de 3,86 mg/L), com $\log P$ de 3,50, pK_a de 12,47 e -3,4¹⁰. A sua estrutura química é apresentada na Figura 3. O clobetasol é um fármaco, a princípio, de uso externo, disponível comercialmente nas formas de pomadas, cremes e loções. As loções, comumente apresentadas em concentração de 0,5 mg/mL, são preferidas para tratar lesões em áreas intertriginosas e representam a forma mais apropriada para tratar lesões no couro cabeludo, uma das áreas mais frequentemente acometidas pela psoríase⁸⁸. Suas formas comerciais incluem: Clob-X® (Galderma); Therapsor® (Theraskin); e, Psorex® (GlaxoSmithKline). O clobetasol não pode ser utilizado por tempo indeterminado devido à sua alta potência e efeitos colaterais. Para estes casos, sugere-se a betametasona (Figura 4), que tem potência média à baixa, ficando reservada para regiões em que não se pode utilizar clobetasol por risco de atrofia cutânea ou telangiectasias, como na face e genitais^{6,82}.

Figura 3 – Estrutura molecular do propionato de clobetasol.



Fonte: Reepmeyer, Revelle e Vidasvsky⁹⁰.

Figura 4 – Estrutura molecular da betametasona.



Fonte: o autor.

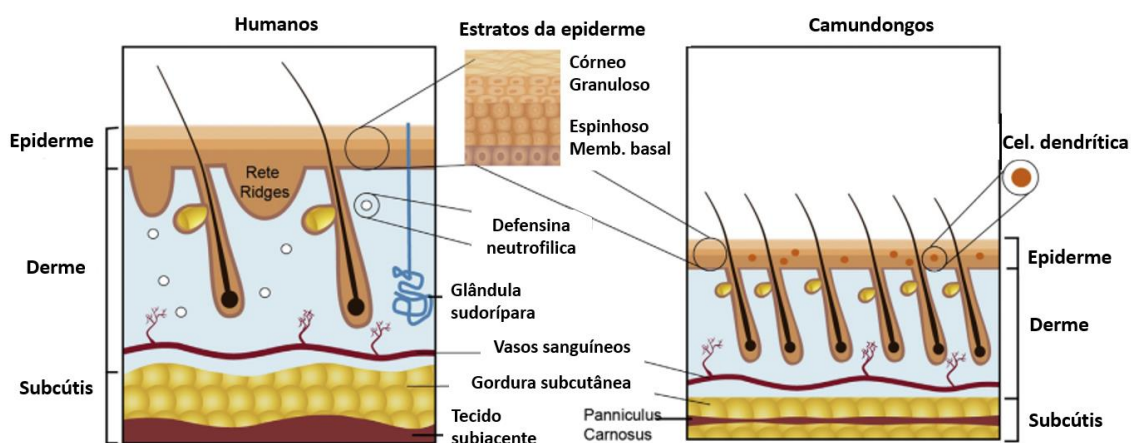
1.1.4 Segurança da corticoterapia de uso externo

O uso prolongado de corticosteroides tópicos está associado à indução de telangiectasias (fator angiogênese), estrias, atrofia cutânea e imunossupressão local e sistêmica. Ainda, podem induzir a subregulação da síntese lipídica epidérmica, o que torna a pele mais fina⁹⁰. A absorção sistêmica está associada com inúmeros efeitos colaterais, como por exemplo: desenvolvimento de síndrome de Cushing (danos ósseos e musculares, retenção de líquido); retenção de sódio; inibição do eixo hipotálamo hipofisário^{91,92}; associação à taquifilaxia, ou seja, necessidade de aumentar as doses para manter uma resposta terapêutica; além de todos os outros efeitos típicos do uso prolongado de corticoides sistêmicos^{91,93-95}. Devem ser consideradas ainda possíveis alergias ao fármaco ou ao veículo, sendo importante alertar os doentes sobre possíveis reações e efetuar substituições apropriadas em determinados casos⁸⁴.

1.1.5 Administração de fármacos através da pele

É necessário entender a anatomia, fisiologia, características físico-químicas e propriedades biológicas da pele, a fim de utilizá-la com sucesso para a administração de fármacos⁹⁶. Atualmente, os camundongos representam a espécie mais utilizada em estudos pré-clínicos de fisiologia e bioquímica, uma vez que são fáceis de manusear e reproduzem-se rapidamente, sendo economicamente mais viáveis⁹⁷. Na Figura 5 são ilustradas as principais semelhanças e diferenças entre a pele de camundongos e humanos. O processo de reparo epitelial é semelhante entre as duas espécies quando consideradas as fases que se sobrepõem, incluindo eventos moleculares e celulares, homeostase, inflamação, proliferação e remodelamento⁹⁷.

Figura 5 – Pele humana versus pele de camundongos.



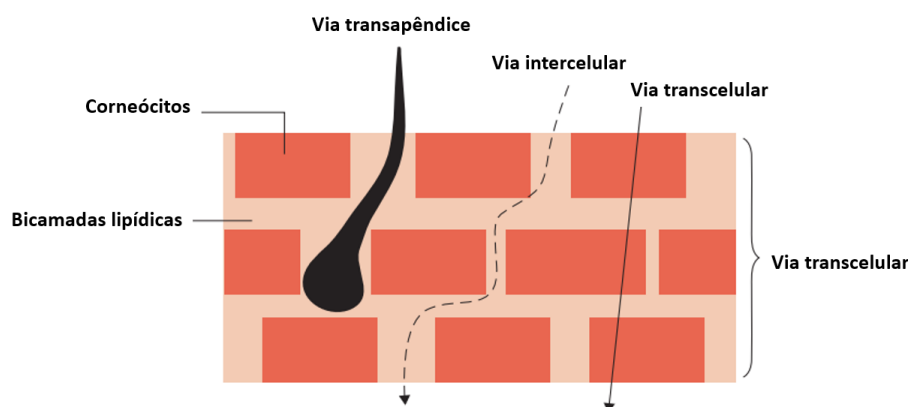
Fonte: Zomer e Trentin⁹⁷.

Por outro lado, conforme demonstrado na Figura 5, embora a pele humana e de camundongos tenham as mesmas camadas de células na epiderme e derme, elas diferem principalmente em espessura e número. A epiderme humana é composta por cinco a dez camadas celulares, enquanto a pele murina contém apenas duas ou três. Também, a pele dos camundongos contém mais folículos pilosos do que a pele humana. Estes fatores não devem excluir os modelos murinos dos estudos de administração de fármacos sobre a pele, mas servir de aviso para o estabelecimento de critérios durante a interpretação dos resultados dos estudos⁹⁷.

A partir do exposto, cabe explorar um pouco os aspectos comuns da pele humana e murina. Uma das funções naturais da pele é proteger o corpo contra a

perda endógena de substâncias e invasão por substâncias exógenas. Microscopicamente, a maioria dos pesquisadores considera que a pele é composta por três camadas histológicas (epiderme, derme e hipoderme ou tecido subcutâneo), ilustradas na Figura 5. A principal barreira à difusão através da pele é a camada mais externa da mesma, o estrato córneo, que consiste em corneócitos (também chamados queratinócitos mortos), que são inteiramente rodeados por regiões lipídicas cristalinas lamelares (Figura 6). O limite da célula - um envelope cornificado - é muito denso e tem estrutura de proteína reticulada, que reduz a absorção de fármacos através da pele. O estrato córneo é descrito como a barreira limitadora da pele em relação à epiderme e derme viáveis⁹⁸.

Figura 6 – Possíveis vias para a entrega de fármacos através do estrato córneo.



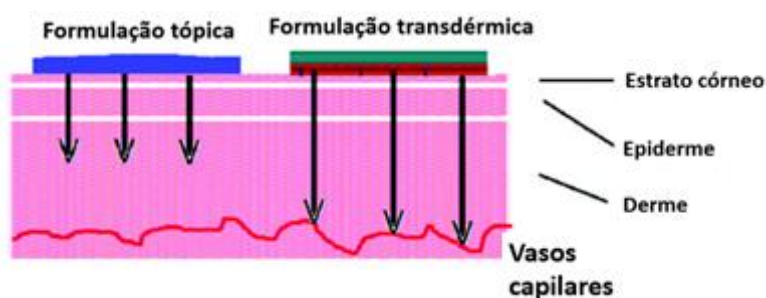
Fonte: Su e Fang⁹⁶.

A epiderme viável é uma solução aquosa de proteínas encapsuladas em compartimentos celulares por finas membranas fundidas por tonofibrilas. A epiderme não contém elementos vasculares. As células recebem nutrição de leitos capilares localizados na camada papilar da derme por difusão de componentes do plasma (Figura 6). Esta camada é formada de uma matriz proteica fibrosa e muito colágeno e elastina, elementos incorporados em uma substância fundamental coloidal amorfa. A derme é o local dos vasos sanguíneos, nervos sensoriais e vasos linfáticos. Ela contém os segmentos internos de glândulas sudoríparas e unidades pilosebáceas que também são importantes para a entrega de alguns fármacos e sistemas de transporte dos mesmos⁹⁹.

A administração de fármacos sobre a pele pode incluir: (1) particionamento do fármaco em veículo para o estrato córneo; (2) penetração através do estrato córneo;

(3) difusão através de cada camada da pele; (4) captação pela rede capilar na junção dermoepidérmica; e, (5) o transporte para os tecidos-alvo para alcançar ação terapêutica⁹⁶ (Figura 7). A absorção percutânea pode ocorrer através de duas vias: transepidérmica (intercelular e transcelular) e transapêndices (folículos pilosos, dutos sudoríparos e vias pilossebáceas, Figura 6). A penetração entre corneócitos (intercelular) é o caminho pelo qual a maioria dos compostos ou partículas penetram na pele. Como corneócitos não são empilhados paralelamente quando penetrando entre eles, um composto tem que viajar através de um caminho sinuoso. Acredita-se que este caminho permita livre difusão de volume através das bicamadas lipídicas presentes nas células¹⁰⁰.

Figura 7 – Vias de administração de fármacos sobre a pele normal: tópica e transdérmica.



Fonte: Adaptado de Muzzalupo e Tavano¹⁰⁴.

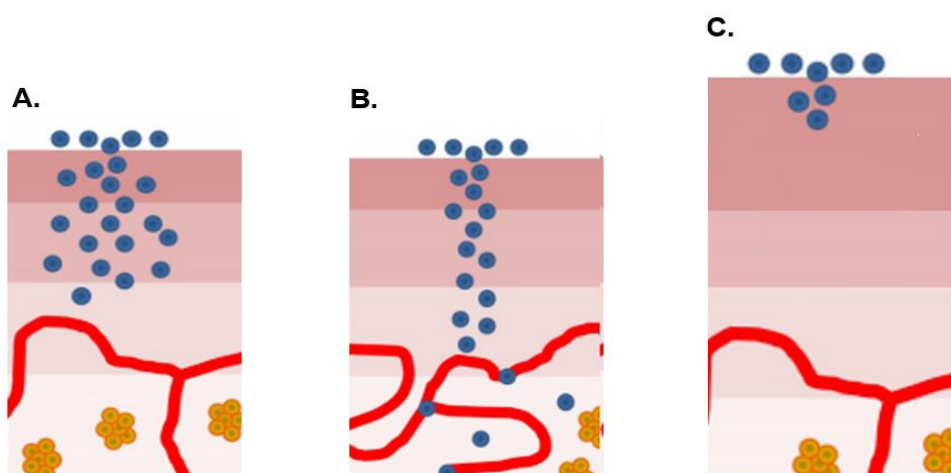
Acredita-se que a via transcelular seja hidrofílica, em princípio, sendo composta de regiões aquosas cercadas por lipídios “polares” (anfipáticos) que criam paredes de microcanais. Esta via é conhecida por ter uma alta resistência à penetração de compostos lipofílicos, mas uma baixa resistência para compostos hidrofílicos. Compostos que permeiam esta via penetram entre aglomerados de corneócitos através de imperfeições que criam aberturas para compostos e água. Algumas investigações indicaram que a queratina intracelular fornece esse caminho¹⁰¹. A via transapêndicular pode representar um caminho para superar a baixa difusividade do estrato córneo e pode agir como um desvio difusional na pele⁹⁷. Certos fármacos podem entrar nesses desvios mais rápido do que costumam passar por outras vias, dependendo da formulação e propriedades intrínsecas¹⁰².

Comumente, na administração tópica, a absorção sistêmica muitas vezes é desprezível e, assim, muitos efeitos colaterais podem ser minimizados. Dessa forma, nos casos leves a moderados de psoríase, são utilizados corticosteroides

tópicos em princípio, mesmo que a resposta possa ser mais lenta em relação ao tratamento sistêmico. Não obstante, como nas formas dermatológicas da doença as escamas epidérmicas aumentam em espessura (hiperceratose), os fármacos aplicados sobre a pele têm dificuldade de penetrar a área de tecido das lesões, o que compromete a eficácia dos mesmos¹⁰³. Nesse contexto, quanto mais espessa é a pele, mais difícil o tratamento da psoríase⁸⁴.

A Figura 8 apresenta uma ilustração representativa da administração de fármacos inicialmente sobre a pele normal (Figura 8A-B, via tópica e transdérmica, respectivamente). Em sequência, é apresentado o caso da administração de fármacos sobre a pele psoriática (Figura 8C)⁹⁶. Dois aspectos representam desafios neste tratamento: o espessamento epidérmico somado à queratinização anormal que criam um caminho mais longo através do qual os fármacos têm dificuldade em se difundir na pele psoriática (Figura 8C). As limitações continuam, se considerada a possibilidade de um comprometimento da função de barreira da pele psoriática, que neste caso, paradoxalmente, pode aumentar o risco de absorção sistêmica ou excessiva de fármacos. Deste modo, a eficácia e segurança dos fármacos ideais dependem de características físico-químicas e doses específicas de formulações que ainda são foco de interesse em novos estudos^{13,40,105}.

Figura 8 – Administração de fármacos sobre a pele normal: via tópica (A) e transdérmica (B). Administração tópica de fármacos sobre a pele psoriática (C).



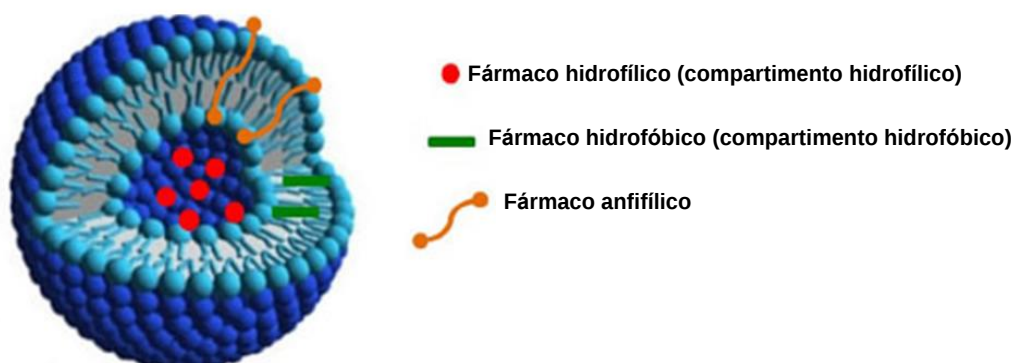
Fonte: Adaptado de Muzzalupo e Tavano¹⁰⁴.

1.1.6 Lipossomas como sistemas de transporte de fármacos

Os lipossomas vêm sendo pesquisados na área farmacêutica com vários objetivos. Podem ser utilizados para facilitar a veiculação do fármaco ao seu tecido-alvo para mascarar o sabor de um fármaco quando este é administrado por via oral (importante para medicamentos pediátricos e veterinários), proteger das enzimas digestivas, diminuir a biotransformação hepática e, assim, aumentar a biodisponibilidade. Quando empregados em formulações para aplicação sobre a pele, podem aumentar o controle da liberação dos fármacos, proteger contra agentes degradantes (como a luz solar) e aumentar a permeação cutânea, fazendo com que o fármaco chegue ao seu alvo em maior concentração (biodisponibilidade) ou que se mantenha no local das alterações patológicas (retenção e liberação controlada)¹⁰⁶. Os lipossomas representam uma das primeiras opções na área dermatológica e cosmetológica por serem parecidos com as membranas biológicas e terem sua aplicação apoiada por inúmeros trabalhos científicos, tendo relevância como sistemas carreadores de fármacos bem-sucedidos em suas variadas abordagens^{24,30,106–108}.

Os lipossomas foram descobertos por Alec D. Bangham na década de 1960 no Instituto Babraham, da Universidade de Cambridge¹⁰⁹. Consistem em vesículas formadas por bicamadas lipídicas concêntricas únicas ou múltiplas que encapsulam um compartimento aquoso. As primeiras formulações eram compostas exclusivamente por lipídios naturais. Atualmente, são incluídos lipídios e surfactantes naturais e/ou sintéticos, tendo a capacidade de encapsular agentes lipofílicos em sua membrana lipídica e hidrofílicos no núcleo aquoso (Figura 9).

Figura 9 – Lipossomas de fosfolipídios.



Fonte: Adaptado de Muzzalupo e Tavano¹⁰⁴.

O tamanho dessas vesículas lipídicas quase esféricas pode variar de alguns nanômetros a micrômetros. Contudo, os lipossomas mais utilizados são nanoestruturados, variando geralmente entre 50 e 450 nm. Sua morfologia é semelhante a das membranas celulares, o que lhes conferem um formato esférico denominado “vesículas”, com capacidade para incorporar várias substâncias³⁰. Formados na maioria das vezes por fosfolipídios, são compostos de moléculas anfifílicas que possuem uma cabeça hidrofílica e duas cadeias hidrofóbicas apolares. Quando os fosfolipídios são dispersos em soluções aquosas devido à sua natureza anfipática, têm uma forte tendência a formar membranas, principalmente por interações hidrofóbicas (interação intermolecular no qual compostos apolares sofrem consequências das ações dinâmicas dos compostos polares). Em solução aquosa estas propriedades duplas (cabeças polares e longas cadeias alifáticas apolares) favorecem a formação de duas camadas lipídicas. Essas propriedades apresentam vantagens biológicas e tecnológicas para o desenvolvimento de sistemas de liberação ideais para substâncias biologicamente ativas, *in vitro* e *in vivo*. Os lipossomas têm sido considerados o sistema de transporte de fármacos mais bem-sucedido em desenvolvimento até o momento^{108–113}.

Recentemente, os lipossomas foram usados para a elaboração de vacinas contra a pandemia do SARS-CoV-2. O RNA mensageiro do vírus com nucleosídeo modificado em Comirnaty™ foi formulado em nanopartículas lipídicas, permitindo que o RNA não replicante entre nas células hospedeiras para a expressão transitória do antígeno Spike (S) do vírus SARS-CoV-2. O mRNA codifica a proteína S integral ligada à membrana com duas mutações pontuais na hélice central. A mutação destes dois aminoácidos para a prolina bloqueia a proteína S numa conformação pré-fusão antigenicamente preferida. Assim, a vacina induz imunidade celular e produção de anticorpos neutralizantes contra o antígeno S, o que pode contribuir para a proteção contra a COVID-19 (vacina Pfizer-BionTech)¹¹⁴.

Na estrutura do lipossoma as cadeias hidrofóbicas de cada camada fazem interface umas com as outras e constituem um compartimento interno lipofílico que atua como uma barreira de permeabilidade. Interações hidrofóbicas estão por trás da formação dessas bicamadas lipídicas. Ainda, a chamada força de van der Waals¹¹⁵ (interações intermoleculares fracas) mantêm as longas caudas de hidrocarbonetos juntas, fortalecendo assim sua arquitetura. Por último, pontes de

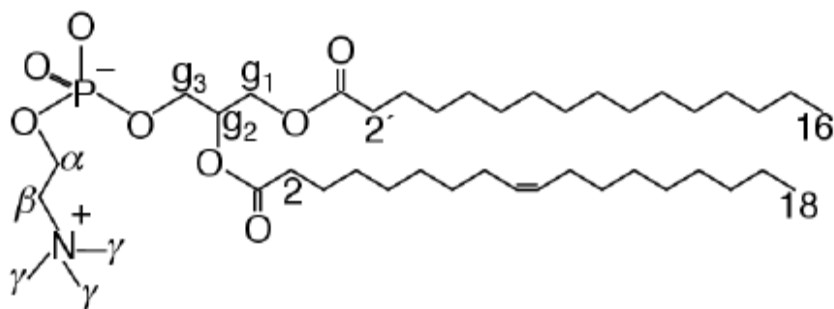
hidrogênio e interações polares entre as moléculas de água do ambiente aquoso e as cabeças polares dos fosfolipídios estabilizam essa organização. A conformação final dos fosfolipídios depende de sua natureza, concentração, temperatura e forma geométrica. Os íons ou moléculas que estiverem presentes durante o processo de formulação poderão ser encapsulados nessa estrutura¹¹⁶.

É sabido que a constituição lipídica dos lipossomas favorece a interação com o estrato córneo, podendo proporcionar um aumento na penetração cutânea de vários ativos em peles normais. Além disso, estas partículas podem se fundir na superfície da pele, promovendo oclusão e hidratação do estrato córneo, favorecendo a penetração do fármaco em peles normais e retenção em peles não saudáveis, como no caso da psoríase e da dermatite atópica¹⁹, promovendo também tempo de retenção aumentado por deposição de substâncias nas camadas afetadas pelo fenômeno de paraceratose¹¹⁷, onde os queratinócitos, em seu espessamento, dificultam a administração de fármacos por via tópica. Estudos têm mostrado o potencial desses sistemas para saturar o estrato córneo com altos níveis da substância ativa, o que não seria possível com os veículos convencionais. Os lipossomas possuem a habilidade de melhorar a farmacocinética e as propriedades farmacológicas do princípio ativo, sem necessidade de alterar quimicamente a molécula; possibilitam encapsular fármacos hidrofílicos ou lipofílicos; potencializam a eficácia terapêutica através da liberação do fármaco no tecido-alvo, ou mesmo em células específicas, evitando danos em células saudáveis; eles permitem permeação de fármacos através das barreiras biológicas; aumentam a penetração celular na pele; possibilitam a administração de doses menores; têm perfil de liberação controlada ou sustentada¹⁹. Dessa forma, acredita-se que as formulações lipossomais possam contribuir para aumentar a potência dos fármacos, um parâmetro central em farmacologia e ciências bioquímicas, assim como na descoberta e desenvolvimento de fármacos, pois é utilizada para descrever a relação entre a dose ou concentração e a intensidade de uma resposta biológica determinada¹¹⁸.

Um dos tipos de fosfolipídios mais utilizados na constituição dos lipossomas é a fosfatidilcolina, cuja estrutura é apresentada na Figura 10. A fosfatidilcolina constitui o principal componente da fração fosfatada, obtida a partir da gema de ovo ou de grãos de soja e girassol, de onde é extraída por meios mecânicos ou químicos. Encontra-se presente, também, no plasma sanguíneo como constituinte de lipoproteínas. É biocompatível, biodegradável e tem ação tensoativa. É formada

por duas cadeias longas de hidrocarbonetos, que são ácidos graxos (uma molécula saturada e outra insaturada), que constituem a porção hidrofóbica ou apolar da molécula. A porção hidrofílica ou polar é formada pelo glicerol (ou glicerina), um grupamento fosfato e uma molécula de colina¹¹⁹.

Figura 10 – Estrutura química de 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina.



Fonte: Botan et al¹²⁰.

As emulsões e suspensões contendo lipossomas de fosfatidilcolina são compostas por fases oleosa e aquosa, somadas a um ou mais estabilizadores (tensoativos), formando glóbulos de tamanho submicrométrico, sendo consideradas um excelente sistema de liberação controlada de substâncias biologicamente ativas devido à sua flexibilidade estrutural, seja em termos de tamanho, composição e fluidez da bicamada lipídica, como também por sua capacidade de incorporar uma variedade de compostos hidrofílicos e/ou hidrofóbicos¹²¹.

Vários estudos demonstraram que formulações contendo lipossomas de fosfatidilcolina podem aumentar a penetração e retenção de drogas na pele, provavelmente devido ao efeito oclusivo causado pela formação de um filme intacto em sua superfície^{122,123}. Além disso, as formulações com lipossomas de fosfatidilcolina podem interagir com os lipídios nas camadas mais externas da pele, resultando na fluidização do estrato córneo e aumento da permeação do fármaco na pele normal e retenção na pele psoriática. As vesículas contidas nestas formulações também podem se acumular nos apêndices da pele, como os folículos pilosos, atuando como um reservatório de longo prazo para a liberação do fármaco¹²⁴.

Pesquisadores testaram formulações contendo ácido ascórbico em lipossomas de fosfatidilcolina sobre amostras de pele humana em *ex vivo*. O ácido ascórbico é utilizado em dermatologia pelo seu potente efeito antioxidante e anti-inflamatório, prevenindo o fotoenvelhecimento dos queratinócitos. Contudo, devido à

instabilidade química e baixa penetração pela pele, um veículo apropriado é mandatório para se obter os efeitos desejados do ácido ascórbico. As amostras de pele foram coletadas da região abdominal de 10 pacientes, sendo as preparações lipossomais testadas sobre a pele toda, isto é, envolvendo a epiderme e a derme. A absorção percutânea do ácido ascórbico foi monitorada por histologia e célula de difusão de Franz. Os resultados mostraram que a formulação lipossomal melhorou a penetração pela pele e estrato córneo, permitindo que o ácido ascórbico instável e hidrofílico alcançasse regiões da epiderme e da derme, melhorando seus efeitos protetores frente a irradiação ultravioleta tipo A e B¹²⁵.

Ainda, Silva e colaboradores²⁰, no intuito de aumentar a retenção na pele de drogas para o tratamento da psoríase nas camadas externas da pele e melhorar a segurança da terapia tópica, utilizaram nanoemulsões à base de fosfatidilcolina, taurodesoxicolato, ácido esteárico e ácido oleico, *in vitro*. Estudos de penetração em célula de difusão tipo Franz e amostras de pele íntegra de orelhas suínas foram utilizadas como modelo experimental de pele. Os resultados demonstraram que o nanoencapsulamento de clobetasol tem um alto potencial para melhorar a terapia de uso externo, visto que o estrato córneo atua como reservatório de fármaco (retenção), levando ao maior acúmulo de clobetasol nessa camada e suas concentrações na pele remanescente, evitando assim absorção sistêmica durante os esquemas de administração prolongada. Esses resultados justificam o desenvolvimento de mais pesquisas envolvendo os lipossomas de fosfatidilcolina contendo clobetasol em modelos de psoríase que apresentam características distintas em relação à pele íntegra.

1.1.7 Um veículo lipossomal disponível comercialmente

Nos últimos anos diversas formulações à base de cremes e loções lipossomais tem surgido no mercado, principalmente para o uso transdérmico. Entre elas, um produto inovador que recentemente foi disponibilizado comercialmente caracteriza-se por um veículo à base de óleo e água, contendo lipossomas de fosfatidilcolina em matriz de polímero carboxivinílico. O veículo também é composto por potenciadores de permeação e estabilizadores (miristato de isopropila, ácido esteárico, monoestearato de glicerol, estearato de polioxil 40 e palmitato de isopropila)³¹, sendo patenteado pelo laboratório holandês Fagron com o nome de

Pentravan®. Este veículo é promotor de permeação cutânea, sendo formado por biolipídeos em forma de bicamada lamelar. O produto foi desenvolvido por um processo altamente tecnológico para apresentar elevada biocompatibilidade celular, sensorial agradável e diferenciado e atender todos os requisitos de segurança necessários. No entanto, até o presente momento, apenas estudos para seu uso em pele íntegra e em mucosas foram realizados, incluindo hormônios esteroidais sexuais^{32,33}. Conforme mencionado, o núcleo esteroide também é característico da estrutura do clobetasol⁸⁹. O veículo lipossomal em questão é livre de ingredientes reconhecidamente ou potencialmente irritantes, tóxicos ou controversos e promove uma leve desorganização da camada lipídica da pele sem dissolvê-la como faz o dimetilsulfóxido (DMSO), permitindo a penetração do princípio ativo através do estrato córneo (ação surfactante anfotérica)³¹.

Estudos demonstraram a capacidade dos nanolipossomas de fosfatidilcolina de veicular hormônios esteroides de forma eficaz e segura. Uma análise anterior determinou o tamanho médio de partículas lipossomais feitas com este veículo e testosterona, que foi de $141,20 \pm 30,60$ nm e índice de polidispersividade de 1,544^{32,34,36,37,126}. Lehman e colaboradores³³ testaram a testosterona e o cetoprofeno em formulações contendo os lipossomas, demonstrando melhor permeação destas drogas através da pele.

1.1.8 Modelos animais de lesões psoriasiformes

A psoríase é uma doença que acomete primordialmente os seres humanos, à exceção de casos esporádicos em algumas espécies de primatas. Nesse sentido, os modelos não-humanos de psoríase podem somente providenciar uma aproximação daquilo que ocorre na doença real¹²⁷. O estudo por novos fármacos para o tratamento da psoríase historicamente apresenta um grande gargalo devido à falta de modelos experimentais que recapitassem a doença que ocorre nos humanos. Sempre foi considerado complicado extrapolar a partir de culturas de células para a situação *in vivo*, pois os queratinócitos em cultura rapidamente tornam-se mutantes. O fato de a psoríase ser uma doença que acomete mais de um sistema anatômico simultaneamente, observando-se distúrbios dos queratinócitos da epiderme na forma cutânea juntamente com distúrbios celulares do sistema imunológico, torna muito difícil realizar investigações utilizando sistemas *in vitro*.

Nickoloff e Wrone-Smith¹²⁸ romperam uma barreira realçando a possibilidade de indução experimental de lesões psoriasiformes em roedores. Mesmo assim, a metodologia proposta ainda foi e tem sido considerada muito complexa devido aos custos e à dificuldade na manipulação de animais imunodeficientes. O modelo proposto é extremamente trabalhoso e requer considerável experiência e habilidade técnica. Além disso, a falta de um sistema imune funcional neste modelo de xenoenxerto limita a sua utilização no estudo de abordagens de intervenções imunes¹¹⁷.

Por motivos como estes, o modelo de indução de lesões psoriasiformes feito com a administração tópica do fármaco imiquimode em camundongos Balb-c tem sido considerado um dos 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 tópico de verrugas genitais e perianais causadas pelo vírus do papiloma humano (HPV)¹²⁹, além de indicações clínicas em lesões cutâneas pré-cancerosas, tais como queratoses actínicas e carcinomas de células basais superficiais^{130,131}. Inicialmente, foi observado que o fármaco causava exacerbação da psoríase em pacientes com doença bem controlada durante o tratamento tópico de queratoses actínicas e carcinomas de células basais superficiais¹³². Foi observado também que a exacerbação ocorria tanto na área tratada como também em áreas distantes da pele previamente afetada¹³³. Por meio 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 IFN- γ e inflamação mediada pelo eixo de citocinas IL-23/IL-17, todas estas características comuns da doença psoriática em humanos^{117,132,134}. 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. No entanto, é preciso admitir que ainda existem características deste modelo a serem descobertas e que estudos com este objetivo estão ainda sendo publicados na literatura^{117,135,136,137}.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia, a potência farmacológica e a segurança do tratamento com clobetasol em veículo lipossomal em camundongos com lesões psoriasiformes e contribuir a caracterização do mecanismo de ação anti-inflamatório.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O presente estudo visa investigar especificamente nos animais com lesões psoriasiformes induzidas por imiquimode ou veículo e tratados com clobetasol em veículo convencional ou lipossomal em diferentes doses:

- Avaliar a gravidade de lesões psoriasiformes;
- Comparar o tempo necessário para o desaparecimento das lesões psoriasiformes;
- Avaliar a acantose da pele;
- Avaliar a temperatura da pele como sinal de inflamação;
- Dosar a concentração de IL-17A, IFN- γ e IL-10 nas amostras de pele;
- Avaliar em amostras de pele a fosforilação de proteína cinase B (Akt) e das cinases ativadas por mitógenos (fosforilação da ERK1 e ERK2);
- Avaliar hemograma e leucograma nas amostras de sangue;
- Monitorar o peso dos animais, o consumo de água e ração;
- Avaliar a atividade locomotora dos animais;
- Determinar o peso dos órgãos dos animais.

3. MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo pré-clínico experimental com análises *in vivo* e *ex vivo*.

3.2 LOCAL E DATAS

A presente pesquisa foi conduzida nas dependências e laboratórios do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na UNISUL campus Pedra Branca em Palhoça-SC (Brasil), nas dependências do Laboratório de Neurociência Experimental (LANEX). Sua execução experimental ocorreu no período entre outubro de 2020 e o primeiro semestre de 2021.

3.3 MATERIAL E EQUIPAMENTOS

Foram utilizados para o desenvolvimento deste estudo os seguintes materiais e equipamentos:

- Ácido etilenodiaminotetracético EDTA (Sigma-Aldrich, EUA);
- Agitador magnético, vortexador e centrífuga baby (Quimis®, Brasil);
- Anticorpos primários anti-Akt, anti-fosfo Akt, anti-ERK, anti-fosfo ERK, anti- β -actina-HRP e anticorpos secundários conjugados (Santa Cruz, EUA);
- Arena de campo aberto (Insight, Brasil);
- Balança analítica (Shimadzu AUY 220, Japão);
- Câmera Termográfica (FLIR C2, Oregon, EUA);
- Centrífuga de microtubos (Eppendorf, Alemanha);
- Centrífuga refrigerada (Solab Científica-405, Brasil);
- Coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich, EUA);
- Criotubos (Sigma-Aldrich, EUA);
- DMSO (Galena, Brasil);
- Leitor de microplacas por espectrofotometria (Quimis®, Brasil);

- Etanol (Vetec®, EUA);
- Microtubos Eppendorf (Sigma-Aldrich, EUA);
- Gaiolas para animais (SoftLab, Brasil);
- Imiquimode 250 mg/sachê (Neoquímica, Brasil);
- Kits de Elisa para dosagem de IL-17A, IFN- γ (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e IL-10 (R&D Systems, Minneapolis, MN);
- Kit para detecção de quimiluminescência (Amersham®);
- Microscópio óptico (Olympus, Japão);
- Microsoft Excel (Washington, EUA);
- Micropipetas (Axygen, EUA);
- Veículo à base de fosfatidilcolina PentraVan (Fagron, Holanda);
- Placas cultura 96 poços (Prolab, Brasil);
- Propilenoglicol (Galena, Brasil);
- Propionato de Clobetasol (Iberoquímica, Brasil);
- Solução de tampão fosfato-salina (PBS);
- Sistema e reagentes de *Western Blot* (Bio-rad, EUA);
- Sistema de revelação e captura de imagens (iBright – Life Sciences);
- Software GraphPad Prism 9 (San Diego, EUA);
- Software ANYmaze® (Stoelting, EUA).

3.4 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos *Mus musculus* da linhagem Swiss albino provenientes da Universidade Federal de Santa Catarina. Estes, foram alojados no biotério do LANEX, da Unisul, *campus* Pedra Branca em Palhoça, Santa Catarina. Os critérios de inclusão para os animais foram: 1) atestado de sanidade animal; 2) homogeneidade animal em termos de idade (cerca de dois meses), peso (40 ± 10 g); e, 3) mesma procedência (Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina). O principal critério de exclusão foi relacionado à presença de sinais de alterações morfológicas ou comportamentais, tais como piloereção, agressividade, letargia e qualquer outro distúrbio aparente.

Foram utilizadas fêmeas, adultas jovens, com idade aproximada de 60 dias, pesando cerca de 40 g. Os animais foram mantidos sob condições controladas (ciclo claro e escuro de 12 horas, temperatura entre 22 ± 2 °C, 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 da prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA)¹³⁸.

3.5 FORMULAÇÕES E FORMAS DE APRESENTAÇÃO

Todas as formulações foram administradas em uma forma farmacêutica pré-definida (loções emolientes de uso externo). Esta definição teve como base a literatura e ao fato das lesões psoriáticas aparecerem ressecadas e descamativas. Nesse sentido, procurou-se incluir emolientes na composição dos medicamentos para tratamento tópico^{139,140}. As características das loções são apropriadas para este tipo de estudo pois as mesmas foram homogêneas, permitindo o controle mais preciso de doses. Além disso, elas apresentaram viscosidade e espalhabilidade adequadas à aplicação sobre a pele¹⁴¹.

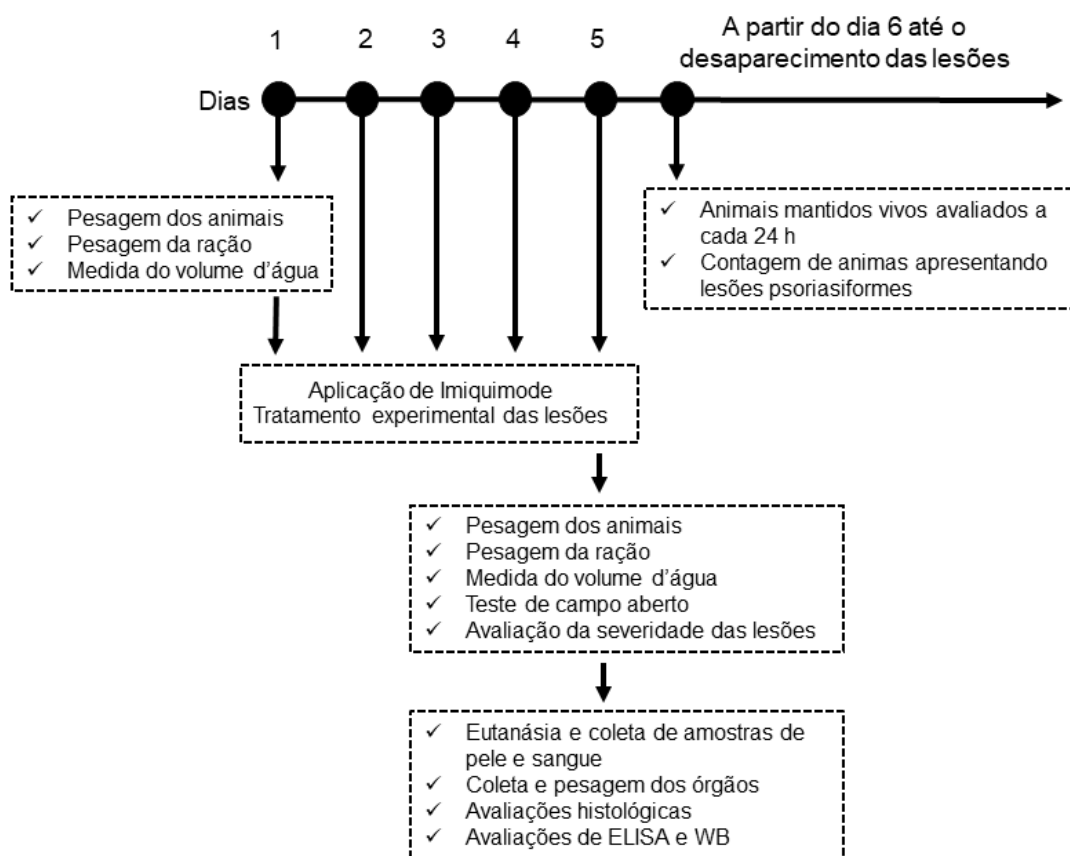
A loção de uso externo de clobetasol em veículo convencional utilizada foi manipulada em veículo convencional, semelhante aos veículos usados em suas formas comercializadas, contendo clobetasol a 0,5 mg/mL. O veículo desta formulação foi constituído de DMSO a 1%, propilenoglicol 10%, álcool etílico 15%, metilparabeno 0,02%, citrato de sódio 0,02%, ácido cítrico (ajuste de pH) e água destilada qsp. O ácido cítrico nessa formulação foi utilizado somente para o ajuste de pH¹⁴². As loções lipossomais foram preparadas em veículo à base de lipossomas de fosfatidilcolina em base de óleo e água e matriz de polímero carboxivinílico, contendo potenciadores de permeação e estabilizadores. Esta fórmula contém miristato de isopropila, ácido esteárico, monoestearato de glicerol, estearato de polioxil 40 e palmitato de isopropila^{31,32}. As formulações testadas neste estudo foram adquiridas com laudo técnico de qualidade físico-química e microbiológica, sendo preparadas pela farmacêutica responsável na Farmácia DayPharma, São Paulo (Brasil).

3.6 DELINEAMENTO DE ESTUDO

O delineamento deste trabalho foi definido com base no desenho de estudos semelhantes publicados anteriormente^{117,143–145}. A maioria destes utilizou o modelo de lesões induzidas por imiquimode em camundongos e tratamentos experimentais administrados diariamente, pelo período de quatro a sete dias^{117,143}. Desai e colaboradores¹⁴⁴ testaram a administração tópica de uma associação de RNA silenciador anti-TNF e capsaicina em nanopartículas lipídicas que demonstraram inibir eficientemente a inflamação da pele causada pelo imiquimode em camundongos¹⁴⁴. Neste estudo, os autores testaram três doses das nanopartículas que foram administradas a cada 24 h durante três dias. Em outro estudo semelhante, Walunj e colaboradores¹⁴⁵ desenvolveram um projeto intitulado “Preparação, caracterização e avaliação *in vivo* de lipossomas catiônicos contendo ciclosporina para o tratamento de lesões psoriasiformes” (em camundongos). Os autores realizaram um tratamento experimental diário durante cinco dias consecutivos. Para definir a extensão do tratamento experimental na presente tese optou-se também por um tratamento experimental realizado durante cinco dias consecutivos^{146,147}, conforme observado no desenho experimental a seguir (Figura 11).

Vinte e quatro horas antes do experimento foi realizada a depilação dos animais na área dorsal (2 cm²) e a alocação nos diferentes grupos experimentais. No dia 1 foi realizada a pesagem inicial dos animais, quantificados água e ração através de metodologia detalhada. Os tratamentos dos animais foram realizados durante os cinco dias subsequentes. No dia 5, duas horas após a administração das últimas doses dos tratamentos, os animais/água/ração foram pesados novamente, sendo avaliada a atividade locomotora¹⁴⁷ e a gravidade das lesões e temperatura da pele¹¹⁷ (n=12/grupo). Na sequência, foram coletadas as amostras de sangue e induzida morte indolor assistida em seis animais de cada grupo¹³⁸ para obtenção das amostras de pele necessárias às avaliações moleculares (ELISA e *Western Blotting*). Os animais remanescentes mantidos vivos (n=6/grupo) foram monitorados diariamente, a partir do sexto dia, para determinar o tempo de desaparecimento das lesões¹⁴⁸.

Figura 11 – Desenho experimental.



Fonte: Adaptado de van der Fits et al.¹¹⁷ e Walunj et al.¹⁴⁵.

3.6.1 Grupos experimentais

Os animais foram alocados em oito grupos experimentais, apresentados a seguir:

- **Sham/Veículo Convencional e Sham/Veículo Lipossomal.** Dois grupos Sham tratados somente com os veículos convencional ou lipossomal. Os dados coletados junto a estes grupos refletem os eventuais efeitos dos veículos *per se*. Estes grupos foram compostos por animais não submetidos ao procedimento de indução de lesões, mas tratados com os veículos em volume determinado em estudos anteriores (100 μ L)^{146,147}, um volume suficiente para cobrir toda a área das lesões (2 cm²). Cabe ressaltar, todos os grupos experimentais

envolvidos nesta pesquisa foram tratados com o mesmo volume de cada dose (100 μ L)^{146,147};

- **Imiquimode/Veículo Convencional e Imiquimode/Veículo Lipossomal.** Dois grupos controles em que foram induzidas lesões com imiquimode e tratadas somente com os veículos (convencional ou lipossomal). Comparações realizadas frente aos dados obtidos nestes grupos vislumbram possíveis indicadores da eficácia dos tratamentos experimentais;
- **Imiquimode/Clobetasol 0,5 mg/mL em Veículo Convencional.** Grupo no qual as lesões psoriasiformes induzidas por imiquimode foram tratadas com clobetasol em veículo convencional em dose comercialmente disponível (0,5 mg/mL)¹⁴⁹ por loção de uso externo. Comparações frente aos dados obtidos neste grupo podem revelar diferenças entre os tratamentos experimentais com veículo lipossomal e o tratamento com veículo convencional;
- **Imiquimode/Clobetasol 0,1; 0,25 ou 0,5 mg/mL em Veículo Lipossomal.** Três grupos-teste tratados com clobetasol em veículo nanoestruturado à base de lipossomas de fosfatidilcolina. Foram testadas três doses distintas de clobetasol. A primeira foi equivalente aos medicamentos (loções de uso externo) à base de clobetasol disponibilizados comercialmente (0,5 mg/mL). Para testar a hipótese desta tese (eficácia satisfatória em doses menores, associadas com menos efeitos colaterais), os últimos dois grupos-teste foram tratados utilizando clobetasol a 0,25 mg/mL e 0,1 mg/mL. Comparações frente aos dados deste grupo permitem uma estimativa da potência farmacológica, além das avaliações dos parâmetros relacionados à segurança.

3.6.2 Tamanho amostral

Uma análise de poder indicou que pelo menos seis camundongos por grupo foram necessários para detectar diferenças em termos de resolução das lesões (desaparecimento das mesmas) em um contexto de poder estatístico de 80%, intervalo de confiança de 95%, razão de 1:1 entre os grupos e levando em

consideração o padrão de resolução das lesões^{2,9,102}. Uma equação para determinar o tamanho das amostras sem reposição foi utilizada (Eq.1): $n = \{[(z \text{ alfa} + z \text{ beta}) * s] / \sigma\}^2$. 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. A quantidade de 12 animais por grupo surge da necessidade de um número significativo para se obter amostras biológicas e, por outro lado, da necessidade de animais vivos, para realizar todas as análises da última fase (contagem do tempo necessário para o desaparecimento das lesões) esquematizada na Figura 11.

3.7 INDUÇÃO DE LESÕES PSORIASIFORMES POR IMIQUIMODE

As lesões psoriasiformes foram induzidas farmacologicamente, com exceção dos grupos Sham, aplicando 62,5 mg de imiquimode por via tópica, uma vez ao dia, durante cinco dias consecutivos, sobre a área dorsal depilada dos animais. Observar-se que dois ou três dias após o início da aplicação do imiquimode o dorso dos camundongos exibe sinais de eritema, descamação e espessamento¹³⁷. Esse modelo não possibilita indução de lesões por tempo prolongado uma vez que os animais tratados topicamente com imiquimode desenvolveriam uma resposta inflamatória sistêmica, ficando propensos à desidratação⁸⁸. Por este motivo, optou-se nesta tese pela utilização da metodologia de van der Fits e colaboradores¹¹⁷ e Walunj e colaboradores¹⁴⁵.

3.8 TRATAMENTOS COM CLOBETASOL

Do dia 1 ao dia 5, após duas horas da aplicação de imiquimode para indução das lesões psoriasiformes ou veículo, foi aplicado topicamente na pele do dorso dos camundongos (n=12/grupo) as soluções de veículo lipossomal ou convencional per se (Imiquimode/Veículo Convencional, Imiquimode/Veículo Lipossomal); clobetasol 0,5 mg/mL em veículo convencional (Imiquimode/Clobetasol 0,5 mg/mL em Veículo Convencional) ou clobetasol 0,1; 0,25 ou 0,5 mg/mL em veículo lipossomal (Imiquimode/Clobetasol 0,1; 0,25 ou 0,5 mg/mL em Veículo Lipossomal).

3.9 ENSAIOS/TESTES/TÉCNICAS

3.9.1 Avaliação da eficácia dos tratamentos

Foram utilizados dois indicadores de eficácia dos tratamentos experimentais: a severidade das lesões psoriasiformes avaliadas e comparadas por meio da escala PASI adaptada para camundongos¹¹⁷ e o tempo necessário para o desaparecimento das lesões. O método PASI é um instrumento utilizado para determinar a gravidade dos casos dermatológicos de psoríase em humanos⁷². Trata-se de uma escala de pontuação visual. Na versão adaptada para camundongos a pontuação total da escala vai de zero a doze. São avaliados três parâmetros: eritema, descamação e espessamento da pele. Não foi avaliado o parâmetro superfície corporal pois este foi pré-determinado em 2 cm² para indução da lesão. A pontuação foi atribuída para cada um dos parâmetros em uma escala de zero a quatro pontos, onde 0 = ausência, 1 = leve, dois = moderado, 3 = marcado e 4 = muito marcado (intenso). A pontuação final do PASI foi obtida de maneira cumulativa pela soma da pontuação obtida para cada parâmetro. O PASI foi aplicado no dia 5 a contar do início da indução das lesões (n=12/grupo)⁹.

O tempo de desaparecimento das lesões foi avaliado pela contagem diária de camundongos apresentando lesões psoriasiformes a partir do sexto dia de experimentação até o desaparecimento completo das lesões, por metodologia descrita anteriormente (n=6/grupo)¹⁴⁸. Esses dados foram plotados em um gráfico de ordenadas e coordenadas (número de animais apresentando lesões *versus* dias após a interrupção do tratamento experimental). Desta forma, a área sob a curva (AUC) foi proporcional ao tempo necessário para o desaparecimento das lesões em cada grupo e a inclinação da reta (β) utilizado para mensurar a velocidade de desaparecimento das lesões; quanto maior, mais rápido é o tempo necessário para completar a depuração das lesões induzidas por imiquimode^{146,148}.

Por fim, os animais foram submetidos à avaliação da temperatura das lesões cutâneas na área de 2 cm² da pele do dorso por meio de câmera termográfica (modelo FLIR C2, Oregon, EUA). Essa avaliação foi realizada para mensurar alterações de temperatura da pele¹⁵⁰ onde o fenômeno eritematoso é observado (n=12/grupo). Dessa forma, o processo inflamatório é avaliado indiretamente.

3.9.1.1 Coleta de sangue, pele e órgãos

Cerca de duas horas após a administração dos tratamentos no quinto dia de aplicação de imiquimode os camundongos foram anestesiados (1-2 % de isoflurano a 100% de oxigênio) e as coletas de sangue realizadas por via intraventricular. Alíquotas de sangue total contendo ácido etilenodiamino tetra-acético de sódio (Na EDTA) 1 mg/mL foram preparadas para as análises hematológicas¹⁵¹. Em sequência, foi realizada a confirmação da eutanásia por decapitação dos animais¹⁵² e posteriormente foram dissecados os rins, coração, baço e fígado (n=6/grupo). Os órgãos foram pesados imediatamente em balança analítica¹⁵³. Adicionalmente, amostra de 2 cm² de pele do dorso foi dissecada e uma porção imediatamente congelada em nitrogênio líquido e estocada em freezer -80 °C até a realização dos Ensaios de Imunoabsorção Enzimática (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) e *Western Blotting*. A outra porção de pele dissecada foi imediatamente fixada em formaldeído 10% para as análises histológicas.

3.9.1.2 Análise histológica da pele

Para as análises histológicas as amostras de pele dissecadas permaneceram fixadas em formol a 10% por 24 h. Resumidamente, o tecido foi embebido em parafina, seccionado a 5 µm verticalmente usando um micrótomo (RM2235, Leica Biosystems, Alemanha). Posteriormente, os cortes foram colocados em lâminas, desparafinizados em Xilol e hidratados com concentrações decrescentes de Álcool Etílico. Em seguida, as lâminas foram coradas com hematoxilina (Merck Cat. 115938) e eosina (Merck Cat 115935). As fatias foram examinadas em um microscópio Olympus CX41 e um software de análise de imagens Olympus (Olympus, Japão) foi usado para quantificar a acantose: formação de cones alongados compostos por queratinócitos hiperplásicos, células endoteliais ativadas e infiltrado linfocitário proeminente^{154,155}. Para a mensuração dos níveis de acantose uma lente objetiva de 10x e 40x foi posicionada ao centro do cone epitelial alongado de cada lâmina (n=6/grupo) e contado o número de células na vertical que constituíram à altura máxima de cada cone (uma lâmina/foto/animal). Assim, foi atribuído um escore onde 1-6 células = acantose leve/ausente; 7-12 células = acantose moderada e 13 células ou mais = acantose intensa.

3.9.2 Avaliação dos mecanismos de ação

3.9.2.1 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

O método de ELISA foi realizado em amostras de pele homogeneizadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS), contendo Tween® 20 (0,05%), PMSF (0,1 mM), EDTA (10 mM), aprotinina (2 ng/mL) e cloreto de benzetônio (0,1 mM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As amostras foram centrifugadas a $6000 \times g$ por 15 minutos (4°C), e o sobrenadante coletado e armazenado a -80 °C para as análises futuras. A concentração de proteína total do sobrenadante foi medida pelo método de Bradford¹⁵⁷ usando uma curva de calibração padrão com BSA (0,05 a 0,5 mg/mL). Alíquotas de 100 µl foram usadas para medir as concentrações de citocinas (IL-17A, IFN-γ e IL-10) usando kits de ELISA para camundongos de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações de citocinas foram medidas por interpolação de uma curva padrão de 8 pontos com ensaios colorimétricos a 450 nm (corrigidos por subtração da leitura a 550 nm) em um espectrofotômetro de placa (Perlong DNM-9602, Nanjing Perlove Medical Equipment Co, Nanjing, China). Os valores foram expressos em pg (citocina) por mg (proteína)¹⁵⁷.

3.9.2.2 Ensaio de *Western Blotting*

O ensaio de *Western Blotting* foi utilizado para a quantificação do imunoconteúdo das proteínas: Akt, pAkt, ERK 1/2, pERK 1/2. As amostras de pele foram pulverizadas e incubadas em tampão de lise RIPA [composto por Nonidet P-40 1%, deoxicolato de sódio 0,5%, SDS 0,1% e PBS], acrescido de ortovanadato de sódio 100 mM, PMSF 100 mM e coquetel de inibidores de proteases 1% e, em seguida, incubados em gelo por 30 minutos. Após centrifugação a $6000 \times g$ por 20 minutos (4°C) o sobrenadante foi recolhido, separado e armazenado em freezer -80 °C. O conteúdo proteico foi mensurado pelo método de Bradford¹⁵⁷ utilizando uma curva padrão de calibração com BSA (0,05 a 0,5 mg/mL). Alíquotas de proteína total (30 µg) foram fervidas a 95°C por 5 minutos em 25% do volume em tampão Laemmli (fosfato de sódio 1M pH 7,0, 10% Docecil Sulfato de Sódio (SDS), 10% β-mercaptoetanol, 50% glicerol, 0,1% azul de bromofenol).

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%. Após a eletroforese as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em tensão constante de 90 V por duas horas. Depois de uma hora de bloqueio com 5% de leite desnatado (Molico) as membranas foram lavadas e incubadas com solução Ponceau S para a detecção das proteínas transferidas. Essa marcação foi capturada por leitura colorimétrica em um fotodocumentador e utilizada como controle de carga de proteína.

Após a lavagem para remover a coloração com Ponceau S as membranas foram incubadas *overnight* (4°C) com os anticorpos primários: rabbit anti-Akt (1:1000, #9272, Cell Signaling Technology MA, USA), rabbit anti-p-Akt1/2/3 (1:1000, sc-33437, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA), rabbit anti-ERK1/2 and anti-pERK1/2 (1:1000, sc-23759, Santa Cruz biotecnologia, CA, EUA) and mouse monoclonal Anti- β -Actin-Peroxidase (1:45,000; A3854, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Depois de lavadas em tampão salina tris com Tween® 20 (TBS-T) (137 mM NaCl e 20 mM Tris HCl + 0,1% Tween® 20, pH 7,6), as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário apropriado (Abcam, Cambridge, MA, USA), conjugado à peroxidase em temperatura ambiente por uma hora.

Após esse período, uma nova lavagem de 30 minutos com TBS-T foi realizada seguida pela exposição das membranas, durante 1 minuto ao kit de quimiluminescência (ECL) e detecção usando um sistema de imagem (iBright Imaging Systems, Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). A quantificação das bandas de proteínas foi realizada por densitometria utilizando o software de análise iBright (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Os valores foram expressos graficamente como unidades arbitrárias, conforme descrito anteriormente¹⁵⁹.

3.9.3 Avaliação da segurança dos tratamentos

Para avaliar alguns parâmetros relacionados à segurança dos tratamentos foi quantificado o peso corporal, o consumo de ração/água, a atividade locomotora e o peso dos órgãos (rins, coração, baço e fígado), além das análises hematológicas. O peso dos animais e da ração foram medidos em balança analítica (Shimadzu, Japão)¹⁴⁷. O peso dos animais foi expresso como ganho ou perda de massa (g) em

cada grupo experimental. O volume de água (mL) consumido nos cinco dias de experimentação foi determinado utilizando proveta graduada (Dist, Brasil).

Possíveis efeitos sobre o padrão locomotor dos animais foram avaliados por meio do teste de campo aberto realizado duas horas após a administração das últimas doses dos tratamentos experimentais. A atividade locomotora espontânea foi registrada em uma arena quadrada de 40 cm de largura x 40 cm de profundidade x 30 cm de altura durante um período de 5 min, conforme descrito anteriormente¹⁶⁰. A distância total percorrida (em metros) foi medida utilizando o software ANYmaze® (Stoelting, EUA). O aparato foi limpo com uma solução de etanol a 10% entre os testes para minimizar a confusão de pistas de odores estranhos de animais.

As avaliações hematológicas foram realizadas em sistema automatizado ABX Pentra 45¹⁶¹. O sistema consiste em um analisador de hematologia baseado no princípio da impedância para mensuração de hemácias, leucócitos, plaquetas e basófilos; fotometria para a determinação de hemoglobina, impedância e espalhamento de luz para linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos atípicos e células imaturas. Os índices de hematócrito e eritrócito (MCV, MCH, MCHC) foram obtidos por cálculo, com 100 células sendo contadas em um campo de 400 × e 5 campos de 1000 × são contados para a contagem de plaquetas, calculada a média e multiplicada por 20. A contagem de plaquetas também foi realizada no equipamento ABX Pentra 45, e posteriormente confirmada em lâmina¹⁶¹.

3.10 VARIÁVEIS DE ESTUDO

Quadro 1 – Variáveis de estudo.

Variáveis	Tipo	Natureza	Proposta de utilização
Tratamentos	Independente	Qualitativa nominal dicotômica	Sim / Não
Lesão psoriasiforme	Independente	Qualitativa nominal dicotômica	Sim / Não
Consumo de água	Dependente	Quantitativa contínua	Mililitros média $\pm$ DP
Consumo de ração	Dependente	Quantitativa contínua	Gramas média $\pm$ DP
Peso corporal	Dependente	Quantitativa contínua	Gramas média $\pm$ DP
Deambulação	Dependente	Quantitativa discreta	Número de quadrantes
Severidade das lesões (PASI)	Dependente	Quantitativa ordinal	0-4 pontos média $\pm$ DP
Tempo para o desaparecimento das lesões	Dependente	Quantitativa discreta	Número de camundongos com lesão/dia
Temperatura da pele	Dependente	Quantitativa discreta	$^{\circ}\text{C}$ média $\pm$ DP
Contagem de leucócitos	Dependente	Quantitativa discreta	mil/ mm^3 média $\pm$ DP
Contagem de hemácias	Dependente	Quantitativa discreta	milhões/ mm^3 média $\pm$ DP
Hemoglobina	Dependente	Quantitativa discreta	g/Dl média $\pm$ DP
Hematócrito	Dependente	Quantitativa discreta	% média $\pm$ DP
MCV	Dependente	Quantitativa discreta	fL média $\pm$ DP
MCH	Dependente	Quantitativa discreta	Pg média $\pm$ DP
MCHC	Dependente	Quantitativa discreta	g/Dl média $\pm$ DP
Segmentados	Dependente	Quantitativa discreta	% média $\pm$ DP
Eosinófilos	Dependente	Quantitativa discreta	% média $\pm$ DP
Basófilos	Dependente	Quantitativa discreta	% média $\pm$ DP
Monócitos	Dependente	Quantitativa discreta	% média $\pm$ DP
Linfócitos	Dependente	Quantitativa discreta	% média $\pm$ DP
Plaquetas	Dependente	Quantitativa discreta	$\mu\text{L} \times 1000$ média $\pm$ DP
Citocinas IL-17A, IFN- γ e IL-10	Dependente	Quantitativa contínua	pg/mg de proteína média $\pm$ DP
Imunoconteúdo das proteínas pERK 1/2, ERK 1/2, pAkt e Akt total	Dependente	Quantitativa contínua	Densidade óptica média $\pm$ DP
Acantose	Dependente	Quantitativa discreta	Escore média $\pm$ DP

Abreviatura: DP, desvio padrão.

3.11 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados foram analisados no programa GraphPad Prism na versão 9.0 (La Jolla, Califórnia, EUA). Foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk para caracterização dos dados. Os resultados paramétricos foram apresentados como a média $\pm$ desvio padrão (DP). Os dados foram submetidos ao teste de análise de variância ANOVA de duas vias, seguido do teste de Tukey. Os dados de tempo de desaparecimento das lesões foram avaliados pelos declives das curvas (β), por meio de regressão múltipla e pela AUC. Valores de $p < 0,05$, foram considerados estatisticamente significativos.

3.12 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O projeto de pesquisa prévio à execução desta pesquisa foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNISUL (protocolo nº 19.044.4.01.IV). Os experimentos foram realizados seguindo as normas e cuidados de bem-estar e biossegurança na experimentação, conforme determinado na Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008, e de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), das diretrizes para cuidados e proteção de animais utilizados e o *National Institutes of Health Guidelines*.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

A seguir está inserido parte do artigo científico fruto dessa tese de Doutorado, submetido para a revista científica *Experimental Dermatology* (Online ISSN:1600-0625).

Biological activity of topical clobetasol lotions prepared in liposomal vehicle in a model of imiquimod-induced psoriasiform lesions in mice

Alexandre S. Hilel¹, Gustavo Silveira da Silva^{1,2}, Verônica Vargas Horewicz¹, Helói José Stefani³, Nathalia Nahas Donatello¹, Fernanda Belle¹, Juliete Palandi⁴, Elisa Mitkus Flores Lins¹, Josiel M. Mack^{5,6}, Daniel F. Martins¹, Maicon R. Kwiecinski¹ e Franciane Bobinski^{1,*}.

¹ Experimental Neuroscience Laboratory (LaNEx), Graduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina (UNISUL), Palhoça 88137-270, SC, Brazil.

² Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo 05508-900, SP, Brazil.

³ Doctor of the Ministry of Health of Brazil.

⁴ Laboratory of Experimentation in Neuropathology (LEN), Graduate Program in Neuroscience, Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil.

⁵ Department of Medical Clinic, Graduate Program in Medical Sciences, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis 88040-900, SC, Brazil.

⁶ Undergraduate in Medicine (UNISUL), Palhoça 88137-270, SC, Brazil.

***Correspondence**

Franciane Bobinski, Graduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina (UNISUL), Av. Pedra Branca, 25. Palhoça, Santa Catarina, Brazil. CEP: 88137-270. Fone: +55 48 3279-1057.

E-mail: franciane.bobinski@institutoanimaeducacao.org.br, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3537-1712>

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia, potência farmacológica e segurança do tratamento com clobetasol em veículo lipossomal em comparação a veículo convencional em camundongos com lesões psoriasiformes e caracterizar o mecanismo de ação anti-inflamatória. As lesões psoriasiformes foram induzidas na pele dorsal de camundongos Swiss fêmeas com imiquimode por 5 dias. Os animais foram tratados diariamente por via tópica com clobetasol 0,5 mg/mL em veículo convencional para comparação com clobetasol veículo lipossomal nas concentrações de 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,1 mg/mL. Os tratamentos tópicos com clobetasol em veículo lipossomal (0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,1 mg/mL) ou convencional (0,5 mg/mL) melhoraram o Índice de Severidade de Área da Psoríase (PASI) e a acantose epidérmica. O clobetasol, em ambos os veículos, promoveu a limpeza completa das lesões da pele. O clobetasol em veículo lipossomal a 0,5 mg/mL e 0,1 mg/mL atenuou os níveis de interleucina (IL) 17-A e interferon (IFN) - gama, assim como o clobetasol em veículo convencional a 0,5 mg/mL. Os níveis de IL-10 aumentaram com clobetasol 0,25 mg/mL em veículos lipossomais. A fosforilação da proteína Akt foi atenuada pelo clobetasol 0,5 mg/mL tanto no veículo convencional quanto no lipossomal. Todos os tratamentos mostraram-se seguros. Doses usuais de clobetasol (0,5 mg/mL) ou doses menores (0,25 mg/mL e 0,1 mg/mL) em veículos lipossomais mostraram eficácia farmacológica e segurança. Este estudo abre possibilidades para aplicações clínicas no sentido de aumentar o poder farmacológico e diminuir as doses dos fármacos utilizados no tratamento tópico da psoríase por meio do uso de veículos lipossomais, especialmente os nanolipossomas da fosfatidilcolina.

Palavras-chave: Psoríase, Lipossomas, Clobetasol, Nanotecnologia.

ABSTRACT

The aim of this study is to evaluate the efficacy, pharmacological power, and safety of the treatment with clobetasol in a liposomal vehicle compared to a conventional vehicle in mice with psoriasiform induced lesions and to characterize the mechanisms of anti-inflammatory action. The psoriasiform lesions were induced on the dorsal skin of female Swiss mice with imiquimod for 5 days. Animals were treated daily via topical route with clobetasol 0.5 mg/mL in a conventional vehicle for comparison with the efficacy of clobetasol in a liposomal carrier with doses of 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL and 0.1 mg/mL. The topical treatments with clobetasol in liposomal vehicle (0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL e 0.1 mg/mL) or conventional vehicle (0.5 mg/mL) improved the Psoriasis Area Severity Index (PASI) and the epidermal acanthosis. Clobetasol, in both vehicles, promoted the complete clearing of the skin. Clobetasol in liposomal vehicle at 0.5 mg/mL and 0.1 mg/mL attenuated the levels of interleukin (IL)17-A and interferon (IFN)-gamma, just as the clobetasol in conventional vehicle at 0.5 mg/mL. The levels of IL-10 increased with clobetasol 0.25 mg/mL in liposomal vehicles. The Akt protein phosphorylation was attenuated by clobetasol 0.5 mg/mL in both the conventional and the liposomal vehicles. All treatments were shown to be safe. Usual doses of clobetasol (0.5 mg/mL) or lower doses (0.25 mg/mL e 0.1 mg/mL) in liposomal vehicles displayed pharmacological efficacy and safety. This study opens possibilities for clinical applications in the sense of enhancing the pharmacological power and diminishing the doses of the drugs used in the topical treatment of psoriasis through the use of liposomal vehicles, specially the nanoliposomes of phosphatidylcholine.

Keywords: Psoriasis, Liposomes, Clobetasol, Nanotechnology.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo forneceu dados inéditos acerca da eficácia, segurança e, em especial, a potência farmacológica do clobetasol quando administrado em um veículo lipossomal em camundongos submetidos à indução de lesão psoriasiforme pelo imiquimode, em doses iguais ou inferiores à titulação usualmente utilizada nos veículos disponíveis comercialmente para uso tópico na psoríase cutânea.

Observou-se uma redução expressiva nas lesões induzidas por imiquimode macroscopicamente (PASI) e microscopicamente (acantose), sem alteração da temperatura da pele entre os grupos tratados de forma tópica com clobetasol em veículo lipossomal (em diferentes concentrações) ou veículo convencional, uma mensuração empregada para a caracterização de sinais inflamatórios. O tratamento com clobetasol em diferentes concentrações, nos dois veículos, convencional e lipossomal, promoveu a limpeza completa da pele em um curto período de tempo. No entanto, o período necessário ao desaparecimento das lesões psoriasiformes foi menor no grupo tratado com clobetasol a 0,5 mg/mL em veículo lipossomal.

O tratamento com clobetasol em veículo lipossomal a 0,5 mg/mL e 0,1 mg/mL atenuou os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL17-A e IFN- γ que estavam aumentadas nos animais com lesões psoriasiformes, demonstrando seu efeito imunossupressor mesmo com baixas doses. O mesmo efeito foi observado com clobetasol em veículo convencional a 0,5 mg/mL. Foi observado aumento dos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10, que se apresentou reduzida nos animais com lesões psoriasiformes apenas no grupo tratado com clobetasol 0,25 mg/mL em veículo lipossomal, reabrindo uma discussão sobre a dosagem de corticoide no tratamento tópico da psoríase. O presente estudo sugere que doses menores de corticoterapia podem ser alcançadas em nanocarreadores, a partir do conhecimento de suas propriedades de retenção na derme e liberação controlada, potencializando o efeito dos fármacos.

A fosforilação da proteína Akt foi maior nos animais com lesões psoriasiformes e o tratamento com clobetasol 0,5 mg/mL, tanto em veículo convencional quanto lipossomal, foi capaz de reduzir significativamente essa fosforilação, sem diferença de eficácia entre os diferentes veículos. Não houve redução significativa nos grupos tratados com clobetasol a 0,1 e 0,25 mg/mL da

proteína Akt. Também, não houve diferença significativa na fosforilação das proteínas ERK1 e ERK2 entre os grupos tratados.

Em relação aos perfis de segurança avaliados, parâmetros hematológicos, alterações do peso corporal e de órgãos e deambulação não demonstraram alterações significativas, configurando a segurança dos tratamentos. Apenas foi observado variação no consumo de ração e água entre os grupos.

O tratamento tópico com clobetasol a 0,1; 0,25 e 0,5 mg/mL em veículo lipossomal mostrou-se eficaz no tratamento dos camundongos com lesões psoriasiformes, assim como o tratamento com clobetasol 0,5 mg/mL em convencional, validando o objetivo do presente estudo em buscar doses menores de corticoides para uma melhor resolução da inflamação na psoríase e menores efeitos colaterais causados pela absorção sistêmica. Este estudo abre possibilidades para ensaios clínicos futuros e uso clínico no sentido de aumentar a potência farmacológica e diminuir as doses dos fármacos utilizados no tratamento tópico da psoríase de formas cutâneas através da utilização dos veículos lipossomais, em especial, os nanolipossomas de fosfatidilcolina.

REFERÊNCIAS

1. Parisi R, Symmons DPM, Griffiths CEM, Ashcroft DM. Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence. *J Invest Dermatol*. 2013;133(2):377–85.
2. Shrivastava VK, Londhe ND, Sonawane RS, Suri JS. A novel approach to multiclass psoriasis disease risk stratification: machine learning paradigm. *Biomed Signal Process Control*. 2016;28:27–40.
3. Lowes MA, Russell CB, Martin DA, Towne JE, Krueger JG. The IL-23/T17 pathogenic axis in psoriasis is amplified by keratinocyte responses. *Trends Immunol*. 2013;34(4):174–81.
4. Krueger JG, Bowcock A. Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. *Ann Rheum Dis*. 2005;64(supl.2):30–6.
5. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Mechanism of disease: psoriasis. *N Engl J Med*. 2009;361:496–509.
6. Belge K, Brück J, Ghoreschi K. Advances in treating psoriasis. *F1000Prime Rep*. 2014;6:4.
7. Raychaudhuri SK, Maverakis E, Raychaudhuri SP. Diagnosis and classification of hypochondriasis. *Autoimmun Rev*. 2014;13:490–5.
8. Lebwohl M, Bachelez H, Barker J, Girolomoni G, Kavanaugh A, Langley R, 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 Dermatology*. 2014;70(5):871–81.
9. Uva L, Miguel D, Pinheiro C, Antunes J, Cruz D, Ferreira J, et al. Mechanisms of action of topical corticosteroids in psoriasis. *Int J Endocrinol*. 2012;2012:561018.
10. Sparidans RW, van Velsen SGA, de Roos MP, Schellens JHM, Bruijnzeel-Koomen CAFM, Beijnen JH. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric assay for clobetasol propionate in human serum from patients with atopic dermatitis. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2010;878(23):2150–4.
11. da Silva SA, Magalhães RF, Torres RAT, de Oliveira RD, Velho PENF. Use of clobetasol in lacquer for plaque psoriasis treatment. *An Bras Dermatol*. 2016;1:113–5.
12. Rendon A, Schäkel K. Psoriasis pathogenesis and treatment. *Int J Mol Sci*. 2019;20(6):1475.
13. Lin YK, Yang SH, Chen CC, Kao HC, Fang JY. Using imiquimod-induced psoriasis-like skin as a model to measure the skin penetration of anti-psoriatic drugs. *PLoS One*. 2015;10(9):e0137890.
14. Griffiths CE, Barker JN. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet*. 2007;370(9583):263–71.
15. Pacifico A, Daidone R, Peris K. A new formulation of an occlusive dressing containing betamethasone valerate 0.1% in the treatment of mild to moderate psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2006;20(2):153-7.
16. O'Neill JL, Feldman SR. Vitamin D analogue-based therapies for psoriasis. *Drugs of Today*. 2010;46(5):351-60.
17. Hou Y-C, Chu C-C, Ko T-L, Yeh C-L, Yeh S-L. Effects of alanyl-glutamine dipeptide on the expression of colon-inflammatory mediators during the

- recovery phase of colitis induced by dextran sulfate sodium. *Eur J Nutr.* 2013;52(3):1089–98.
18. Salim N, Ahmad N, Musa SH, Hashim R, Tadros TF, Basri M. Nanoemulsion as a topical delivery system of antipsoriatic drugs. *RSC Adv.* 2016;6:6234–50.
 19. Lombardi Borgia S, Regehrly M, Sivaramakrishnan R, Mehnert W, Korting HC, Danker K, et al. Lipid nanoparticles for skin penetration enhancement - Correlation to drug localization within the particle matrix as determined by fluorescence and piezoelectric spectroscopy. *J Control Release.* 2005;110:151–63.
 20. Silva LAD, Taveira SF, Lima EM, Marreto RN. In vitro skin penetration of clobetasol from lipid nanoparticles: drug extraction and quantitation in different skin layers. *Brazilian J Pharm Sci.* 2012;48(4):811–7.
 21. Sperling RA, Rivera Gil P, Zhang F, Zanella M, Parak WJ, Turkevich J, et al. Biological applications of gold nanoparticles. *Chem Soc Rev.* 2008;37(9):1896.
 22. Reis CP, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine.* 2006;2(1):8–21.
 23. Md S, Kuldeep Singh JKA, Waqas M, Pandey M, Choudhury H, Habib H, et al. Nanoencapsulation of betamethasone valerate using high pressure homogenization–solvent evaporation technique: optimization of formulation and process parameters for efficient dermal targeting. *Drug Dev Ind Pharm.* 2019;45(2):323–32.
 24. de Andrade DF, Fontana MC, Pohlmann AR, Guterres SS, Beck RCR. Nanoencapsulation of clobetasol propionate decreases its penetration to skin layers without changing its relative skin distribution. *J Nanosci Nanotechnol.* 2015;15(1):875–9.
 25. Chorilli M, Leonardi G. Lipossomas em formulações dermocosméticas. *Infarma.* 2004;16(7):75–9.
 26. Andrade LM. Obtenção de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo clobetasol e tacrolimus e avaliação da permeação cutânea [dissertação]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2014.
 27. Fontana MC, Coradini K, Guterres SS, Pohlmann AR, Beck RCR. Nanoencapsulation as a way to control the release and to increase the photostability of clobetasol propionate: influence of the nanostructured system. *J Biomed Nanotechnol.* 2009;5(3):254–63.
 28. Kalariya M, Padhi B, Chougule M, Misra A. Clobetasol propionate solid lipid nanoparticles cream for effective treatment of eczema: formulation and clinical implications. *Indian J Exp Biol.* 2005;43(3):233–40.
 29. Rao G, Murthy RSR. Evaluation of liposomal clobetasol propionate topical formulation for intra-dermal delivery. *Indian J Pharm Sci.* 2000;62(6):459–62.
 30. Bozzuto G, Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine.* 2015;10:975–99.
 31. Bourdon F, Lecoœur M, Leconte L, Ultré V, Kouach M, Odou P, et al. Evaluation of Pentravan®, Pentravan® Plus, Phytobase®, Lipovan® and Pluronic Lecithin Organogel for the transdermal administration of antiemetic drugs to treat chemotherapy-induced nausea and vomiting at the hospital. *Int J Pharm.* 2016;515(1-2):774–787.
 32. Polonini H, de Oliveira Ferreira A, Raposo NRB, Brandão MAF. Transdermal oxandrolone: ex vivo percutaneous absorption study. *Curr Drug Deliv.* 2017;14(5):696–700.

33. Lehman PA, Raney SG. In vitro percutaneous absorption of ketoprofen and testosterone: comparison of pluronic lecithin organogel vs. pentravan cream. *Int J Pharm Compd.* 2012;16(3):248-52.
34. Polonini HC, Brandão MAF, Ferreira AO, Ramos C, Raposo NR. Evaluation of percutaneous absorption performance for human female sexual steroids into pentravan cream. *Int J Pharm Compd.* 2014;18(4):332-40.
35. Elli L, Ciulla MM, Busca G, Roncoroni L, Maioli C, Ferrero S, et al. Beneficial effects of treatment with transglutaminase inhibitor cystamine on the severity of inflammation in a rat model of inflammatory bowel disease. *Lab Invest.* 2011;91(3):452–61.
36. Maia Jr H, Haddad C, Maia R, França CE, Casoy J. Pulsatile administration of testosterone by the vaginal route using Pentravan®. 17th World Congress on Controversies in Obstetrics, Gynecology & Infertility (COGI). 2013;181–4.
37. Maia Jr H, Haddad C, Hirsch MCM, Santos Junior WSD, Casoy J. Treatment of refractory endometriosis-related pain with vaginal gestrinone in pentravan associated with pinus pinaster extract and resveratrol: a preliminary study. *Gynecol Obstet.* 2014;4(9):1–3.
38. Rodrigues A, Teixeira R. Desvendando a psoríase. *Rev Anal Clin.* 2009;41:303–9.
39. Bos JD, De Rie MA. The pathogenesis of psoriasis: immunological facts and speculations. *Immunol Today.* 1999;20(1):40–6.
40. Raychaudhuri SK, Maverakis E, Raychaudhuri SP. Diagnosis and classification of psoriasis. *Autoimmun Rev.* 2014;13(4-5):490-5.
41. Boehncke WH. Etiology and pathogenesis of psoriasis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2015;41(4):665-75.
42. Rachakonda TD, Schupp CW, Armstrong AW. Psoriasis prevalence among adults in the United States. *J Am Acad Dermatol.* 2014;70(3):512-6.
43. Dogra S, Mahajan R. Psoriasis: Epidemiology, clinical features, co-morbidities, and clinical scoring. *Indian Dermatol Online J.* 2016;7(6):471–80.
44. Gladman DD, Rahman P, Krueger GG, Mease PJ, Qureshi AA, Dutz JP, et al. Clinical and genetic registries in psoriatic disease. *J Rheumatol.* 2008;35(7):1458-63.
45. Lima EA, Lima MA. Reviewing concepts in the immunopathogenesis of psoriasis. *An Bras Dermatol.* 2011;86(6):1151–8.
46. Myers WA, Gottlieb AB, Mease P. Psoriasis and psoriatic arthritis: clinical features and disease mechanisms. *Clin Dermatol.* 2006;24(5):438–47.
47. Raychaudhuri SP, Gross J. A comparative study of pediatric onset psoriasis with adult onset psoriasis. *Pediatr Dermatol.* 2000;17(3):174–8.
48. Ito T, Takahashi H, Kawada A, Iizuka H, Nakagawa H. Epidemiological survey from 2009 to 2012 of psoriatic patients in Japanese Society for Psoriasis Research. *J Dermatol.* 2018;45(3):293-301.
49. Coates LC, FitzGerald O, Helliwell PS, Paul C. Psoriasis, psoriatic arthritis, and rheumatoid arthritis: is all inflammation the same? *Semin Arthritis Rheum.* 2016;46(3):291-304.
50. Husni ME, Merola JF, Davin S. The psychosocial burden of psoriatic arthritis. *Semin Arthritis Rheum.* 2017;47(3):351-360.
51. Lowes MA, Suárez-Fariñas M, Krueger JG. Immunology of psoriasis. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:227-55.
52. Eberle FC, Brück J, Holstein J, Hirahara K, Ghoreschi K. Recent advances in understanding psoriasis. *F1000Res.* 2016;28(5):F1000 Faculty Rev-770.

53. Faerber L, Braeutigam M, Weidinger G, Mrowietz U, Christophers E, Schulze HJ, et al. Cyclosporine in severe psoriasis. Results of a meta-analysis in 579 patients. *Am J Clin Dermatol*. 2001;2(1):41–7.
54. Griffiths CEM, van der Walt JM, Ashcroft DM, Flohr C, Naldi L, Nijsten T, et al. The global state of psoriasis disease epidemiology: a workshop report. *Br J Dermatol*. 2017;177(1):e4-e7.
55. Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG. Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature*. 2007;445(7130):866–73.
56. Krueger GG, Bergstresser PR, Lowe NJ, Voorhess JJ, Weinstein GD. Psoriasis. *J Am Acad Dermatol*. 1984;11(5 Pt 2):937-47.
57. Wrone-Smith T, Nickoloff BJ. Dermal injection of immunocytes induces psoriasis. *J Clin Invest*. 1996;98(8):1878–87.
58. Nickoloff BJ. Keratinocytes regain momentum as instigators of cutaneous inflammation. *Trends Mol Med*. 2006;12(3):102-6.
59. Akhtar T, Wani WY, Kamal MA, Kaur R. Role of angiogenic growth factors in psoriasis: a review. *Curr Drug Metab*. 2018;19(11):910–6.
60. Vyse TJ, Todd JA. Genetic analysis of autoimmune disease. *Cell*. 1996;85(3):311-8.
61. Danilenko DM. Review paper: preclinical models of psoriasis. *Vet Pathol*. 2008;45(4):563–75.
62. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 5. ed. United States: W. H. Freeman and Company; 2008. 1294 p.
63. Rapalli VK, Singhvi G, Dubey SK, Gupta G, Chellappan DK, Dua K. Emerging landscape in psoriasis management: from topical application to targeting biomolecules. *Biomed Pharmacother*. 2018;106:707-713.
64. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 2001;410(6824):37–40.
65. Medema RH, Bos JL. The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signaling. *Crit Rev Oncog*. 1993;4(6):615–61.
66. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. 2007;129(7):1261–74.
67. Hemmings BA, Restuccia DF. The PI3k-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(4).
68. 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.
69. Barrea L, Savanelli MC, Di Somma C, Napolitano M, Megna M, Colao A, et al. Vitamin D and its role in psoriasis: an overview of the dermatologist and nutritionist. *Rev Endocr Metab Disord*. 2017;18(2):195–205.
70. Arruda L, Ypiranga S, Martins GA. Systemic treatment of psoriasis - Part II: Biologic immunomodulator agents. *An bras Dermatol*. 2004;79(4):393–348.
71. Menter A. The status of biologic therapies in the treatment of moderate to severe psoriasis. *Cutis*. 2009;84(supl.4):14-24.
72. Fredriksson T, Pettersson U. Severe psoriasis - oral therapy with a new retinoid. *Dermatologica*. 1978;157(4):238–44.
73. Duarte I, Buense R, Kobata C. Phototherapy. *An Bras Dermatol*. 2006;81(1):74–82.
74. Hönigsmann H. Phototherapy for psoriasis. *Clin Exp Dermatol*.

- 2001;26(4):343–50.
75. Ye W, Coates LC. Should methotrexate have any place in the treatment of psoriatic arthritis? *Rheum Dis Clin North Am*. 2019;45(3):325–39.
 76. Ellis CN, Fradin MS, Messana JM, Brown MD, Siegel MT, Hartley AH, et al. Cyclosporine for plaque-type psoriasis. *N Engl J Med*. 1991;324(5):277–84.
 77. Griffiths CE, Dubertret L, Ellis CN, Finlay AY, Finzi AF, Ho VC, et al. Ciclosporin in psoriasis clinical practice: an international consensus statement. *Br J Dermatol*. 2004;150(supl.67):11–23.
 78. Arnone M, Carvalho AVE, Takahashí MDF, Bernardo WM. Moderate to severe plaque psoriasis - treatment with drugs of the classic scheme. *Rev Assoc Med Bras*. 2019;65(4):530–44.
 79. Kolli SS, Kepley AL, Cline A, Feldman SR. A safety review of recent advancements in the treatment of psoriasis: analysis of clinical trial safety data. *Expert Opin Drug Saf*. 2019;18(6):523-536.
 80. Stern RS, Nijsten T, Feldman SR, Margolis DJ, Rolstad T. Psoriasis is common, carries a substantial burden even when not extensive, and is associated with widespread treatment dissatisfaction. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2004;9(2):136-9.
 81. Sociedade Brasileira de Dermatologia. Consenso Brasileiro de Psoríase 2012. Guias de avaliação e tratamento. 2. ed. Rio de Janeiro; 2012.
 82. Mason A, Mason J, Cork M, Hancock H, Dooley G. Topical treatments for chronic plaque psoriasis: an abridged Cochrane Systematic Review. *J Am Acad Dermatol*. 2013;69(5):799–807.
 83. Van de Kerkhof PC, Kragballe K, Segaeert S, Lebwohl M, International Psoriasis Council. Factors impacting the combination of topical corticosteroid therapies for psoriasis: perspectives from the International Psoriasis Council. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2011;25(10):1130-9.
 84. Stein Gold LF. Topical therapies for psoriasis: improving management strategies and patient adherence. *Semin Cutan Med Surg*. 2016;35(2 supl.2):S36-44.
 85. Pinto GM, Gonçalo MM, Resende C, Pereira A. Recomendações terapêuticas na psoríase. *Acta Med Port*. 2001;14(2):219-45.
 86. Wiedersberg S, Leopold CS, Guy RH. Bioavailability and bioequivalence of topical glucocorticoids. *Eur J Pharm Biopharm*. 2008;68(3):453-66.
 87. Katz M, Shaikh ZI. Percutaneous corticosteroid absorption correlated to partition coefficient. *J Pharm Sci*. 1965;54(4):591–4.
 88. Augustin M, Sommer R, Kirsten N, Danckworth A, Radtke MA, Reich K, et al. Topology of psoriasis in routine care: results from high-resolution analysis of 2009 patients. *Br J Dermatol*. 2019;181(2):358-365.
 89. Reepmeyer JC, Revelle LK, Vidavsky I. Detection of clobetasol propionate as an undeclared steroid in zinc pyrithione formulations by high-performance liquid chromatography with rapid-scanning ultraviolet spectroscopy and mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 1998;828(1-2):239–46.
 90. Paul C, Gallini A, Archier E, Castela E, Devaux S, Aractingi S, et al. Evidence-based recommendations on topical treatment and phototherapy of psoriasis: systematic review and expert opinion of a panel of dermatologists. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012;26(supl.3):1-10.
 91. Buchman AL. Side effects of corticosteroid therapy. *J Clin Gastroenterol*. 2001;33(4):289–94.
 92. Barnes PJ. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture

2005. *Br J Pharmacol*. 2006;148:245–54.
93. Dubois Declercq S, Pouliot R. Promising new treatments for psoriasis. *ScientificWorldJournal*. 2013;2013:980419.
94. Clere N, Faure S, Martinez MC, Andriantsitohaina R. Anticancer properties of flavonoids: roles in various stages of carcinogenesis. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2011;9(2):62–77.
95. Stanbury RM, Graham EM. Systemic corticosteroid therapy - side effects and their management. *Br J Ophthalmol*. 1998;82(6):704–8.
96. Su Y-H, Fang J-Y. Drug delivery and formulations for the topical treatment of psoriasis. *Expert Opin Drug Deliv*. 2008;5(2):235–49.
97. Zomer HD, Trentin AG. Skin wound healing in humans and mice: challenges in translational research. *J Dermatol Sci*. 2018;90(1):3–12.
98. Bouwstra JA, Honeywell-Nguyen PL. Skin structure and mode of action of vesicles. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002;54(supl.1):S41-55.
99. Fang J-Y, Leu Y-L. Prodrug strategy for enhancing drug delivery via skin. *Curr Drug Discov Technol*. 2006;3(3):211–24.
100. Schätzlein A, Cevc G. Non-uniform cellular packing of the stratum corneum and permeability barrier function of intact skin: a high-resolution confocal laser scanning microscopy study using highly deformable vesicles (Transfersomes). *Br J Dermatol*. 1998;138:583–92.
101. Cevc G, Schätzlein A, Richardsen H. Ultradeformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semi-permeable barriers unfragmented. Evidence from double label CLSM experiments and direct size measurements. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2002;1564:21–30.
102. Fang J-Y, Hwang T-L, Huang Y-L. Liposomes as vehicles for enhancing drug delivery via skin routes. *Curr Nanosci*. 2006;2(1):55–70.
103. Torsekar R, Gautam M. Topical Therapies in Psoriasis. *Indian Dermatol Online J*. 2017;8(4):235–45.
104. Muzzalupo R, Tavano L. Niosomal drug delivery for transdermal targeting: recent advances. *Res Reports Transdermal Drug Deliv*. 2015;4:23–33.
105. Fang JY, Fang CL, Liu CH, Su YH. Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC). *Eur J Pharm Biopharm*. 2008;70(2):633-40.
106. Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett*. 2013;8(1):102.
107. Bhatia A, Singh B, Wadhwa S, Raza K, Katore OP. Novel phospholipid-based topical formulations of tamoxifen: evaluation for antipsoriatic activity using mouse-tail model. *Pharm Dev Technol*. 2014;19(2):160–3.
108. Felice B, Prabhakaran MP, Rodríguez AP, Ramakrishna S. Drug delivery vehicles on a nano-engineering perspective. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014;41:178-95.
109. Kim JS. Liposomal drug delivery system. *J Pharm Investig*. 2016;46:387–92.
110. Pati R, Shevtsov M, Sonawane A. Nanoparticle vaccines against infectious diseases. *Front Immunol*. 2018;9:2224.
111. Al-Halifa S, Gauthier L, Arpin D, Bourgault S, Archambault D. Nanoparticle-based vaccines against respiratory viruses. *Front Immunol*. 2019;10:22.
112. Nanomedicine and the COVID-19 vaccines. *Nat Nanotechnol*. 2020;15(12):963.
113. Dube T, Ghosh A, Mishra J, Kompella UB, Panda JJ. Repurposed drugs,

- molecular vaccines, immune-modulators, and nanotherapeutics to treat and prevent COVID-19 associated with SARS-CoV-2, a deadly nanovector. *Adv Ther (Weinh)*. 2020;2000172.
114. Pfizer. Comirnaty [Internet]. 2021 [acesso em 2021 Ago 29]. Disponível em: <https://www.pfizer.com.br/bulas/comirnaty>
 115. Jaiswal RP, Beaudoin SP. London-van der Waals force field of a chemically patterned surface to enable selective adhesion. *Langmuir*. 2019;35(1):86-94.
 116. Bitounis D, Fanciullino R, Iliadis A, Ciccolini J. Optimizing druggability through liposomal formulations: new approaches to an old concept. *ISRN Pharm*. 2012;2012:738432.
 117. 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.
 118. Gabrielsson J, Peletier LA, Hjorth S. In vivo potency revisited – keep the target in sight. *Pharmacol Ther*. 2018;184:177–88.
 119. Lutz J, Augustin AJ, Jäger LJ, Bachmann D, Brandl M. Acute toxicity and depression of phagocytosis in vivo by liposomes: influence of lysophosphatidylcholine. *Life Sci*. 1994;56(2):99–106.
 120. Botan A, Favela-Rosales F, Fuchs PFJ, Javanainen M, Kanduč M, Kulig W, et al. Toward atomistic resolution structure of phosphatidylcholine headgroup and glycerol backbone at different ambient conditions. *J Phys Chem B*. 2015;119(49):15075–88.
 121. Magnusson E, Nilsson L, Bergenståhl B. Effect of the dispersed state of phospholipids on emulsification - Part 1. Phosphatidylcholine. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*. 2016;506:794–803.
 122. Marquele-Oliveira F, de Almeida Santana DC, Taveira SF, Vermeulen DM, Moraes de Oliveira AR, da Silva RS, et al. Development of nitrosyl ruthenium complex-loaded lipid carriers for topical administration: improvement in skin stability and in nitric oxide release by visible light irradiation. *J Pharm Biomed Anal*. 2010;53:843–51.
 123. Prow TW, Grice JE, Lin LL, Faye R, Butler M, Becker W, et al. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011;63(6):470-91.
 124. Abd E, Benson HAE, Roberts MS, Grice JE. Follicular penetration of caffeine from topically applied nanoemulsion formulations containing penetration enhancers: in vitro human skin studies. *Skin Pharmacol Physiol*. 2018;31:252–60.
 125. Serrano G, Almudéver P, Serrano JM, Milara J, Torrens A, Expósito I, et al. Phosphatidylcholine liposomes as carriers to improve topical ascorbic acid treatment of skin disorders. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2015;8:591–9.
 126. Polonini H, Loures S, Alves MC, Ferreira AO, Brandão MAF, Raposo NRB. Feasibility study evaluating Pentravan® for the intravaginal administration of active pharmaceutical ingredients to reduce pelvic pain related to endometriosis. *Drug Deliv Lett*. 2018;8(3):200–9.
 127. Nestle F, Kaplan D, Barker J. Psoriasis. *N Engl J Med*. 2009;361(5):496–509.
 128. Nickoloff BJ, Wrone-Smith T. Injection of pre-psoriatic skin with CD4+ T cells induces psoriasis. *Am J Pathol*. 1999;155(1):145–58.
 129. Beutner KR, Tyring S. Human papillomavirus and human disease. *Am J Med*. 1997;102(5A):9–15.
 130. 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.
131. 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.
 132. 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.
 133. Wu JK, Siller G, Strutton G. Psoriasis induced by topical imiquimod. *Australas J Dermatol*. 2004;45(1):47–50.
 134. Palamara F, Meindl S, Holcman M, Lühns P, Stingl G, Sibilio M. Identification and characterization of pDC-like cells in normal mouse skin and melanomas treated with imiquimod. *J Immunol*. 2004;173(5):3051–61.
 135. 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.
 136. 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.
 137. 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.
 138. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (Brasil). Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução normativa n. 30, de 2 de fevereiro de 2016. Baixa a diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais em atividades de ensino ou de pesquisa científica - DBCA. Brasília [internet]; 2016 [acesso em 2021 Ago 29]. Disponível em: <https://propp.ufms.br/files/2021/05/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-30-de-02.02.2016-D.O.U.-de-03.02.2016-Secao-I-Pag.-03.pdf>.
 139. Onselen J Van. An overview of psoriasis and the role of emollient therapy. *Br J Community Nurs*. 2013;18(4):174–9.
 140. Seité S, Khemis A, Rougier A, Ortonne JP. Emollient for maintenance therapy after topical corticotherapy in mild psoriasis. *Exp Dermatol*. 2009;18(12):1076–8.
 141. Fahr A. Voigt's pharmaceutical technology. United States: John Wiley & Sons; 2018. 888 p.
 142. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Therapsor [Internet]. 2021 [acesso em 2021 Ago 29]. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/250000415439697/>
 143. Grine L, Dejager L, Libert C, Vandenbroucke RE. Dual inhibition of TNFR1 and IFNAR1 in imiquimod-induced psoriasiform skin inflammation in mice. *J Immunol*. 2015;194(11):5094–102.
 144. Desai PR, Marepally S, Patel AR, Voshavar C, Chaudhuri A, Singh M. Topical delivery of anti-TNF α siRNA and capsaicin via novel lipid-polymer hybrid nanoparticles efficiently inhibits skin inflammation in vivo. *J Control Release*. 2013;170:51–63.
 145. Walunj M, Doppalapudi S, Bulbake U, Khan W. Preparation, characterization, and in vivo evaluation of cyclosporine cationic liposomes for the treatment of

- psoriasis. *J Liposome Res.* 2020;30(1):68-79.
146. Kwiecinski MR, David IMB, Fernandes FS, Correa MDR, 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):641–8.
 147. 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.
 148. 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(supl.B):67–73.
 149. Gordon ML. The role of clobetasol propionate emollient 0.05 % in the treatment of patients with dry, scaly, corticosteroid- responsive dermatoses. *Clin Ther.* 1998;20(1):26–39.
 150. Montero-Vilchez T, Segura-Fernández-Nogueras M-V, Pérez-Rodríguez I, Soler-Gongora M, Martinez-Lopez A, Fernández-González A, et al. Skin barrier function in psoriasis and atopic dermatitis: transepidermal water loss and temperature as useful tools to assess disease severity. *J Clin Med.* 2021;359(10):1–12.
 151. Failace R. Hemograma: manual de interpretação. 5. ed. Porto Alegre: Artmed; 2009. 425 p.
 152. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (Brasil). Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução normativa n. 13, de 20 de setembro de 2013. Baixa as diretrizes da prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. Brasília [internet]; 2013 [acesso em 2021 Ago 29]. Disponível em: <https://portal.anhembri.br/wp-content/uploads/2019/10/Resolu%C3%A7%C3%A3o-Normativa-N%C2%BA-13-de-20-de-setembro-de-2013.pdf>.
 153. 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.
 154. Fraki J, Briggaman R, Lazarus G. Transplantation of psoriatic skin onto nude mice. *J Invest Dermat.* 1983;80:31s-35s.
 155. Wolberink EA, van Erp PE, Teussink MM, van de Kerkhof PC, Gerritsen MJ. Cellular features of psoriatic skin: imaging and quantification using in vivo reflectance confocal microscopy. *Cytometry B Clin Cytom.* 2011;80(3):141-9.
 156. 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;73:343–52.
 157. Hammond JB, Kruger NJ. The bradford method for protein quantitation. *Methods Mol Biol.* 1988;3:25–32.
 158. Bobinski F, Teixeira JM, Sluka KA, Santos ARS. Interleukin-4 mediates the analgesia produced by low-intensity exercise in mice with neuropathic pain. *Pain.* 2018;159(3):437–50.
 159. 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.
 160. Prediger RD, Fernandes MS, Rial D, Wopereis S, Pereira VS, Bosse TS, et al.

- Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. *J Ethnopharmacol.* 2008;120(3):465-73.
161. Oliveira LR, Simionatto M, Cruz BR, Bittencourt JIM, Krum EA, Moss MF, et al. Stability of complete blood count in different storage conditions using the ABX PENTRA 60 analyzer. *Int J Lab Hematol.* 2018;40(3):359–65.

ANEXO A – Parecer Aprovação da Comissão de Ética



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

Palhoça, 18 de novembro de 2019
Registro na CEUA (código): 19.044.4.01.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Maicon R. Kviecinski

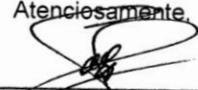
Prezado(a),

Viemos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Estudo comparativo da atividade biológica de loções de uso externo de clobetasol em veículo convencional e lipossomal em um modelo de lesões psoriasiformes induzidas por imiquimode.", registrada com o nº 19.044.4.01.IV, sob a responsabilidade de Maicon R. 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 18 de novembro de 2019.

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

ANEXO B – Produção Científica Publicada Durante o Período do Doutorado

Health Sciences • An. Acad. Bras. Ciênc. 90 (3) • Jul-Sep 2018 • <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170946> [COPY](#)

Dextran Sulphate of Sodium-induced colitis in mice: antihyperalgesic effects of ethanolic extract of *Citrus reticulata* and potential damage to the central nervous system

ALEXANDRE S. HILEL [...] ANNA P. PIOVEZAN

[ABOUT THE AUTHORS](#)

» Abstract

» Text

INTRODUCTION

MATERIALS AND METH...

RESULTS

DISCUSSION

» REFERENCES

» Publication Dates

» History

Abstract

Citrus species are widely related to antihyperalgesic and anti-inflammatory effects. The aim of this study was to investigate if treatment with ethanolic extract from peels of mature *Citrus reticulata* Blanco causes antihyperalgesic effects on the referred mechanical hyperalgesia in a model of dextran sulphate of sodium (DSS)-induced colitis in mice, as well as the possible oxidative damage in different regions of the brain induced by its inflammatory reaction. Antihyperalgesia (30 to 300 mg/kg) was investigated by behavioral response (frequency of response to von Frey filament stimulation) in Swiss mice, while damage to central nervous system was investigated through techniques that evaluated oxidative stress using male black C57 BL6 mice (n=8). Treatment of the animals with the extract (100 mg/kg) from days 3 to 5 after colitis induction reduced referred the mechanical hyperalgesia (32.6 ± 5.1) in relation to the control group (57.4 ± 2.0). Levels of lipid peroxidation or carbonyl proteins were augmented in colitis-induced animals in relation to the disease group. These results indicated an antihyperalgesic effect of the studied extract and a potential impairment of the central nervous system functioning caused by inflammation during colitis, which could be related to mental disorders observed in patients suffering of this pathology.

Key words

Citrus reticulata; medicinal plants; inflammation; oxidative stress; central nervous system

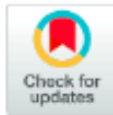
RESEARCH ARTICLE

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. Kwiecinski*

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

* maicon.kwiecinski@gmail.com, maicon.kwiecinski@unisul.br



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](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), 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



CERTIFICADO

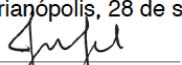
Certificamos que o trabalho

EXTRATO DE DILLENIA INDICA E ÁCIDO BETULÍNICO NO TRATAMENTO DE LESOES PSORIASIFORMES EM CAMUNDONGOS

dos autores: GUSTAVO SILVEIRA DA SILVA; FLÁVIA DE SOUZA FERNANDES; ANA PAULA FERREIRA DA SILVA; MARCOS VINÍCIUS AUGUSTINHO DE LIMA; ALEXANDRE SANTANA HILEL; DANIELE DA SILVA HERMES; MAICON ROBERTO KVIECINSKI, foi apresentado, na modalidade Pôster Impresso, no evento XLVI Congresso Brasileiro de Alergia e Imunologia ocorrido de 25 a 28 de setembro de 2019 no Centro de Convenções de Florianópolis (CentroSul) em Florianópolis/SC.

Florianópolis, 28 de setembro de 2019


Flavio Sano
Presidente ASBAI


Jane da Silva
Presidente do XLVI Congresso Brasileiro de Alergia e Imunologia


Dirceu Solé
Coordenador da Comissão Científica do XLVI Congresso Brasileiro de Alergia e Imunologia



CERTIFICADO

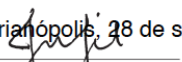
Certificamos que o trabalho

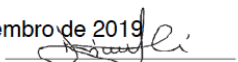
EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM PASTILHAS SUBLINGUAIS DE RESVERATROL SOBRE BIOMARCADORES DE INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES HEMODIALISADOS

dos autores: GUSTAVO SILVEIRA DA SILVA; DANIELE DA SILVA HERMES; FLÁVIA DE SOUZA FERNANDES; ALEXANDRE SANTANA HILEL; ANA PAULA FERREIRA DA SILVA; MARCOS VINÍCIUS AUGUSTINHO DE LIMA; MAICON ROBERTO KVIECINSKI, foi apresentado, na modalidade Pôster Impresso, no evento XLVI Congresso Brasileiro de Alergia e Imunologia ocorrido de 25 a 28 de setembro de 2019 no Centro de Convenções de Florianópolis (CentroSul) em Florianópolis/SC.

Florianópolis, 28 de setembro de 2019


Flavio Sano
Presidente ASBAI


Jane da Silva
Presidente do XLVI Congresso Brasileiro de Alergia e Imunologia


Dirceu Solé
Coordenador da Comissão Científica do XLVI Congresso Brasileiro de Alergia e Imunologia

