

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA

**GUSTAVO MODESTO DE AMORIM**

**ACEMANNAN MODULA A EXPRESSÃO DE CHEMERINA EM FIBROBLASTOS  
DERMAIS HUMANOS**

VITÓRIA  
2016

**GUSTAVO MODESTO DE AMORIM**

**ACEMANNAN MODULA A EXPRESSÃO DE CHEMERINA EM FIBROBLASTOS  
DERMAIS HUMANOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Profa Dra Letícia Batista de Azevedo Rangel - Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

Orientador estrangeiro: Prof. Dr. Terrence J. Piva - Royal Melbourne Institute of Technology (RMIT).

Co-orientador estrangeiro: Prof. Dr. Daniel Man-Yuen Sze - Royal Melbourne Institute of Technology (RMIT).

VITÓRIA

2016

AAM524a Amorim, Gustavo Modesto de  
Acemannan modula a expressão de chemerina de em fibroblastos dermais humanos / Gustavo Modesto de Amorim; orientadora Leticia Batista de Azevedo Rangel; orientador estrangeiro Terence J. Piva; co-orientador estrangeiro Daniel Man-Yuen Sze – RMIT / Australia --- Vitória, 2016.

152 p.

Tese (Doutorado – Doutorado em Biotecnologia --- Universidade Federal do Espírito Santo, 2016.

1. Psoríase. 2. Aloe Vera. 3. Chemerina. 4. Aloeresina. 5. Acemannan. I. Rangel, Leticia Batista Azevedo, orient. II. Piva, Terence J., orient. estrangeiro III. Sze, Daniel Man –Yuen co-orient estrangeiro, RMIT/Australia.

**GUSTAVO MODESTO DE AMORIM**

**ACEMANNAN MODULA A EXPRESSÃO DE CHEMERINA EM FIBROBLASTOS  
DERMAIS HUMANOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Aprovada em \_\_\_/\_\_\_ / 2016.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Prof.(a) Dr.(a):  
Instituição:  
Orientador (a):**

**Prof.Dr.:  
Instituição:  
Co-orientador:**

**Prof.Dr.:  
Instituição:**

VITÓRIA

2016

## AGRADECIMENTOS

À **DEUS** em primeiríssimo lugar....pela Presença, Proteção, Orientação, Luz, Amor...

Aos meus pais amados (Genício e Laiz) pelo seu amor e amizade incondicional

A minha esposa (Rachel Abrahão) amada, companheira, amiga e incentivadora

A minha vó “Dona Mocinha” que brilha nos céus eternamente....

A “Dona Venina”, Dr. Feruk & família pelas orações sinceras, pelo suporte e torcida incondicional para alcançarmos o sucesso

A torcida incondicional de minha amada irmã, Fabíola, que esteve e está sempre próxima mesmo morando distante...

A todos os membros das famílias Modesto e Amorim pelo incentivo e torcida sincera.

To my beloved Ozzy family, “The Melvilles” and “Fullers” who represent an unforgettable and everlasting part of my life ... God bless you my dear mates!

To my ozzy brother, Ben Smith and his beautiful family (Lucrecia, Sebby and Olivia) who lives in my mind, heart and soul.Sincere THANK YOU for the unforgettable time!

To my true blue mate, Craig Troy for sharing a wonderful time with me and Rachel and being “The Bond” of our mates from Beacon Hill High School

To my international supervisor Dr.Terry Piva & his PhD student Xian Yang (RMIT) To Dr. David Pow and the friendly staff of the School of Health and Biomedical Sciences (RMIT).Special thanks to Sean, Robel, Stanley, Julie and Hao Wang

To my co-supervisor and friend Dr.Daniel Sze (RMIT) for helping building up my skills as a researcher and giving a priceless support to me and my wife in Melbourne.

To my lab mates for their help and partnership: Cris Rabaja, Chris Aloe, Chris Halkias, Hellen and Kurt. Special thanks to Dr. Bryce Feltis for his crucial contribution

A minha orientadora, Leticia Batista A. Rangel, por me acolher em seu laboratório e oportunizar aprendizados inesquecíveis sobre a vida e a ciência.

Aos membros atuais do LBCMCH e especialmente aos amigos de “estrada” Klésia, Renata, Isabela, Nayara, Taci, Paulo, Iuri, Sarah, Alice, Diandra e Karina.

Aos meus tios amados (Tio Júlio e Tio Climério) que em 2015 fizeram a transição ao “Encontro” do Pai Celestial

Ao Prof.Henning Ulrich (Inst. Química / USP) e todos os membros do laboratório. Em especial Claudiana Lameu e Juliana Costa pela parceria de trabalho

As instituições oficiais de fomento em pesquisa, FACITEC/ PMV e CAPES / CNPQ/ PDSE por viabilizarem minha formação acadêmica

Aos membros das bancas de qualificação e defesa pelo aceite e contribuições

Ao INIT e aos coordenadores da PPGBiotec / RENORBIO e suas equipes pela disponibilidade em ajudar e orientar com prontidão.

## RESUMO

Psoríase é uma doença inflamatória crônica, autoimune que atinge 2-3% da população mundial. Nas fases iniciais de desencadeamento da doença, estudos mostram que a proteína chemerina exerce um papel fundamental. A Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) propõe o uso tópico com fins terapêuticos do extrato vegetal da *Aloe vera barbadensis* contra a psoríase por suas propriedades imunomoduladoras e anti inflamatórias. Para investigação de tais efeitos, o presente trabalho reproduziu um modelo murino *In Vivo* com fenótipo semelhante à psoríase via aplicação tópica do fármaco imiquimode (IMQ), tratando os animais com creme de Aloe vera à 70% e comparando-os aos controles. Adicionalmente, biopsias da pele dos animais foram testadas quanto à atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) como indicativo de atividade neutrofílica. O modelo *In Vitro*, utilizou linhagens celulares de queratinócitos imortalizados para avaliação do potencial cicatricional do extrato concentrado 200:1 em pó liofilizado (AVFDE) via Ensaio do Arranhão. Fibroblastos primários dermais humanos foram usados para avaliar o potencial modulador sobre a expressão constitutiva da chemerina e de três citocinas pró-inflamatórias em seus sobrenadantes frente ao uso de AVFDE e cinco fitoconstituintes incluindo o polissacarídeo Acemannan (ACM). Para tal, empregou-se o método ELISA e a citometria de fluxo. O fenótipo psoríase humano em camundongos via indução por IMQ foi parcialmente reproduzido. A atividade (MPO) mostrou-se menor em animais tratados topicamente com o creme de Aloe vera à 70%. *In Vitro* observou-se que o AVFDE 50ug/ml reduziu a expressão da quimiocina MCP-1 e à 250ug/ml elevou a expressão de IL-8. ACM 250ug/ml aumentou os níveis de expressão de IL-8 e IL-6. Acemannan (ACM) nas duas concentrações testadas reduziu significativamente a expressão de chemerina. Aloeresina A na concentração 20uM elevou a expressão de IL-6. Nenhum fitoesterol nas concentrações testadas elicitou efeitos sobre os níveis de expressão das citocinas ou da chemerina. Os resultados sugerem que o uso terapêutico com objetivos imunoestimulador e anti inflamatório do extrato do Aloe vera precisa ser melhor avaliado, mas demonstra potencial no tratamento nas fases iniciais da psoríase desde que sejam padronizados os teores mínimos de fitocompostos bioativos como o Acemannan nas apresentações farmacêuticas comercializadas.

**Palavras-chave:** Psoríase, *Aloe vera*, chemerina, aloeresina e acemannan

## ABSTRACT

Psoriasis is an autoimmune, chronic inflammatory disease, affecting 2-3% of the world population. In the early stages of the disease onset, studies have shown chemerin as a triggering protein playing a key role. Brazilian national essential medicines list (RENAME) proposed the topical usage of *Aloe vera barbadensis* extract as a therapeutic approach for psoriasis for its immunomodulatory and anti-inflammatory effects. In order to investigate them, we adopted an *In Vivo* murine model with phenotype similar to psoriasis via topical application of imiquimod (IMQ) and treating animals with 70% Aloe vera cream for further comparison with controls. In addition, animal skin biopsies were tested for the enzymatic activity of the myeloperoxidase (MPO) as an indicator of neutrophil activity. As *In Vitro* model it was used an immortalized keratinocyte cell line to assess the wound healing potential of the Aloe vera freeze dried extract 200:1 (AVFDE) via Scratch Assay. Later, primary human dermal fibroblasts were used to evaluate the potential modulation on constitutive expression of chemerin and three proinflammatory cytokines. Culture supernatants of dermal fibroblasts were assessed against AVFDE and five of its phytoconstituents including the polysaccharide Acemannan (ACM). For this, we used ELISA and flow cytometry. We partially reproduced *In Vivo* human psoriatic phenotype in mice via IMQ induction and the MPO activity was shown to be lower in animals treated topically with 70% Aloe vera cream. It was observed in the *In Vitro* experiments that AVFDE 50ug/ml reduced the expression of MCP-1 chemokine and the concentration of 250ug/ml increased IL-8 expression. ACM 250ug/ml increased the expression levels of IL-8 and IL-6. Acemannan (ACM) at the two tested concentrations significantly reduced chemerin expression. Aloeresin A 20uM increased IL-6 expression. Either tested phytosterol, at any concentration range elicited effects on the expression levels of cytokines or chemerin. The results suggested that the therapeutic usage of Aloe vera extract as an immunomodulatory and / or anti inflammatory agent must be further evaluated. Although the extract demonstrated a potential benefit in the treatment of early stages of psoriasis it is essential that commercial plant extracts are standardized with a minimum content of bioactive phytochemicals as Acemannan within the marketed pharmaceutical formulations as stated by related regulatory organisms.

**Keywords:** Psoriasis, Aloe vera, chemerin, aloeresin and acemannan

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Comparação histológica entre uma pele humana normal e uma psoríase apresentando alguns dos “hallmarks” histológicos da psoríase.....	18
Figura 2 -	Ativação de células T CD4 + naíve por células apresentadoras de antígenos (APCs).....	21
Figura 3 -	Componentes estruturais na polpa de Aloe vera.....	34
Figura 4 -	Parênquima de reserva e acemannan.....	36
Figura 5 -	Processamento proteolítico da chemerina.....	44
Figura 6 -	Uso de manta térmica durante a sedação do animal.....	57
Figura 7 -	Efeito da tricotomia seguida do uso de depilatório.....	57
Figura 8 -	Veia safena lateral após uso de depilatório.....	58
Figura 9 -	Preparo de materiais utilizados na flebotomia.....	58
Figura 10 -	Uso da vaselina pastosa na flebotomia.....	58
Figura 11 -	Ponto de flebotomia na veia safena lateral.....	58
Figura 12 -	Esquema da feitura do “arranhão” no Scratch assay.....	61
Figura 13 -	Estrutura química do WST-8 e os sais WST- 8 e formazan.....	63
Figura 14 -	Desenho da placa de 96 poços para realização do ensaio de viabilidade celular CCK-8.....	64
Figura 15 -	Esquematização do protocolo de tratamentos adotados para os fibroblastos dérmicos em placas de 6 poços.....	65
Figura 16 -	Desenho da placa do ensaio de ELISA.....	67
Figura 17 -	Leitura do ensaio de ELISA.....	68
Figura 18 -	Histogramas da citometria de fluxo.....	70
Figura 19 -	Aspecto da pele do dorso dos animais após o 5º dia (120horas) de tratamento tópico com Imiquimode.....	73
Figura 20 -	Semelhança da hiperqueratose humana em psoríase palmar e a hiperqueratose sucitada no modelo murino IMQ induzida.....	76
Figura 21 -	- Gráfico do nível de atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) medida na pele do dorso dos animais.....	78
Figura 22 -	Ensaio do arranhão ou Scratch Assay no momento “Zero”.....	81
Figura 23 -	Ensaio do arranhão ou Scratch Assay no momento “22º. hora”.....	82
Figura 24 -	Gráfico do comportamento das células queratinocíticas quanto a capacidade de cicatrização.....	83
Figura 25 -	Nível percentual da expressão de IL-6 em células hDF após tratamento com Aloe vera extrato concentrado 200:1 em pó liofilizado (AVFDE).....	84
Figura 26 -	Nível percentual da expressão de IL-8 em células hDF após tratamento com Aloe vera extrato concentrado 200:1 em pó liofilizado (AVFDE).....	85
Figura 27 -	Nível percentual da expressão de MCP-1 / CCL2 em células hDF após tratamento com AVFDE.....	87
Figura 28 -	Estruturas químicas dos principais fitoesteróis em plantas.....	91
Figura 29 -	Estrutura química do acemannan.....	93
Figura 30 -	Estruturas química dos compostos Aloesina ou Aloeresina B.....	94
Figura 31 -	Estrutura química do derivado de giberelina: GA-13315.....	96
Figura 32 -	Adesão e morfologia celular anormais das células hDF após 24hr de tratamento com diferentes concentrações de Giberelina.....	98
Figura 33 -	Adesão e morfologia celular normais das células hDF após 24hr de tratamento com diferentes concentrações de Aloeresina A e B.....	99



Figura 34 - Adesão e morfologia celular normais das células hDF após 24hr de tratamento com diferentes concentrações de Betasitosterol e Acemannan.....	99
Figura 35 - Adesão e morfologia celular normais das células hDF após 24hr de tratamento com diferentes concentrações de AVFDE.....	100
Figura 36 - Gráfico do ensaio de viabilidade celular das hDf frente ao tratamento com quatro concentrações de giberelina.....	101
Figura 37 - Nível percentual da expressão de IL-6 em células hDF após tratamento com Aloeresina A (ALA).....	102
Figura 38 - Nível percentual da expressão de IL-8 e MCP-1 em células hDF após tratamento com Aloeresina A (ALA).....	103
Figura 39 - Nível percentual da expressão de IL-6 e IL-8 em células hDF após tratamento com Aloeresina B (ALB).....	104
Figura 40 - Nível percentual da expressão de MCP-1 em células hDF após tratamento com Aloeresina B (ALB).....	105
Figura 41 - Nível percentual da expressão de IL-6, IL-8 e MCP-1 em células hDF após tratamento com Giberelina (GB).....	106
Figura 42 - Nível percentual da expressão de IL-6, IL-8 e MCP-1 em células hDF após tratamento com Betasitosterol (BST).....	107
Figura 43 - Nível percentual da expressão de IL-6 em células hDF após tratamento com Acemannan (ACM).....	109
Figura 44 - Nível percentual da expressão de IL-8 em células hDF após tratamento com Acemannan (ACM).....	110
Figura 45 - Nível percentual da expressão de MCP-1 em células hDF após tratamento com Acemannan (ACM).....	112
Figura 46 - Nível percentual da expressão da proteína chemerina em células hDF após tratamento com Acemannan (ACM).....	116
Figura 47 - Nível percentual da expressão da proteína chemerina em células hDF após tratamento com Betasitosterol, Giberelina e Aloeresinas A e B.....	118
Figura 48 - Nível percentual da expressão da proteína chemerina em células hDF após tratamento com Aloe vera extrato concentrado 200:1 em pó liofilizado (AVFDE) em diferentes concentrações.....	118
Figura 49 - Nível percentual da expressão da proteína chemerina em células hDF 24 horas após o tratamento com Calcitriol 1uM e ATRA 5uM.....	119
Figura 50 - Nível percentual da expressão da citocina IL-8 em células hDF 24 horas após o tratamento com Calcitriol 1uM e ATRA 5uM.....	120
Figura 51 - Nível de Expressão da proteína chemerina em células (hDF) com tempos de incubação de 48hr e 72hr e tratamento com Calcitriol 1uM.....	121

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Comparação de eficácia entre terapias anti psoríasicas.....	31
Tabela 2 -	Principais efeitos biológicos dos componentes ativos constituintes dos extratos mucilaginosos e foliares da espécie aloe vera.....	37
Tabela 3 -	Distribuição da chemerina em diferentes tecidos e suas concentrações aproximadas segundos os estudos referenciados na tabela.....	41
Tabela 4 -	Aspectos gerais dos receptores de chemerina.....	46
Tabela 5 -	Descrição dos compostos químicos usados nos experimentos <i>In Vitro</i> para expressão da chemerina.....	54
Tabela 6 -	Descrição dos equipamentos usados nos experimentos <i>In Vitro</i> .....	57
Tabela 7 -	Desenho experimental do estudo <i>In Vivo</i> .....	59
Tabela 8 -	Especificação dos anticorpos utilizados para detecção de citocinas e quimiocinas inflamatórias por citometria de fluxo.....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ab(s) Anticorpo(s)  
ACM Acemannan  
Ag(s) Antígeno(s)  
ALA Aloeresin A  
ALB Aloeresin B ou Aloesin  
ALR “Absent-in-melanoma (AIM)-like receptor” ou Receptor do tipo ausente em melanoma  
ANOVA Análise de variância  
APC(s) Células Apresentadora de Antígeno (s)  
AR Artrite Reumatoide  
ATRA “All Trans Retinoic Acid” ou ácido retinóico  
AVFDE “Aloe vera freeze dried extract” ou Extrato seco liofilizado de aloe vera  
BRM(s) Modificadores de Resposta Biológica  
BST Betasitosterol  
CARD Domínio de Recrutamento da Caspase  
CCK-8 “Cell Counting Kit-8” ou Kit 8 de contagem celular  
CD Célula Dendrítica  
ChemR23 Receptor de Chemerina 23  
CID Código Internacional de Doenças  
CMKLR-1 “Chemokine like Receptor 1” ou receptor do tipo quimiocina  
CoA ficha de Controle de Análise ou controle de qualidade de um produto  
CTLs “C-type lectin-like domains” ou domínio tipo C de Lectina  
DAMP “Damage-associated molecular pattern” ou padrão molecular associado ao dano  
DC Doença de Chron ou “Crohn Disease”  
DLQI “Dermatology Life, Quality Index” ou Índice de Qualidade de Vida em Dermatologia  
DMSO Dimetilsulfóxido  
ECC “European Economic Community” ou Comunidade Econômica Européia  
ECM Matriz Extracelular  
ELISA: Ensaio de Imunoabsorção Ligado à Enzima  
EtOH Etanol 99% absoluto  
FACS “Fluorescence-activated cell sorting” ou selecionador de célula ativado por Fluorescência  
FvW Fator von Willebrand  
GB Giberelina  
GAPDH “Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase” ou Hidrogenase Gliceraldeído 3 Fosfato  
G-CSF Fator Estimulante de Colônias de Granulócito  
GPCR G-“Protein G Coupled Receptor” ou Receptor Acoplado a Proteína G  
GWAS “Genomic Wide Association Study” ou Estudo Associado a Abrangência Genômica  
HaCat “Human adult low Calcium, high temperature, skin keratinocytes”  
HDMEC Células endoteliais dérmicas microvasculares humanas  
HRP “Horseradish peroxidase” ou Peroxidase de Rábano de Cavalo  
HTAB brometo de hexadecil trimetil amônio  
H&E Hematoxilina e Eosina  
IBD Doença do Intestino Irritado  
IFN Interferon  
Ig(s) Immunoglobulina(s)  
IL Interleucina  
IMQ Imiquimode, fármaco imunomodulador, ligante de TLR 7 e 8.  
ITAM “Motivo de Ativação baseado no Imunoreceptor de Tirosina  
KC Queratinócito  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Fosfato dibásico de Potássio  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Fosfato monobásico de Potássio  
KO “Knockout” ou silenciado / ausente  
LABIOM Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares  
LL37 37 Resíduo carboxi-terminal do peptídeo da catelicidina humana  
MCP-1/CCL2 Proteína- 1 Quimioatratadora de Monócitos  
mDC Células Dendríticas Mielóides  
MHC Complexo principal de histocompatibilidade  
MIG / CXCL9 Monocina Induzida por Gama Interferon  
MIP-1 $\alpha$  / CCL3 Proteína 1 Alfa Inflamatória Macrofágica

MIP-1 $\beta$  / CCL4 Proteína 1 Beta Inflamatória Macrofágica  
MMP-9 Metaloproteinase 9 de Matriz  
MOP Mieloperoxidase  
MR Receptor de Manose  
 $\mu$ g Micrograma  
 $\mu$ L Microlitro  
 $\mu$ M Micromolar  
NF- $\kappa$ B (factor nuclear kappa B)  
NKT células T Assassinas naturais  
NHDF Fibroblastos Dermais Humanos Normais  
NRL Receptor tipo ligante de Nucleotídeo e de Domínio de Oligomerização  
PAMP(s) Padrão Molecular Associado aos Patógenos  
PASI Índice de Severidade e Área afetada da Psoríase  
PBMC(s) Células Mononucleares do Sangue Periférico  
PBS Tampão Fosfato Salina  
pDC Células Dendríticas Plasmacitóide  
PSO Psoríase  
PRR(s) Receptor de Reconhecimento Padrão  
Psa Artrite Psoriática ou psorásica  
RARRES Receptor de ácido Retinóico e de Proteína 1 Respondente  
RANTES / CCL5 Célula T normal Expressa e Secretada, Regulada na Ação  
RENAME Relação Nacional de Medicamentos Essenciais  
rh FGF Fator de Crescimento de Fibroblastos recombinante humano  
RLR Receptor do tipo Gene -1 induzível pelo ácido Retinóico  
SALT Tecido Linfóide Associado à pele  
SDF-1 / CXCL12 Fator 1 Estromal derivado da célula  
SFB Soro Fetal Bovino  
SIS Sistema Imune Epitelial  
SESA Secretaria de Estado da Saúde do Espírito Santo  
SUS Sistema Único de Saúde  
TCR(s) Receptor(es) de Célula T  
TGF Fator de Transformação do crescimento  
Th Células T auxiliaadoras  
TIG-2 Proteína do Gene 2 Indutor do Tazaroteno  
TNF Fator de Necrose Tumoral  
TLR Receptores do tipo Toll  
Treg(s) Células T Reguladores  
VD3 Calcitriol or active 1,25-dihydroxyvitamin D3 (1,25(OH)<sub>2</sub>VD3)  
WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt)  
 $\gamma\delta$  T cells "gamma, delta chains of T cell receptors" ou receptor de cadeia gama, delta de células T

## SUMÁRIO

1	CONTEXTUALIZAÇÃO .....	11
1.1	<b>Psoríase .....</b>	11
1.1.1	<b>Aspectos epidemiológicos, etiológicos e genéticos .....</b>	15
1.1.2	<b>Psoríase: Fenótipos clínicos, sinais histopatológicos diferenciais e grau de severidade .....</b>	16
1.1.3	<b>Imunopatogênese da psoríase.....</b>	18
a)	sensibilização ou inicialização.....	19
b)	progressão ou amplificação.....	20
c)	manutenção .....	22
d)	remissão .....	22
1.1.4	<b>Tipos de tratamentos.....</b>	23
1.1.4.1	<b>Tratamentos tópicos.....</b>	24
a)	corticosteróides.....	24
b)	análogos da Vitamina D3 (Vit.D3).....	24
c)	derivados do antraceno.....	24
d)	derivados macrolídeos imunossupressores.....	24
1.1.4.1.1	Novas abordagens terapêuticas de uso tópico.....	25
1.1.4.2	<b>Tratamentos sistêmicos.....</b>	26
a)	derivados do ácido retinóico (RA).....	27
b)	metotrexate (MTX).....	27
c)	ciclosporinas ou ciclosporina A (CsA).....	27
1.1.4.3	<b>Fototerapia.....</b>	28
1.1.4.4	<b>Agentes Biológicos.....</b>	29
1.1.5	<b>Alternativas terapêuticas em medicina complementar.....</b>	30
1.2	<b>Aloe vera.....</b>	32
1.2.1	<b>Aloe vera no SUS: a fitoterapia como medicina complementar.....</b>	32
1.2.2	<b>Etnobotânica e descrição geral da Aloe vera.....</b>	33
1.2.3	<b>Fitoquímica: principais constituintes da espécie Aloe .....</b>	35
1.2.4	<b>Bioatividade e aplicações clínicas na psoríase .....</b>	37
1.3	<b>Sistema chemerina e seus receptores.....</b>	40
1.3.1	<b>Nomenclatura, conceito e distribuição .....</b>	40
1.3.2	<b>Isoformas.....</b>	42
1.3.3	<b>Receptores.....</b>	42
1.3.4	<b>Aspectos pleiotrópicos na saúde e na doença.....</b>	44
a)	ação antiinflamatória.....	47
b)	ação pró-inflamatória.....	47
1.3.4.1	<b>Chemerina e a psoríase.....</b>	47
2	OBJETIVOS.....	48
2.1	<b>Gerais.....</b>	50
2.2	<b>Específicos.....</b>	50
2.2.1	<b>Modelo In Vivo murino Imiquimode – induzido mimético à psoríase humana.....</b>	50
2.2.2	<b>Modelo In Vitro de linhagens celulares humanas de queratinócito imortalizado (HaCat) e de fibroblastos dermais primários com e sem tratamento do extrato concentrado e dos fitoconstituintes de Aloe vera.....</b>	50
3	MATERIAIS E MÉTODO.....	52
3.1	<b>Materiais.....</b>	52
3.1.1	<b>Manejo de animais.....</b>	52

3.1.2	<b>Reagentes e substratos.....</b>	52
3.1.3	<b>Linhagens celulares primárias, imortalizadas, meios de cultura e suplementos.....</b>	55
3.1.3.1	<i>Linhagem celulares primárias.....</i>	55
3.1.3.2	<i>Linhagem celulares imortalizadas.....</i>	55
3.1.4	<b>Equipamentos e softwares.....</b>	56
3.2	<b>Métodos.....</b>	56
3.2.1	<b>Modelo experimental de indução da psoríase In Vivo.....</b>	56
3.2.1.1	<i>Tricotomia e depilação dos animais.....</i>	56
3.2.1.2	<i>Coleta de sangue.....</i>	57
3.2.1.3	<i>Indução do quadro fenotípico semelhante à psoríase.....</i>	58
3.2.1.4	<i>Eutanásia e coleta de material para análise histopatológica e demais análises.....</i>	54
3.2.2	<b>Ensaio da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO).....</b>	60
a)	<i>coleta das amostras.....</i>	60
b)	<i>Preparação das amostras de tecidos animais.....</i>	60
c)	<i>análise da atividade da MPO.....</i>	61
3.2.3	<b>Modelo Experimental In Vitro.....</b>	61
3.2.3.1	<i>Scratch Assay ou ensaio do arranhão.....</i>	61
3.2.3.2	<i>Ensaio de Viabilidade celular.....</i>	63
3.2.3.3	<i>Estudo de expressão da proteína chemerina.....</i>	64
3.2.3.4	<i>Ensaio de imunoadsorção ligado à enzima (ELISA) em sobrenadante celular.....</i>	66
3.2.3.5	<i>Deteção de quimiocinas e citocinas.....</i>	68
3.2.3.5.1	<i>Citometria de Fluxo.....</i>	68
3.2.3.6	<i>Repetição do Ensaio de imunoadsorção ligado à enzima (ELISA) em sobrenadante celular.....</i>	71
3.2.4	<b>Análise Estatística.....</b>	72
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	73
4.1	<b>Modelo in vivo.....</b>	73
4.1.1	<b>Aspectos macroscópicos da pele do dorso do modelo murino semelhante ao fenótipo psorásico em humanos.....</b>	73
4.1.2	<b>A atividade bioenzimática de neutrófilos medida em pele imiquimode (IMQ) induzida do dorso do modelo murino com fenótipo semelhante à psoríase.....</b>	76
4.2	<b>Modelo in vitro.....</b>	78
4.2.1	<b>Avaliação da capacidade cicatricional em cultura de células humanas queratinocíticas imortalizadas (linhagens HaCat) após tratamento com Aloe vera extrato seco pó concentrado liofilizado 200:1 em diferentes concentrações.....</b>	79
4.2.2	<b>Expressão do perfil de citocinas próinflamatórias em sobrenadante de cultura celular primária de hDF após tratamento com Aloe vera extrato seco pó concentrado liofilizado 200:1 (AVFDE) em diferentes concentrações.....</b>	84
4.2.3	<b>Ensaio de viabilidade celular frente ao tratamento com giberelina em cultura de fibroblastos primários dermais humanos (hDF).....</b>	90
4.2.4	<b>Expressão do perfil de citocinas próinflamatórias em sobrenadante de cultura celular primária de hDF após tratamento com Aloeresina A (ALA).....</b>	101
4.2.5	<b>Expressão do perfil de citocinas próinflamatórias em sobrenadante de cultura celular primária de hDF após tratamento com Aloeresina A (ALB).....</b>	104

4.2.6	<b>Expressão do perfil de citocinas próinflamatórias em sobrenadante de cultura celular primária de hDF após tratamento com Giberelina (GB).....</b>	106
4.2.7	<b>Expressão do perfil de citocinas próinflamatórias em sobrenadante de cultura celular primária de hDF após tratamento com Betasitosterol (BST).....</b>	107
4.2.8	<b>Expressão do perfil de citocinas próinflamatórias em sobrenadante de cultura celular primária de hDF após tratamento com diferentes concentrações de Acemannan (ACM).....</b>	108
4.2.9	<b>Expressão da proteína chemerina em sobrenadante de cultura celular primária de hDF após tratamento com diferentes concentrações de Acemannan (ACM).....</b>	116
4.2.10	<b>Expressão da proteína chemerina em sobrenadante de cultura celular primária de hDF 24 hr após tratamento com Calcitriol (Vit.D3) 1uM e ácido all trans-retinóico (ATRA) 5uM.....</b>	119
4.2.11	<b>Expressão do perfil de citocinas próinflamatórias do tipo IL-8 em sobrenadante de cultura celular primária de hDF 24 hr após tratamento com com Calcitriol (Vit.D3) 1uM e ácido all trans-retinóico (ATRA) 5uM.....</b>	120
4.2.12	<b>Expressão da proteína chemerina em sobrenadante de cultura celular primária de hDF após tratamento com Calcitriol (Vit.D3) 1uM por diferentes tempos de incubação.....</b>	120
5	CONCLUSÃO.....	123
6	PERSPECTIVAS.....	125
7	REFERÊNCIAS.....	127
	APÊNDICE – Aspectos terapêuticos dos agentes biológicos.....	161
	ANEXO I – Ficha técnicas do Extrato concentrado 200:1 do Aloe vera.....	162
	ANEXO II – CEUA.....	163

## 1 CONTEXTUALIZAÇÃO

### 1.1 Psoríase

A Psoríase é uma doença inflamatória crônica da pele e articulações, de evolução sistêmica, não contagiosa, imunomediada por linfócitos T, de base genética, com grande heterogeneidade de expressão clínica, podendo ocorrer em qualquer idade, atingindo igualmente homens e mulheres, com picos de incidência na segunda e na quinta décadas de vida (CONSENSO, 2009-2012).

#### **1.1.1 Psoríase – aspectos epidemiológicos, etiológicos e genéticos**

No Brasil existem cerca de 5 milhões (1,3 – 2%) de indivíduos que apresentam algum grau de psoríase (SANTOS et. al., 2009; PORTO FERREIRA et. al., 2007; RAPOSO et. al., 2011). No mundo, estudos descrevem 125 milhões de pacientes psoríasicos, na maioria caucasianos de diferentes faixas etárias, espalhados por todos os continentes. (GELFAND et al., 2005; CIMMINO, 2007; MAZZATENTA et. al., 2009; COLOMBO et al., 2008; PARISI et al., 2013).

Embora a psoríase raramente tenha consequências letais, muito frequentemente está associada a significativos quadros de morbidade cardíaca (hipertensão arterial  $\pm 28,2\%$ ), metabólica (obesidade  $\pm 30\%$  e dislipidemias  $\pm 12,5\%$ ), neuro-psiquiátrica ( $\pm 30\%$ ), articular (artrite psoríasica  $\pm 20\%$ ), neuroendócrina (diabete melitus tipo 2 em 10,5% dos casos) além de ser considerada uma doença de impacto psico-emocional e físico-funcional tão séria quanto as doenças cardiovasculares, cânceres e doença de Chron. (GLADMAN et al., 2005; NEIMANN; PORTER; GELFAND, 2006; R.K.H. MAK et al., 2009; GOOTLIEB; DANN, 2009; AUGUSTIN et al., 2010; DUARTE et al., 2010; KUPETSKY et al., 2013; GROZDEV et al., 2014).

A causa fundamental da psoríase ainda é desconhecida, no entanto um grande volume de hipóteses concorrentes concordam para os aspectos multifatoriais desencadeadores da doença em indivíduos geneticamente predispostos. (GUDJONSSON; ELDER, 2007; FENG et al., 2009).



Múltiplas anormalidades na cinética, histomorfologia e bioquímica celular reafirmam que a produção de múltiplos mecanismos são elicitados, incluindo: os **genéticos, imunológicos, infecciosos** (WANG et al., 2006; NITSCH-SCHMITZ et al., 2007; MCFADDEN et al., 2009; BERTH-JONES, 2013), **metabólicos** (YOSIPOVITCH et al., 2007; TAKAHASHI et al., 2008; ARMSTRONG et al., 2012; OH YJ, et al., 2014; JACOBI et al., 2015; COBAN et al., 2016), **medicamentosos** (TSANKOV et al., 2000; LITT, 2006; DO; GRACE; DO; JAMES, 2010; CEOVIC et al., 2013) **endócrinos, ambientais, físicos** (RODRIGUES; TEIXEIRA, 2009; REN RZ et al., 2012; WENG et al., 2012; ARIAS-SANTIAGO et al., 2013; AYALA-FONTÁNEZ et al., 2016), **psicogênicos** (WEIGL et al., 2000; KIM et al., 2007) e **epigenéticos**. (BOWCOCK et al., 2005; GUDJOSSON et al., 2012; TROWBRIDGE et al., 2014, BOEHNCKE, 2015; O'RIELLY, RAHMAN, 2015).

O estresse psicológico em particular, agrava as doenças inflamatórias da pele tais como dermatite atópica, psoríase e dermatite de contacto, alterando os componentes celulares do sistema imunitário. Os anexos da pele funcionam como alvo e fonte importantes do eixo periférico para liberação de hormônios corticotropina e proopiomelanocortina (CRH-POMC axis) componente central do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, responsável pela coordenação das respostas de estresse sistêmico, bem como a modulação da resposta inflamatória.(KIM JE et., 2007). Estudos mostram que o CRH cutâneo e seu receptor CRH-R1 agem como reguladores da homeostase local na pele e que expressão do CRH na psoríase está significativamente aumentada. (SLOMINSKI et al., 1999). Atualmente, os efeitos pró-inflamatórios de CRH na pele não são claros, mas CRH pode estimular a produção de IL-6 ou IL-11 nos queratinócitos durante o estresse cutâneo, por conseguinte, é possível que CRH atue sobre os queratinócitos para agravar ainda mais psoríase. (AYALA-FONTÁNEZ et al., 2016).

Weigl (2000) em estudo longitudinal com duração de até 3 anos concluiu que o cortisol pode estar envolvido na fase de erupção clínica, e epinefrina na fase de remissão.

Psoríase abriga um componente hereditário significativo que está bem estabelecido e uma história familiar onde dois pais afetados prenunciam uma probabilidade superior a 40% de desenvolver a doença nos descendentes. Este risco diminui para

14%, se somente um dos pais é afetado e 6%, se um irmão é afetado, em comparação com 2% quando não há histórico familiar. (ANDRESSEN; HENSELER, 1982).

O componente genético envolvido na etiologia da psoríase pode ser comprovado por estudos sobre a incidência familiar, incidência de casos na prole, grau de concordância entre gêmeos e identidade de antígenos leucocitário humano (HLA). Múltiplos alelos HLAs têm sido associados à psoríase, especialmente: HLA-C\*06, HLA-B13, HLA-B17, HLA-B37, HLA-DR7, HLA-B46, HLA-B57, HLA-Cw1 e HLA-DQ9. Estudos mais recentes revelam loci de suscetibilidade adicionais, não relacionados ao Complexo principal de histocompatibilidade (MHC), localizados nos cromossomos **6p** (TRAF3IP2), **17q** (RUNX1, RAPTOR , SLC9A3R1 , NAT9, TBCD), **4q** (IL-15, Loricrin, filaggrin, S100 genes, LCE) e **1q** (LCE3B/3C/3D) (NESTLE et al, 2009; NESTLE, 2008). Alguns dos principais loci de susceptibilidade, não relacionados ao MHC estão intrinsecamente ligados à codificação de proteínas com função na barreira epitelial, imunidade inata e /ou adquirida, ligadas às vias patogênicas da psoríase. (STRANGE et al., 2010).

Na espécie humana, apesar da diversidade dos possíveis *loci* de suscetibilidade para psoríase (*PSORS* 1-10), o *PSORS*1 associado ao sistema HLA, referente ao alelo HLA-C\*0602 é de grande destaque e forte associação à doença em diferentes grupos étnicos, chegando a 70% nos pacientes com psoríase iniciada antes dos 40 anos (ELDER et al., 2001; GUDJOSSON et al., 2003; NESTLE et al., 2009; ROMITI et al., 2009). Ainda assim, somente 10% destes indivíduos portadores dos alelos HLA-C\*06 irão efetivamente manifestar sinais característicos da doença. (TREMBATH RICHARD et al., 1997).

### **1.1.2 Psoríase – fenótipos clínicos, sinais histopatológicos diferenciais e grau de severidade**

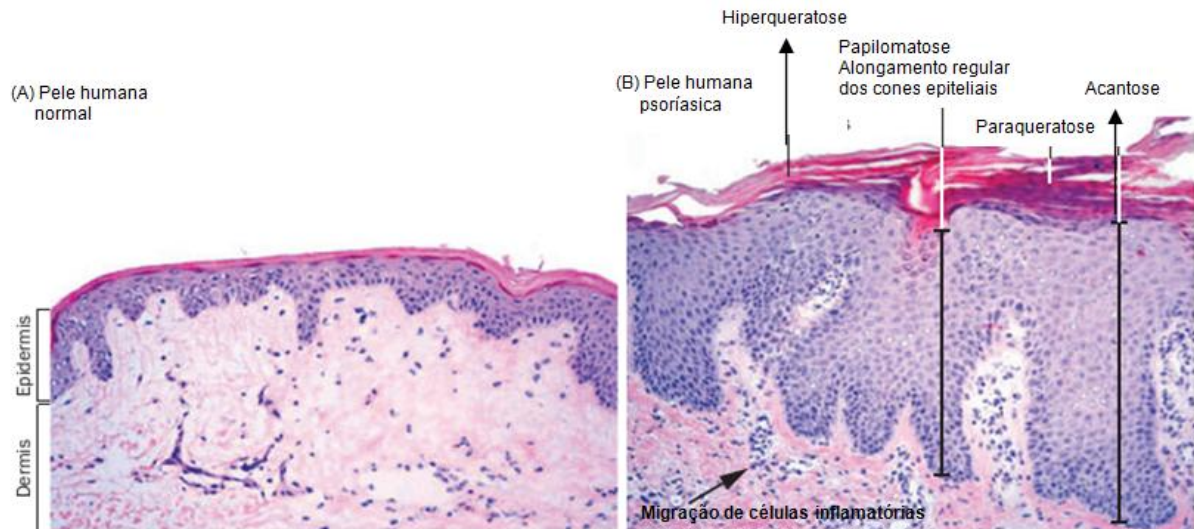
Um paciente pode ser fenotipicamente classificado de acordo com a sua condição sorológica, ou seja, em relação ao seu sistema HLA que divide a doença em Tipo I (HLA-C\*0602 positivo, ± 65% dos casos, com faixa etária < 30 anos) e Tipo II (HLA-

C\*0602 negativo,  $\pm$  35% dos casos, com faixa etária > 40anos, sem histórico familiar). No entanto, a classificação mais comum é feita de acordo com a aparência clínica, espessura, formato e distribuição das placas. (PERERA, 2012). Segundo Zangeneh e Shooshtary (2013), a psoríase pode manifestar-se clinicamente das seguintes formas:

- *Psoriasis vulgaris* (tipo mais comum em placas eritromatosas);
- *Psoríase guttata* (pintas pequenas tipo gota);
- *Psoríase invertida* (ocorre nas dobras dérmicas ou áreas intertriginosas);
- *Psoríase pustulosa* (pequenas bolhas pustulentas) ou palmoplantar quando há acometimento das palmas e das solas dos pés.

No presente estudo serão abordados aspectos mais relacionados à psoríase vulgar (PV) na sua forma de manifestação branda e moderada que concentra 65% dos casos. Já a psoríase moderada e severa equivalem a 25% e 8% dos casos respectivamente. (VORHEES, 2009).

A Psoriasis vulgar – psoríase crônica estacionária ou psoríase em placas – é o tipo mais comum da doença que responde por aprox. 90% dos casos. Quando comparado histologicamente com uma pele normal, a pele psorásica apresenta diferenças visíveis. São elas: a **hiperqueratose** (aumento da espessura da camada córnea), **paraqueratose** (queratinização anormal e incompleta do epitélio escamoso com persistência dos núcleos celulares nas células superficiais), **acantose** (aumento da espessura da camada espinhosa), **papilomatose** (alongamento regular dos cones epiteliais, com afinamento na porção suprapapilar), **hipogranulose** (perda da camada granular), **espongiose** (vesícula intra epidérmica devido a nfiltrado edematoso entre queratinócitos) os **sinais de Auspitz** (pequenos pontos de sangramento quando a escamação é removida) e um elevado infiltrado de células inflamatórias na derme papilar. (Figura 1).



**Figura 1:** Comparação histológica entre uma pele humana normal e uma psorásica apresentando alguns dos “hallmarks” histológicos descritos no texto.  
Fonte: Wagner et al. 2010

Tradicionalmente, a severidade da psoríase é mensurada usando vários índices para os sintomas. Os métodos usados podem ser do tipo **PASI** (Psoriasis Area and Severity Index – mais usado) e os índices sintomáticos; **BSA** (Body surface Area); **PGA** (Physician’s Global Assessment) ou **QOL** (health-related quality of life) (CONSENSO, 2012).

O índice de área e severidade da psoríase (PASI) é um dos mais utilizados para avaliar a gravidade da doença. Este pode variar de 0 a 72 sendo que acima de 18 significa doença grave. Já a referência PASI 75, comumente vista nos artigos, significa uma redução em 75% do índice pré-tratamento e é utilizada para avaliar o sucesso terapêutico. Considera-se recidivação da doença quando existe aumento de 50% nesse índice após um período de melhora (PASI 50). Entretanto, o PASI não considera o impacto da doença sobre a qualidade de vida (QV) do paciente o que na prática clínica diária é importante ao se escolher o tratamento mais eficaz evitando assim expectativas frustradas por parte de médicos e pacientes. (ARRUDA et al., 2004; VAN DE KERKHOFF et al., 2015).

### 1.1.3 Psoríase – imunopatogênese

Compreender profundamente a imunopatogênese da psoríase traz consigo a possibilidade de uma conduta terapêutica mais adequada ao estágio imunológico,

celular e molecular, e ao perfil genético individual do paciente a ser tratado. (WARREN; GRIFFITHS, 2009; BLUMENBERG, 2013, VILLANOVA et al., 2013; RYAN et al., 2014).

Grupos independentes de pesquisadores discorrem sobre a psoríase dividindo-a em 3 à 4 diferentes estágios evolutivos e correlacionando-os aos seus tipos celulares preponderantes. Estas etapas ocorrem de forma dinâmica nos tecidos, podendo ser divididas, para fins didáticos, em: **sensibilização, progressão, manutenção, e remissão** da psoríase (SABAT et al., 2007; CHRISTOPHER GRIFFITHS; BARKER; JONATHAN, 2007; NESTLE et al., 2009; PERERA et al., 2012; CHRISTOPHERS; METZLER e RÖCKEN, 2014):

a) sensibilização ou inicialização

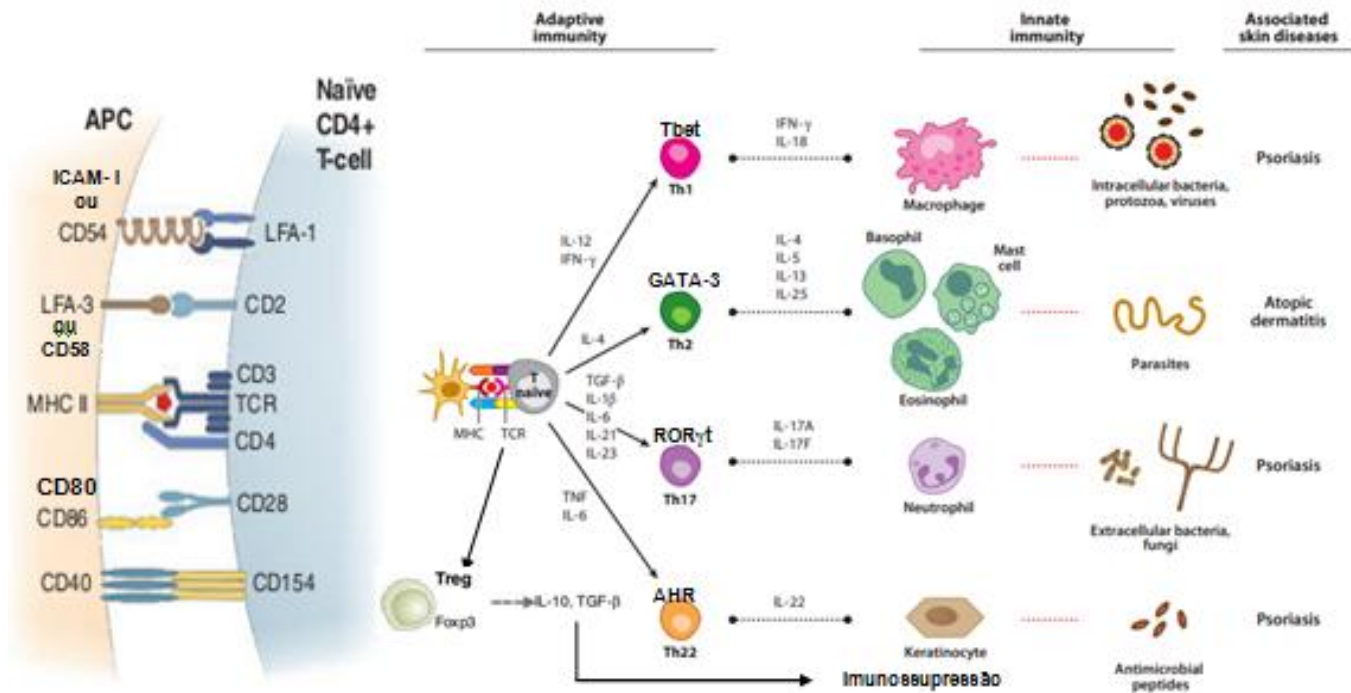
Nesta etapa, os queratinócitos, como sentinelas de papel central para manutenção da homeostase da pele, reconhecem através de receptores de reconhecimento padrão (PRRs), para agentes tóxicos, perigosos para o organismo tais como os padrões moleculares associada à patógenos (PAMPs) e os padrões associados ao perigo ou alarminas (DAMPs). (NESTLE; DI MEGLIO et al., 2009; KONING et al., 2010). De acordo com o tipo de sinal antigênico primário desencadeado pelo agente tóxico, receptores especializados nestes padrões moleculares irão rapidamente “perceber” e ativar respostas imunes específicas determinadas por receptores extracelulares ligados à membrana (tipo Toll ou TLRs; e Lectina tipo C ou CLR) e / ou receptores intracelulares citoplasmáticos ou ligados a organelas subcelulares (NLR; ALR; RLR; TLRs 3,7,8,9). (PALM; MEDZHITOV, 2009; JI-QING CHEN et al., 2016; YOUNG KEUN et al., 2016) A ativação das vias desencadeadoras da resposta imune inata dá-se pelos inflamassomas ativadores das enzimas da família das caspases inflamatórias (classicamente -1 e -5) que clivam os precursores inativos da família IL-1 (pró IL-1 $\beta$  e pró IL-18) transformando-os em suas formas maduras (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-33) desencadeando os passos iniciais da inflamação.(MARTINON et al., 2009).

Em indivíduos geneticamente suscetíveis, os PAMPs e DAMPS “percebidos” pelos receptores queratinocíticos extra e intracelulares suscitam respostas inflamatórias iniciais que conduzem à psoríase (DOSTERT et al., 2008; JESUS et al., 2015).

A ativação dos inflamassomas inicia o recrutamento de células do sistema fagocitário epidérmico (monócitos, macrófagos, células dendríticas dermais e células de Langerhans) mediado por citocinas típicas da resposta imune do tipo Th-1 e a produção de interferons (IFNs). Tais citocinas, induzirão células imunocompetentes residentes da pele a recrutar outros imunócitos que conduzirão outras células à diferenciação (mDCs, pDCs, células T naïve), perpetuando assim a inflamação. (NICKOLOFF; NESTLE, 2004; MERAD et al., 2008; SANCHEZ, 2010; BOEHNCKE; SCHÖN, 2015);

b) progressão ou amplificação

A amplificação dá-se quando, após a ativação das TCs naïve, via sinapse imunológica com as APCs, ocorre a diferenciação das células de Langerhans (CLs) em células dendríticas mielóides (mDCs) da derme, passando a ser chamadas de células dendríticas dermais (DDCs). Estas exibem a capacidade de secretar IL-12 (p35/p40) e IL-23 que são citocinas potentes na indução à diferenciação das TCs linfocíticas respectivamente em Th1 (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12) via fator de transcrição STAT4 / Tbet e em Th17 (IL-23, IL-22, IL-17) via fator de transcrição STAT3 / ROR  $\gamma$ t. (NESTLE; DI MEGLIO et al., 2009). A partir deste “pool” de citocinas produzidas pela sinapse imunológica, a amplificação do processo psorásico irá se consolidar através da diferenciação dos linfócitos em células Th1, Th17, Th22 e T reguladoras conforme mostra a figura 2.



**Figura 2:** Ativação de células T CD4 + naíve por células apresentadoras de antígenos (APCs). Desenvolvimento de diferentes linhagens de células T CD4 + com propriedades distintas. O primeiro e o segundo sinal emitido pela APC ao TCCs é responsável pela geração de células T efetoras / memória. A linhagem de células T é dependente do meio de citocinas presentes durante a ativação de células-T.

Fonte: Adaptado de Sabat et al. (2007) e Perera et al. (2012)

Em especial as subpopulações de células Th17 possuem um papel fundamental na patogênese de diversas doenças autoimunes incluindo a psoríase. (LINDTE et al, 2014). Através da secreção de suas citocinas do tipo IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 e TNF- $\alpha$ , ativam e mantêm o eixo IL-23 / IL-17 A, fundamental à diferenciação terminal, migração e proliferação dos queratinócitos; induzem à síntese de múltiplos mediadores pró-inflamatórios (CCL20, CXCL1, CXCL2 e CXCL8/IL-8) responsáveis pelo recrutamento e infiltração de neutrófilos na pele e; inibem pelo menos 6 genes envolvidos na diferenciação dos queratinócitos (filagrina, citoqueratinas, loricrina, involucrina, calmodulina da pele e desmocolina). (PERERA et al., 2012; LYNDE et al., 2014; RABEONY, 2014).

Outros eventos amplificadores da resposta psorásica que ocorrem paralela e simultaneamente são a disfunção e redução da expressão das Tregs (SUGIYAMA et al. 2005; SOLER et al., 2016); a manutenção dos altos níveis de citocinas pró-inflamatórias tipo Th1 (SABAT et al., 2007; PERERA et al., 2012); e a promoção da

angiogênese, hiperexpressão de peptídeos antimicrobianos e hiperplasia queratinocítica via citocinas Th22 (IL-22, IL-26 e IL-13) (HEIDENREICH et al., 2009; BALATO et al., 2012; GUÉRARD et al., 2012; ZHANG et al., 2012; MICHALAK-STOMA et al., 2013);

#### c) manutenção

Os queratinócitos, atores centrais da resposta imune inata e críticos na patogênese da psoríase, quando em homeostase, apresentam um controle fino entre a sua proliferação e diferenciação, mantendo a histoarquitetura e função normal da epiderme. Durante a psoríase o estado de equilíbrio é quebrado e uma taxa de renovação e proliferação dos queratinócitos da pele sadia passa de 28 dias para apenas 3-4 dias. (BOWCOCK et al., 2004).

A ativação dos queratinócitos e sua consequente hiperproliferação aberrante é resultado de um conjunto de citocinas secretadas principalmente pelos linfócitos Th1, Th17 e Th22. A formação dos Th1, Th17, monócitos / células dendríticas e posterior recrutamento de macrófagos, neutrófilos, mastócitos e outros, contribui para os níveis elevados e constantes de TNF $\alpha$ , responsáveis pela manutenção da hiperatividade queratinocítica. (SABAT et al., 2007). Assim como o TNF- $\alpha$ , a IL-22 é uma outra citocina que exerce um papel fundamental para o fenótipo hiperplásico dos queratinócitos, ativando-os e tornando-os capazes de secretar citocinas e quimiocinas que atuarão de forma autócrina / parácrina na manutenção do estado ativado / inflamado dos queratinócitos. (LOWES et al., 2014);

#### d) remissão

Segundo Boyman et al. (2007), uma vez que um indivíduo tenha desencadeado uma primeira lesão psoríase, presume-se que a pele de aparência normal, assintomática, possui um baixo limiar de ativação graças a posição estratégica dos PDCs, DDcs e das células T. Portanto, um “gatilho” celular normalmente inócua pode ativar as células imunes residentes da pele (elicitando a memória imunológica) levando a uma lesão inflamatória, sem que requeira a recirculação ou



recrutamento de outras células.(MAK et al., 2009; NESTLE, 2008). Esse estado “inflamado” pode resolver-se espontaneamente ou através de intervenção terapêutica (resolução).

#### **1.1.4 Tipos de tratamentos**

Novas evidências sobre a patogênese da psoríase indicam que os fenótipos distintos da doença têm diferentes perfis imunogenéticos, o que provavelmente irá influenciar nas escolhas de tratamento. (MAHIL et al., 2016).

A conduta clínica preconiza que o tratamento da psoríase deve ser individualizado, dependente da forma clínica da doença, da gravidade e extensão, da idade, sexo, escolaridade e das condições do paciente em relação à saúde geral e sua situação socioeconômica. Também deve ser levado em conta o grau de comprometimento da qualidade de vida individual. (KRUEGER et al., 2000; KRUEGER; ELLIS , 2005; PATHIRANA et al., 2009):

##### *1.1.4.1 Tratamentos tópicos*

Nas formas leves de psoríase (65%), a terapêutica tópica, seja em monoterapia, ou combinada, costuma ser suficiente para o controle das lesões. O tratamento tópico minimiza os possíveis efeitos colaterais do tratamento em outros órgãos e na pele não lesada. Nas formas moderadas (25%) à graves (10%), o tratamento local, quando associado à fototerapia e/ou à terapia sistêmica, propicia mais conforto ao paciente e acelera a melhora. Em geral os produtos tópicos ceratolíticos, emolientes ou umectantes deverão ser sempre incluídos em qualquer programa terapêutico, quer como coadjuvante, quer em alternância, com os produtos ativos e nas fases assintomáticas. (NPF- <https://www.psoriasis.org/about-psoriasis>).

No Brasil é preconizado como 1ª linha de tratamento ativo para a psoríase o uso de agentes tópicos tais como: (CONSENSO, 2012; UVA et al., 2012):

#### a) corticosteróides

Geralmente são utilizados os corticosteróides classificados como sendo de alta potência como a betametasona dipropionato 0,05% e o furoato de mometasona 0,1% e/ou os de muito alta potência como o propionato de clobetasol 0,05%, combinados ou não, com eficácia comprovada. (VAKIRLIS et al., 2008; FLEMING et al., 2010; MASON et al., 2013; REICH; DAUDEN, 2014; HOUGEIR et al., 2015). Os cuidados no uso e os efeitos adversos mais comuns são abordados por Hengge et al. (2005) e Sanjay et al. (2012);

#### b) análogos da Vitamina D3 (Vit.D3)

O calcipotriol é um exemplo de metabólito biologicamente ativo, análogo da Vit.D3 com atividade antipsoriásica comparável a corticosteroide tópico grau III (furoato de mometasona 0,1% e halcinonida 0,1%) ou comparável à antralina, com a vantagem de não ser atrofogênico, nem de induzir taquifilaxia.(CONSENSO, 2012; REICH; DAUDEN, 2014) . Os efeitos não clássicos mais importantes que norteiam os benefícios dos análogos da Vit.D3 na terapia para psoríase leve à moderada foram revisados por Holick (2008) e Mostafa e colaboradores (2015);

#### c) derivados do antraceno

A antralina (cignolina ou ditranol) 0,1 a 1% de uso diário é utilizada no tratamento da psoríase exercendo a sua ação através de alterações na hiperproliferação, queratinização e inflamação. Ela induz uma cascata de radicais livres na pele, resultando em efeitos antiproliferativos e moduladores da inflamação na psoríase. O interrompimento do ATP via dano mitocondrial pode ser também um efeito adicional antiproliferativo do ditranol. (VAN DE KERKHOFF et al., 2008).

#### d) derivados macrolídeos imunossupressores

O pimecrolimo (creme 1%) e o tacrolimo (pomada 0,03% e 0,1%) são imunossupressores macrolídeos , inibidores da calcineurina fosfatase, que impedem a ativação de células T via inibição da desfosforilação de NFAT celular (fator nuclear

de células T ativadas). (VAN DE KERKHOFF et al., 2008). Estes fármacos possuem efeitos discretos na psoríase, sendo indicados para formas localizadas na face, nas dobras e semimucosas, por provocarem menos efeitos colaterais do que os corticóides e análogos da Vit.D3.):

– Alcatrão

Existem três tipos importantes de alcatrões em uso dermatológico: o coaltar, o ictiol e o óleo de cade. Usado isoladamente, o coaltar tem eficácia moderada na psoríase em placa, todavia, quando associado aos raios UVB, potencializa a ação destes, de tal modo que podem ser utilizados na metade da dose eritematosa mínima. (CONSENSO, 2009-2012).

De odor desagradável, o coaltar é um produto resultado da destilação de carvão, contendo mais de 10 000 compostos ativos. É usado como opção alternativa na psoríase em concentrações variáveis de 1 a 5%, sob diferentes formas farmacêuticas com destaque para os xampus que utilizam coaltar sob a forma de liquor carbonis detergens ou LCD.

Segundo Devaux et al. (2012) em estudo de revisão, a eficácia da terapia tópica é variável com uma taxa de sucesso de tratamento entre 4% e 40,7% para a o uso de análogos de vitamina D e entre 27,2% e 55,3% para a associação entre análogos de vitamina D e esteróides tópicos.

#### 1.1.4.1.1 Novas abordagens terapêuticas de uso tópico

Com os avanços tecnológicos de novos agentes antipsoriáticos tópicos, o desenvolvimento de formulações com veículos inovadores ou nanoparticulados e a identificação de novos alvos terapêuticos, surge uma nova classe terapêutica, com espectro de ação diferente dos agentes tradicionais. (CHIRICOZZI et al., 2014). Algumas destas tecnologias emergentes pertencem as seguintes classes farmacológicas: (MENTER; GRIFFITHS, 2015).

- Inibidores da Janus Kinase (JAK); inibidores da fosfodiesterase (PDE-4); inibidores da cisteína protease; inibidores da migração linfocítica; antagonistas do “High mobility group Box -1” (HMGB 1); e novos análogos da Vit.D3 e combinações.

As propostas de novos fármacos baseam-se não somente em inovação, mas também em atributos cosméticos que contribuam na reversão de um obstáculo comum na psoríase que são os índices de não aderência aos tratamentos tópicos. (DEVAUX et al., 2012). Nos tratamentos sistêmicos a não aderência alcança uma taxa de 40% entre os pacientes com psoríase severa. (ZSCHOCKE et al., 2014).

#### *1.1.4.2 Tratamentos sistêmicos*

Cerca de 25 a 35% dos indivíduos com psoríase têm formas moderadas ou graves, não controláveis de modo satisfatório por tratamentos tópicos sozinhos, que requerem a terapêutica sistêmica através do uso de fármacos como os retinóides ou derivados da vitamina A (acitretina e isotretinoína) , o Metotrexate (MTX) e as Ciclosporinas (CaS) (CONSENSO, 2012):

##### a) derivados do ácido retinóico (RA)

A classe dos retinóides ou derivados da vitamina A (retinol) no tratamento da psoríase é representada pela isotretinoína (1ª geração) e a acitretina (2ª geração). (GOLLNICK; DÜMMLER, 1997; WERNER, 2006). A acitretina é um retinóide de 1ª escolha aprovado como monoterapia para o tratamento (v.o 25-50 mg/dia), eficaz da psoríase pustulosa ou psoríase eritrodérmica, e com menos eficácia para os tipos de psoríase em placas e gutata.

O uso da acitretina pode ser combinado com, calcipotrieno tópico, metotrexato oral ou ciclosporina sendo que os resultados são melhores e os efeitos adversos são reduzidos graças a possibilidade de uso de baixas doses da acitretina. Quando combinado com fototerapia (UVB ou PUVA) os resultados são ainda melhores. (TOSTI et al., 2009; BAILEY et al., 2012).

Vários papéis importantes na regulação do crescimento, na diferenciação e apoptose de muitos tipos celulares são atribuídos aos retinóides embora com mecanismos ainda não totalmente conhecidos conforme pode ser lido em revisões bibliográficas.(MUCIDA et al., 2007; ELIAS; KM et al., 2008; NOLTING et al., 2009; JEAN et al., 2011);

b) metotrexate (MTX)

as propriedades antiinflamatórias e imunomoduladoras do MTX ocorrem através dos seus efeitos imunossupressores e antioxidantes; apoptóticos; e redutores dos níveis metabólicos da proteína PPAR- $\beta$  envolvido na patogênese da psoríase (MIHELLER et al., 2013; DOGRA; MAHAJAN, 2013.) MTX é um fármaco de primeira linha, de uso sistêmico utilizado no tratamento de adultos com psoríase moderada à grave acompanhada ou não de lesões articulares com atenção especial para os fatores de risco do paciente que podem conduzir à graves efeitos adversos (nefro e hepatotoxicidade) e grande número de interações medicamentosas. (CARRASCOSA et al., 2016);

c) ciclosporinas ou ciclosporina A (CsA)

oligopeptídeo cíclico imunossupressor isolado dos esporos do fungo *Tolyocladium inflatum* Gams que se liga à proteína ciclofilina do citoplasma linfocítico formando um complexo inibidor da calcineurina que é importante na ativação de fatores de transcrição nuclear para a produção de IL-2 e TNF- $\alpha$ ; fundamentais na resposta inflamatória do tipo 1 (Th1 cytokines). (PATHIRANA et al., 2009; AMOR et al., 2010).

A vantagem principal frente aos outros imunossupressores citotóxicos é a não indução à mielossupressão, algo importante nas doses utilizadas em dermatologia (máximo 5 mg/kg/dia). Sua indicação é para pacientes com formas mais resistentes de psoríase, especialmente com o tipo em placas. O regime de tratamento e os efeitos colaterais típicos do fármaco (nefrotoxicidade e hipertensão) são revistos com detalhes nos Guidelines de dermatologia (KELLY, 2000; RYAN et al., 2010; CONSENSO, 2012).

### 1.1.4.3 Fototerapia

A fototerapia é normalmente utilizada como tratamento para a psoríase moderada à grave, sendo um recurso terapêutico muito eficaz quando usado sozinho ou combinado com as terapias tópicas e sistêmicas.

A fototerapia consiste da incidência da radiação UVB (290-320nm) e a fotoquimioterapia é associação do psoraleno (fotossensibilizante oral ou tópico de efeito antimitótico) mais a radiação UVA (320-400nm).

O uso da luz UVA sozinha é pouco eficaz por isso a associação com psoralenos (PUVA) antes da exposição à luz UVA. (BERTH-JONES, 2013).

A luz UV promove alterações imediatas como o dano na membrana e DNA celular, a indução de fatores de transcrição citoplasmática e a isomerização do ácido urocânico. Este último é considerado o “filtro solar” endógeno da pele e encontrado predominantemente na camada córnea. Acredita-se que seja majoritariamente derivado do catabolismo da filagrina que é rica em proteína rica em histidina. Experimentos *In Vivo* e *In Vitro* mostram que quando incidido pela radiação UVB o ácido trans urocânico é convertido em ácido cis- urocânico que é um típico ativador de células Treg. (SCHWARZ, 2005; CARNEIRO; SUELI, 2007).

A luz UVB é também usada para a psoríase leve à moderada, utilizando-se banda larga (270-350nm) ou uma banda estreita (311nm). A eficácia de ambos os tipos de bandas oscila entre 50-70% dos pacientes, sendo equivalentes a uma melhora aproximadamente igual à PASI 75 após 4-6 semanas.

Embora a luz UVA traga resultados mais rápidos e por um tempo mais prolongado do que a UVB para o tratamento de psoríase, ela é mais cancerígena e causa mais fotoenvelhecimento. (AYALA-FONTÁNEZ et al., 2016). O risco de desenvolvimento de um câncer de pele para pacientes em tratamento com radiação UVB foi mensurado em 2,5 à 7,5% maior do que a população em geral sendo o mesmo risco 5x maior para pacientes submetidos à radiação UVA. (DUARTE et al., 2006).

#### 1.1.4.4 Agentes biológicos

Nos últimos trinta anos, as investigações têm sido focadas em agentes sistêmicos para o tratamento de psoríase moderada a severa, em particular, com a introdução de agentes biológicos ou “pequenas moléculas proteicas (CHIRICOZZI et al., 2014). Tais agentes são geralmente moléculas de natureza proteica, de tamanho molecular relativamente grande (~150 Kda), semelhantes a proteínas animais ou humanas, suscetíveis à digestão, e por isso administradas por via parenteral (subcutânea, intramuscular ou intravenosa) e não oral.(ARRUDA, 2004).

No Brasil, apenas o **adalimumabe**, o **infiximabe** e o **etanercepte** (anti fator de necrose tumoral) têm o uso aprovado para o tratamento da psoríase em placa e da artrite psoriásica. O **ustequinumabe** (inibidor de interleucina IL-12/IL-23) está aprovado, até o momento, somente para o tratamento da psoríase em placa. Para obter a aprovação da FDA no tratamento da psoríase, um agente biológico deve diminuir o PASI em 75% em ensaios clínicos, no entanto muitos pacientes na prática podem ganhar o benefício clinicamente significativo do tratamento biológico, sem alcançar este grau de melhora PASI. (CONSENSO, 2012).

Os agentes biológicos utilizados no tratamento da psoríase foram desenhados para agir segundo quatro diferentes estratégias:

- Estratégia I: Depleção das células T e seus subtipos decorrentes da diferenciação;
- Estratégia II: Bloquear a ativação das células T e/ou sua migração até o tecido;
- Estratégia III: Desvio imune das células T e modificação do equilíbrio Th1/Th2;
- Estratégia IV: Bloqueio das citocinas inflamatórias, entre elas o TNF $\alpha$  e a IL12/23.

Já as proteínas de fusão atuam tanto no bloqueio da ativação linfocitária (alefacepte), quanto no bloqueio de citocinas como o TNF- $\alpha$  solúvel (etanercepte).

Os anticorpos monoclonais podem ligar-se tanto à citocinas (infiximabe, adalimumabe, ustequinumabe) quanto à receptores da superfície de células (efalizumabe). Este último foi retirado do mercado por ter sido associado a um potencial risco de desenvolvimento de leucoencefalopatia multifocal progressiva. (DIAMANTINO; FERREIRA, 2011).

Os agentes biológicos em geral apresentam como principais desvantagens, o alto custo, a imunossupressão (trombocitopenia, anemia (aplástica), leucopenia (neutropenia, e pancitopenia) e a necessidade de serem infundidos via subcutânea (reações no local da injeção). (BERTH-JONES, 2013).

As contra-indicações absolutas comuns ao infliximabe ,etanercept e adalimumab são as infecções ativas (tipo tuberculose), hepatite crônica ativa B, a insuficiência cardíaca congestiva (NYHA classe III ou IV). Como recomendação geral antes na administração de qualquer um destes fármacos biológicos, deve-se fazer os controles laboratorias padrão, além de alguns exames adicionais específicos para cada tratamento abordados em revisão por Parthirana (2009).

Informações adicionais sobre os principais agentes biológicos usados no tratamento da psoríase no Brasil foram resumidamente colocadas no anexo VI deste trabalho. A tabela 1 mostra um ranking de eficácia comparativa entre monoterapias antipsoríasicas publicadas recentemente por Boehncke e Schön (2015).

Apesar dos agentes biológicos serem muito eficazes na maioria dos doentes, não o são universalmente, existindo uma percentagem de casos de perda ou ausência de resposta. Assim, a necessidade de terapêuticas ainda mais eficazes e seguras, preferencialmente associadas a um esquema posológico conveniente e de monitorização simples, representam a força motriz que conduz à pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos. (DIAMANTINO; FERREIRA, 2011).

### **1.1.5 Alternativas terapêuticas em medicina complementar**

Estudos demonstram que por conta do curso crônico e recalcitrante da doença, pacientes psoríasicos, frequentemente, buscam medidas alternativas ou complementares ao tratamento médico instituído, chegando até 69% o número de pacientes que utilizam medidas terapêuticas tais como dietas, suplementos alimentares e o uso de ervas medicinais.(CONSENSO, 2012).

Existe um amplo espectro de opções de tratamentos chamados alternativos e /ou complementares para a psoríase, que inclui o uso da vitamina D padrão, óleo de peixe, inositol, zinco, selênio, *Aloe vera*, extratos da planta medicinal neem



(*Azadirachta indica*, ou lilás indiano), vitamina B12, *Mahonia aquifolium* (Uva do Oregon), Oleum horwathiensis (Psoricur®), acupuntura, oxigênio terapia, banhos termais, medicina chinesa, entre outros tratamentos. (LASSUS; FORSTRÖM, 1991; ZHANG; GU, 2007; BUTLER et al., 2009; SMITH et al., 2009; MORELLI et al., 2010; KOPEL et al., 2013; RAHMAN et al., 2013; LANDIS et al., 2014; KESEROGLU; GÖNÜL M, 2014).

Guidelines nacionais e internacionais (CONSENSO, 2012; NICE, 2014, respectivamente) concordam que há uma escassez de estudos controlados e randomizados que demonstrem evidências científicas definitivas que respaldem as condutas terapêuticas ditas complementares ou alternativas.

**Tabela 1:** Comparação de eficácia entre terapias anti psoríicas segundo Boehncke WH e Schön MP (2015).

Fonte: Boehnck e Schön, (2015)

Terapia adotada	*Eficácia	Nível de evidência	Comentário
Acitretina	15%	2	Evite em mulheres jovens; não é recomendado como monoterapia de baixa dosagem
**Inibidores de calcineurina	30%	2/3	Reservados para locais tais como áreas de rosto e intertriginosas
Apremilast	30%	1	Fármaco oral inovador, eficaz também na artrite psoriática
Ciclosporina	45%	1	Muitas vezes usado só por alguns meses devido a nefrotoxicidade
**Análogos da Vitamina D3	45%	1	Tratamento tópico de longo prazo com maior perfil de segurança
Ésteres do ácido fumárico	50%	2	Forma oral disponível apenas na Alemanha
Metotrexate	50%	2	Eficaz também na artrite psoriática
Etanercepte	50%	1	Considerado adequado também para uso intermitente
**Glicocorticóides	60%	1	Causa atrofia da pele se usado a longo prazo
Exposição à luz UV.B	70%	2	Tratamento mais demorado; dose cumulativa pode causar efeitos adversos
Adalimumabe	70%	1	Agente biológico mais usado para esta indicação
Ustequinumabe	70%	1	Apenas quatro injeções/ano durante o tratamento de longo prazo
Infliximabe	80%	1	Início de ação muito rápido; recomendada para a psoríase pustulosa generalizada (“off-label”)
Secuquinumabe	80%	1	Pacientes alcançam muitas vezes a eliminação completa das lesões de pele
Psoraleno + exposição à luz UV A	90%	2	Tratamento demorado; dose cumulativa pode causar efeitos adversos (incluindo neoplasias)

\* Proporção estimada de pacientes que alcançaram pelo menos uma redução de 75% na sua pontuação na escala PASI da linha de base ao fim da terapia de curto prazo.

\*\* Terapia tópica que, como monoterapia, mostra-se eficaz p/ tratar apenas a psoríase leve.

## 1.2 Aloe vera

### ***1.2.1 Aloe vera no Sistema Único de Saúde (SUS): Fitoterapia como medicina complementar***

Em 1978, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconheceu oficialmente o uso de fitoterápicos com finalidade profilática, curativa, paliativa ou com fins de diagnóstico e recomendou a difusão mundial dos conhecimentos necessários para o seu uso. De acordo com a Organização a porcentagem da população que usou alguma vez na vida a medicina alternativa ou complementar (TM ou CAM) equivale a 48% na Austrália, 70% no Canadá, 42% nos EUA, 38% na Bélgica, 75% na França e 90% na Alemanha. Na África até 80% da população utiliza a medicina tradicional (TM) para ajudar a atender suas necessidades de saúde. Na Ásia e na América Latina, as populações continuam a usar TM como resultado de circunstâncias históricas e crenças culturais. Na China, a TM é responsável por cerca de 40% de todos os cuidados de saúde prestado ou tratamento de doenças físicas e mentais. (OMS 2002-2005).

Apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e de novos processos biotecnológicos, 25% dos medicamentos prescritos nos países industrializados são originários de plantas, obtidos a partir de cerca de 90 espécies vegetais. (CALIXTO, 2000). Ao analisar o índice de novas entidades químicas (NCE) em estudo para uso farmacêutico constata-se que os produtos naturais ainda contribuem ou estão envolvidos de alguma forma em aproximadamente 50% de todas as novas moléculas testadas para o câncer entre os anos 1981–2014. (DIAS, 2012; NEWMAN; CRAGG, 2016).

No Brasil, somente 20% da população é responsável por 63% do consumo dos medicamentos disponíveis; os 80% restantes da população encontra nos produtos de origem natural, especialmente as plantas medicinais, a única fonte de recurso terapêutico de acesso mais fácil. Essa alternativa é utilizada tanto dentro de um contexto cultural, na medicina popular, quanto na forma de fitoterápicos. (HOSTETTMANN et al., 2003).

A partir da Portaria 971 de 3 de Maio de 2006 foi aprovada no Brasil, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de

Saúde (SUS), já como reflexo da estratégia de incentivo à fitoterapia pela OMS. No mesmo ano, foi decretada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos que veio incorporar princípios ativos vegetais com evidências científicas ao arsenal terapêutico da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) do SUS. (BRASIL, 2006a-c; BRASIL, 2012; BRASIL, 2015).

Em estudo realizado na Rede Pública de Saúde (SUS) do Estado de São Paulo em 2003, a Aloe vera (*Aloe vera* L. ou “babosa”) foi identificada como uma, dentre as três plantas mais utilizadas pela população, seguida pelo guaco (*Mikania glomerata Sprengel*) e calêndula (*Calendula officinalis* L.). Sua indicação de uso principal refere-se ao efeito cicatrizante de feridas. (OLIVEIRA et al., 2006).

Outros levantamentos realizados sobre o uso de plantas medicinais ao longo dos anos em diferentes estados do Brasil, também identificaram, no âmbito do SUS, a babosa na lista das plantas mais utilizadas na área dermatológica pela população. (PEREIRA et al., 2005; ALVES et al., 2011; CHAVES; DOUGLAS, 2012; LOPES et al., 2015).

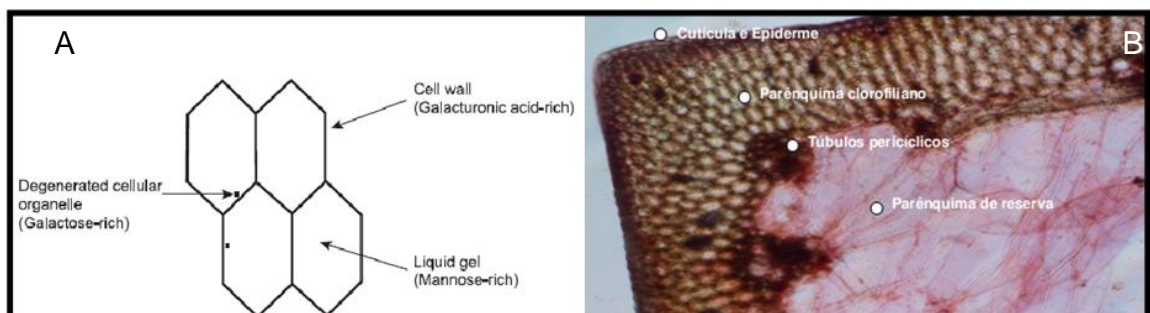
### **1.2.2 Etnobotânica e descrição geral da Aloe vera**

*Aloe vera barbadensis* L (sinônimo *Aloe barbadensis* Miller ou Aloe de Curaçao; família: Liliaceae) é um arbusto perene, xerófila, heliófita, originária de regiões secas da África, Ásia e Europa do Sul, especialmente nas regiões mediterrâneas. (LÓPEZ et al., 2013; PAL et al., 2013). Possui folhas verdes suculentas unidas pelo tronco em um padrão de roseta, reunidas em até 20 unidades. Seu uso terapêutico milenar e tradicional em várias culturas no mundo, remonta o ano de 1.500 a.C. no papiro egípcio de Ebers onde são detalhados mais de 12 medicamentos com base na Aloe vera. (COASTS; AHOLA, 2010; PAL et al., 2013). Embora existam mais de 300 espécies do gênero Aloe no mundo, somente quatro (*andongensis*, *arborescens*, *barbadensis* e *ferox*) apresentam propriedades medicinais e / ou algum outro interesse econômico sendo a *Aloe barbadensis* Miller (Aloe vera) a espécie de maior interesse comercial na área cosmética, medicinal e nutricional. (COSMETIC INGREDIENT REVIEW, 2007; CHINCHILLA et al., 2013).

A anatomia da folha mostra duas frações principais da folha da *Aloe barbadensis* Miller: o parênquima clorofiliano (20-30% peso seco), caracterizado pela presença

do látex de cor amarela, composto sobretudo por antraquinonas; e o parênquima de reserva (65-80% peso seco), constituído pelo gel transparente mucilaginoso derivado do parênquima foliar, composto sobretudo por água e polissacarídeos.(FEMENIA et al., 1999; GONÇALVES; VANESSA, 2008).

Tecnicamente, o termo “polpa” ou “parênquima tissular” refere-se à parte interna carnosa, intacta da folha incluindo as paredes celulares e organelas enquanto o “gel” ou “mucilagem” refere-se ao líquido viscoso transparente que após extrusão equivale a 70% (p/p) do parênquima tissular. Logo, há três componentes estruturais na polpa de Aloe vera: (a) parede celular; (b) organelas degeneradas; (c) líquido viscoso contido dentro das células. (figura 3) Demonstrou-se que cada um desses componentes internos da folha são distintos uns dos outros em termos morfológicos e em relação à composição de açúcares, principalmente manose e glicose.(Ni Y et al, 2004). A polpa crua da Aloe vera (chamado “filete”) contém aproximadamente 98,5% de água enquanto a mucilagem ou gel consiste de 99,5% de água com pH próximo de 4,5. O percentual de 0,5 – 1,0 % restante é composto por matéria sólida incluindo uma variedade de compostos hidrossolúveis, vitaminas lipossolúveis, minerais, enzimas, polissacarídeos, compostos fenólicos e ácidos orgânicos. (HAMMAN, 2008; SHARRIF MOGHADDASI et al., 2011).



**Figura 3:** Componentes estruturais na polpa de Aloe vera (a) Representação esquemática da estrutura da polpa da Aloe vera, os três diferentes componentes e respectivos açúcares.(b) Análise microscópica do corte de uma secção transversal de folha da Aloe barbadensis Miller em microscópio Olympus em objetiva de 20X, evidenciando a cutícula e epiderme, parênquima clorofiliano, túbulos pericíclicos e parênquima de reserva.

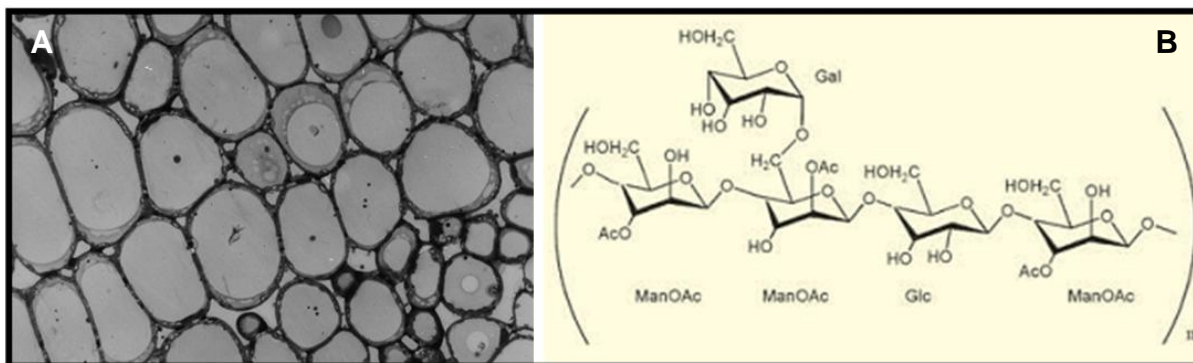
Fonte: (a) Hamman, 2008 ; (b) Gonçalves; Vanessa, 2008;

### **1.2.3 Fitoquímica: principais constituintes da espécie *Aloe vera***

Muitos compostos com estruturas diferentes têm sido isoladas tanto a partir do parênquima tissular central das folhas da *Aloe vera* como do exsudado resultante das células adjacentes aos feixes vasculares. O exsudado amarelo amargo contém derivados dihidroxiantraquinônicos e seus glicosídeos, que são usados principalmente por seus efeitos catárticos. Já o parênquima tissular central ou polpa contém, em maior concentração, diferentes carboidratos (polissacarídeos) e menor concentração estão presentes as enzimas (carboxipeptidases, glutathione peroxidase, superóxido dismutase), amino ácidos (arginina, asparagina, ácido glutâmico, ácido aspártico e serina), vitaminas A, C, E, do complexo B, saponinas, ligninas, ácido salicílico, esteroides precursores de prostaglandinas (ácido gama linolênico ou GLA), fitoesteróis e oligoelementos tipo cálcio, fósforo, manganês, potássio, magnésio, zinco. Os compostos ativos majoritários presentes no parênquima de reserva são os polissacarídeos: glucomannan e acemannan. (HAMMAN; JH, 2008; SHARRIF MOGHADDASI et al., 2011).

A proporção presente entre manose e glicose é de 1:1,3 sendo que glicose existe mais na forma livre (Glucomannan) e manose na forma polimerizada. (Acemanana ou Acemannan ou Carrysina®). (AHP, 2012).

No gel do parênquima de reserva ou filete encontra-se a manose (83,7% – 92,1%) como principal componente de um polissacarídeo de armazenamento conhecido como Acemannan (ACM) com 80 – 130 KDa. Este, além de ser o mais importante constituinte bioativo do *Aloe vera*, representa a maior fração da porção carboidrato do gel extraído do parênquima de reserva. O acemannan apresenta duas características: 1ª) São, na sua maioria, compostos por um “esqueleto” estrutural de resíduos polimerizados de manose com um pequeno percentual de glicose conectado por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -(1,4); 2ª) São resíduos polimerizados de manose acetilados na segunda (O-2), terceira (O-3) ou sexta (O-6) posição dos átomos de oxigênio, com uma taxa média de acetilação de  $\pm 0,78$  por resíduo de manose. (Figura 4).



**Figura 4: Parênquima de reserva e acemannan. (a).** Imagem das células do parênquima tissular do gel de Aloe vera. Os pequenos grânulos anexados à superfície interna das paredes celulares podem conter polissacarídeos bioativos de Acemannan. **(b)** estrutura proposta do polissacarídeo acetilado (acemannan). Fonte: Femenia et al 1999.: AHF. 2012

Em menores concentrações, encontram-se ainda os polissacarídeos derivados da glicose (Glucomanana) em teor equivalente à 3,2% - 3,9% , da galactose (Galactomanana) igual à 3,8% - 3,9% e da arabinose (Arabinana) com valores de 0,9% à 3,6% (AHP, 2012).

Outra importante classe de polissacarídeos é composta pelos maloyl glucans (carboidratos acetilados do ácido málico) denominados veracilglucans A (296 Da), B (458 Da, pH 3,8) e C (1570 Da, pH 4,7) que tem sido investigados em relação a suas propriedades imunomoduladoras. (ESUA et al., 2006; KUSTER et al., 2015). Ainda quanto às atividades imunomoduladoras, a aloerida (PM 4000 – 7000 KDa) é outro polissacarídeo encontrado em pequenas porções (0,015% p/p) no extrato mucilaginoso de Aloe vera. Aloerida possui frações glicosídicas contendo glicose (37,2%), galactose (23,9%), manose (19,5%) e arabinose (10,3%). O composto induziu a expressão de mRNA codificador de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  à níveis semelhantes aos observados em células máximamente ativadas por LPS; além disso, demonstrou em ensaios *In Vitro* a indução de modo marcante de células monocíticas humanas do tipo THP-1. (QIU et al., 2000; PUGH et al., 2001).

O parênquima clorofiliano, também chamado de revestimento foliar (“leaf lining”) é composto pela seiva, resina ou látex que tem como principais constituintes químicos os glicosídeos de antraquinonas (aloína, aloe-emodina), antronas (barbaloína é uma mistura de aloína A e B, responsável por 10-25% p/p do exudato) e cromonas (Aloeresina A e B ou Aloesina). A retirada pré-comercialização dos compostos

fenólicos do extrato mucilaginoso via filtração (“decolorization”) é compulsória para certificação de qualidade. (AHP, 2012; SEHGAL et al., 2013).

De acordo com as revisões bibliográficas consultadas, existem cerca de 75 fitocompostos como representantes principais dos componentes bioativos já identificados na planta *Aloe vera barbadensis*. (SHARRIF et al., 2011; AHP, 2012; CHINCHILLA et al., 2013; PAL et al., 2013).

#### 1.2.4 Bioatividade e aplicações clínicas na psoríase

Há inúmeros fitocompostos na *Aloe vera* com potencial terapêutico indicado para várias condições de saúde. Os polissacarídeos, principalmente o acemannan, destacam-se por possuírem mais relatos em literatura do que os demais constituintes. (COSMETIC INGREDIENT REVIEW, 2007; REUTER et al., 2008; ATIBA et al., 2011; CHINCHILLA et al., 2013; GULLÓN et al., 2015; RADHA et al., 2015). A tabela 2 apresenta uma série de atividades biológicas e seus respectivos potenciais mecanismos de ação resumidos, já observados em estudos com os extratos de *Aloe vera In Vitro* e *In Vivo*. (adaptado de COWSERT, 2010).

**Tabela 2:** Principais efeitos biológicos dos componentes ativos constituintes dos extratos mucilaginosos e foliares da espécie aloe. Os estudos selecionados são principalmente focados nos efeitos da fração polissacarídica. Os estudos realizados com frações antraquinônicas (aloe emodina e emodina) estão marcados com dois asteriscos (\*\*). Legenda: **(m)** murino; **(c)** coelho; **(h)** human; **(lvt)** *In Vitro*; **(CTI)** Clinical Trial Phase I; **(CTII)** Clinical Trial Phase II; **(RCT)** Randomized Clinical Trial Fonte: elaborada pelo autor.

ATIVIDADE BIOLÓGICA	MECANISMO DE AÇÃO PROPOSTO	REFERÊNCIAS
CICATRIZAÇÃO	Estimula o fibroblasto e a formação do tecido conectivo	Tizard et al, 1994 <b>(m)</b> ; Zhang L. et al,1996 <b>(m)</b> ; Davis RH et al, 1994(a) <b>(m)</b> ; Somboonwong J et al, 2000 <b>(m)</b> ; Choi S et al., 2001 <b>(m/lvt)</b> ; Moghbel A et al, 2007 <b>(h)</b> ; Jia Y. et al, 2008 <b>(m/r)</b> ; Jettanacheawchankit S. et al, 2009 <b>(m/lvt)</b> ; Jittapiromsak N. et al, 2010 <b>(m/lvt)</b> ;Atiba A et al, 2011 <b>(m)</b> ; Shahzad MN, Ahmed N ,2013 <b>(h)</b> ; Boonyagul S. et al, 2014 <b>(m/lvt)</b> ; Oryan A. et al, 2014 <b>(m)</b> ; Xing W. et al, 2015 <b>(m/lvt)</b>
	Estimula o processo reparatório e o crescimento celular epitelial	

## Continuação tabela 2...

<p><b>INFLAMAÇÃO</b></p>	<p>Bloqueia a produção de bradicinina e histamina</p> <p>Inibe a dor aguda por vias periféricas</p> <p>Inibe a formação de eicosanoides;</p> <p>Inibe a produção de citocinas IL-8, TNF, IL-6 and IL-1<math>\beta</math>.</p> <p>Inibe a filtração de leucócitos PMN</p> <p>**Potente inibidor da ativação de NF-kappa B e expressão de moléculas de adesão</p> <p>Diminui os níveis de expressão de mRNA de iNOS, nNOS e MMP-9</p>	<p>Yagi A et al, 1982 (c); **Kumar A et al,1998 Davis RH et al, 1994(b) (m); Vazquez B et al, 1996 (m); Davis RH et al, 1989 (m); 1998 (lvt); Lindsey K.L. et al, 2002 (lvt); Langmead L et al, 2004 (lvt); Duansak D.et al, 2003 (m); Bautista-Pérez R et al 2004 (lvt); Prabjone R. et al, 2006 (m); Reuter J.et al, 2008 (h); Park, C.et al , 2011 (m); Egesie UG et al, 2011 (m); Devaraj A. and Karpagam T, 2011 (m); Vijayalakshmi D. et al, 2012 (lvt); Rathor N. et al, 2012 (m); Budai M.M et al, 2013 (lvt); Tabandeh M.R. et al, 2014 (m);</p>
<p><b>ANTIBACTERIANO</b></p>	<p>Inibição do crescimento de patógenos de várias espécies</p>	<p>Revisado por Pal S. et al , (2013)</p>
<p><b>DIABETES</b></p>	<p>Interfere na síntese e liberação de insulina, reduz os níveis plasmáticos de glicose (jejum e não jejum) e contribui para reversão do pé diabético; protege as células beta do pâncreas</p>	<p>Yongchaiyudha S. et al, 1996 (h) CTI; Bunyaphatsara N et al, 1996 (h) CTII; Okyar A et al, 2001 (m); Yagi A. Et al., 2009 (h); Kim K, Kim H et al., 2009 (m); Devaraj S. et al., 2013 (h); Choi HC. et al., 2013 (h) RCT; Daburkar M. et al, 2014 (m); Choudhary M et al., 2014 (h); **Alshatwi A.A. et al., 2016 (lvt)</p>
<p><b>IMUNOMODULADOR</b></p>	<p>Ativa a via alternativa do sistema complemento;</p> <p>Estimula o No.e a atividade dos macrófagos;</p> <p>Estimula os macrófagos a produzirem NO e citocinas;</p> <p>Reduzem a ativação e proliferação de células T.</p>	<p>Qiu Z. et al, 2000 (m/lvt); Pugh N.et al, 2001 (lvt); Lee JK et al, 2001 (lvt); Im SA et al, 2005 (lvt); Liu C. et al, 2006 (m/lvt); Yu ZH et al, 2009 (m); Toliopoulos I et al., 2012 (h/lvt); Ahluwalia B.et al, 2016 (lvt);</p>
<p><b>CÂNCER</b></p>	<p>Atividade antiproliferativa, anti migratória , anti angiogênica ou indutora de apoptose, frente a diferentes linhagens celulares do câncer humano de cólon (WiDr, SW620, HCT15), estômago (MGC-803, SGC-7901, MKN-45), bexiga (T24), língua (SCC-4), próstata (LRP-1), faringe (FaDu), fígado (Hep3B), pulmão (A549), ossos (MG-63) , mama (MCF-7 , MDA-MB-453), cérebro (IMR-32, TGW, CHP-126 e NBL-S) e pele (A375, M14 and SK-MEL110)</p>	<p>** Lin J.G. et al, 2006 (lvt); **Guo et al., 2008 (lvt); **Lin S.Y. et al, 2009 (lvt); **Lin M.L. et al, 2011 (lvt); **Suboj P. et al, 2012 (lvt); **Pan Q. et al., 2013 (lvt); **Huang P.H. et al, 2013 (lvt), **Masaldan S, Iyer VV, 2014 (lvt); Yonehara A. et al, 2015 (lvt); ** Tabolacci C. et al, 2015 (lvt); ** Chihara T. et al, 2015 (lvt); **Chen Q.et al, 2016 (lvt);</p> <p>Singab AN.B.et al, 2015 (Revisão)</p>



Existem outras funções biológicas dos extratos de Aloe vera e / ou seus componentes que são foco de pesquisas antigas e atuais tais como:

- Potencialização na biodisponibilidade e absorção de drogas, vitaminas e produtos transdérmicos ou sistêmicos com fins terapêuticos e / ou nutricionais, etc. (HAMMAN, 2008; BENEKE et al., 2012; XAVIER et al., 2013; RANADE et al., 2014; SILVA et al., 2014);
- Agente terapêutico para o Mal de Alzheimer; (PARIHAR et al., 2004; LEWIS et al., 2013; CLEMENTI M et al., 2015);
- Efeitos biológicos dos extratos de Aloe aplicados combinados e / ou monoterapia no tratamento das infecções por HIV (OLATUNYA O.S. et al 2012), epilepsia (RATHOR et al., 2014), hiperlipidemias (DHINGRA et al., 2014) e hepatoproteção (KUMAR et al., 2013).

Em relação à miríade de sintomas elicitados na psoríase, Boca et al. (2014) em recente revisão, elaboraram uma lista de compostos ativos da Aloe vera cujo benefício terapêutico relaciona-se a alguma melhoria do quadro clínico da doença.

Na área de estudos clínicos, Pal et al. (2013) e Singab et al. (2015) em revisão de literatura relatam inúmeras investigações utilizando produtos de uso tópico e sistêmico, à base de extratos ou derivados de Aloe, aplicados à diferentes estados patológicos, incluindo a psoríase.

### **1.3 Sistema chemerina e seus receptores**

#### ***1.3.1 Nomenclatura, conceito e distribuição***

Estudos realizados por Nagpal e cols quanto a base molecular da ação dos retinóides em doenças da pele tais como a psoríase e o câncer culminaram com a descoberta da proteína chemerina que foi inicialmente chamada de gene 2 induzido por tazaroteno (TIG-2) ou ácido retinóico respondedor do receptor 2 (RARRES-2), um gene de codificação da proteína localizada no locus cromossomial 7q36.1. (NAGPAL et al., 1997;

TIG-2 foi encontrado mais tarde como sendo uma proteína envolvida na manutenção da fisiologia normal da pele e / ou em processos inflamatórios além do seu papel no metabolismo ósseo, adipogênico e na diferenciação de adipócitos. (MEDER et al., 2003; WITTAMER et al., 2003; GORALSKI et al., 2007;. BOZAOGLU et al., 2007).

Wittamer et al (2003), criou o nome chemerina depois de determinar o seu valor como ligando para um receptor órfão transmembranar humano de sete passagens acoplado a proteína G expresso em macrófagos e células dendríticas (DC) imaturas chamado ChemR23 ou receptor 1 tipo quimiocina (CMKLR1; DEZ para o rato). Desde então CMKLR1 tem demonstrado ser o único receptor totalmente funcional para chemerina.(ZHOU et al., 2014).

Estruturalmente, a chemerina é distinta das quimiocinas com motivos CXC e CC com base em suas sequências primárias de aminoácidos. Por outro lado, a chemerina funciona como uma quimiocina e induz a migração de leucócitos e a mobilização de cálcio intracelular. Em termos de mecanismo de regulação da sua atividade biológica, a chemerina é semelhante a certo número de quimiocinas (p.ex.:CXCL-9,-10,-11) que sofrem processamento proteolítico, resultando tanto em uma perda ou ganho de capacidade de ligação aos seus receptores, em comparação com aos seus precursores. (DU; LEUNG, 2009).

Chemerina é considerada uma proteína multifuncional de ampla distribuição que, quando secretada, participa de modo autócrino, parácrino ou endócrino, na quimiotaxia e na migração de células imunitárias; na defesa antimicrobiana constitutiva da pele; na adipogênese; reprodução; osteoblastogênese; angiogênese;

miogênese; e na homeostase glicêmica. (KULIG et al., 2011; BANAS et al., 2013; LEI LI et al., 2014; ZABEL et al., 2014). A mensagem originada da secreção de chemerina é regulada por agonistas de receptores nucleares (RAR  $\beta/\gamma$ , RAR  $\beta$ , VDR, DEX, FXR, PPAR $\gamma$ , SREBP2), proteínas (e.g., insulina, leptina, adiponectina) e intermediários sinalizadores do metabolismo (e.g., ácidos graxos livres, glicose, lactato, succinato e acetil CoA) além das citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ ). Após sua tradução, a chemerina é secretada como uma pró-proteína inativa (prochemerina<sup>163S</sup>) e a sua secreção pode ser regulada conforme o tipo de célula e o microambiente tecidual no qual ela está inserida. (SYEDA et al., 2014; ZABEL et al., 2014; HAAS et al., 2016).

No tecido epitelial, por exemplo a chemerina é abundante e estrategicamente localizada na porção epidérmica humana saudável, pois provê uma proteção de barreira antimicrobiana ao hospedeiro. (BANAS et al., 2013).

A tabela 3 mostra a distribuição geral da chemerina em diferentes tecidos, suas concentrações aproximadas esperadas (linhagens humanas saudáveis e cancerígenas) e os respectivos métodos analíticos.

**Tabela 3:** Distribuição da chemerina em diferentes tecidos e suas concentrações aproximadas segundo os estudos referenciados. Legenda: Métodos analíticos (a) q-RTPCR (b) WB; (c) NB; (d) IHC; (e) hibridização In situ; (f) ELISA; (g) Diversos; (h) Dot blot RNA array. (\*) A secreção de chemerina por queratinócitos foi bem sucedida quando estas células foram cultivadas com fibroblastos formando uma estrutura 3D como observado em seções de pele. (Nagpal et al., 1997). (\*\*) Tecido adiposo branco, omental e localização sub cutânea ; (\*\*\*) tecido adiposo marrom. Fonte: elaborada pelo autor

Tecido	Pro / Chemerina	Referências Bibliográficas
Glândula pituitária	+++	Wittamer, V. et al, 2003 (a); Zabel, B.A et al, 2005a(h)
Pele	Epidermis	Saudável +++ Nagpal, S. et al, 1997 (e); Albanesi C. et al, 2009 (d); Nakajima H. et al, 2010 (d); Gonzalvo-Feo S. et al, 2014 (a,f)
	Dermis	Saudável + Psoriática +++ Nagpal, S. et al, 1997 (e); Albanesi C. et al, 2009 (d); Gonzalvo-Feo S. et al, 2014 (a,f)
Timo	+	Zabel, B.A et al, 2005a (a)
Pulmão	++	Wittamer, V. et al, 2003 (a); Zhao Shen et al, 2011 (d), Pachynski et al, 2012 (a)
Fígado	+++	Nagpal, S. et al, 1997 (c); Wittamer, V. et al, 2003 (a), Lin W. et al, 2011 (a,d), van Poppel M.N.M. et al, 2014 (a), Chamberland J.P. et al, 2013 (a)
Baço	+	Nagpal, S. et al, 1997 (c), van Poppel M.N.M. et al, 2014 (a)
Pâncreas	++	Nagpal, S. et al, 1997(c), Chamberland J.P. et al, 2013(a); Zabel, B.A et al, 2005a (h)
Intestino delgado	+	Nagpal, S. et al, 1997(c), Maheshwari A. et al, 2009 (a,d)
Cólon	+	Nagpal, S. et al, 1997(c), Lin Y. et al, 2014 (a), Pachynski et al, 2012 (a), Zabel, B.A et al, 2005a (h)
WAT (**)	+++	Wittamer, V. et al, 2003 (a); Goralski, K.B. et al, 2007 (a) Barker G. et al, 2012 (a,f); Banas M. et al, 2015 (a,f)
BAT (***)	++	Wittamer, V. et al, 2003(a);
Rins	+++	De Palma G. et al, 2011 (a,d), van Poppel M.N.M. et al, 2014 (a)

## Continuação tabela 3...

Testículos	+	Wittamer, V. et al, 2003 (a), Chamberland J.P. et al, 2013(a)
Próstata	+	Nagpal, S. et al, 1997(c), Williams K., 2014 (g), Pachynski et al., 2012(a)
Ovário	+++	Nagpal, S. et al, 1997(c), Wittamer, V. et al, 2003(a), Wang Q. et al, 2012 (g), Chamberland J.P. et al, 2013 (a), Yamawaki H. et al, 2012 (a,f,g)
Placenta	+++	Carlino C. et al, 2012 (a,f), van Poppel M.N.M. et al, 2014 (a), Barker G. et al, 2012 (a,f)

As entidades celulares capazes de secretar a chemerina constitutivamente ou via indução por estímulos externos tipo IL-1 $\beta$ ; calcitriol, ácido all trans retinóico (ATRA), LPS, dentre outros são os queratinócitos, fibroblastos, adipócitos, condrócitos, mastócitos, as células endoteliais e as plaquetas. (NAGPAL et al., 1997 ; VERMI et al., 2005; KULIG et al., 2007; GORALSKI et al., 2007; KRALISCH et al., 2009; ALBANESI et al., 2009; BERG et al., 2010; CONDE et al., 2011; GONZALVO-FEO et al., 2014; BANAS et al., 2015).

A compreensão do mecanismo funcional das chemerinas é considerada complexa por causa de suas várias isoformas, sua expressão e ativação específica nos tecidos através de várias cisteína proteases e serina proteases provenientes da inflamação, coagulação e da cascata fibrinolítica que, em última análise, são responsáveis pelo equilíbrio entre as formas ativas e inativas de chemerina. (SYEDA; FÁTIMA et al., 2014; BONDUE et al., 2011).

### 1.3.2 Isoformas

A pré prochemerina humana, uma proteína inativa 163 aminoácidos com uma sequência de sinal N-terminal de 20 aminoácidos é precursora da prochemerina <sup>20-163S</sup>, uma proteína de atividade biológica baixa, ou quase nula, (EC<sub>50</sub> > 400 nM para ChemR23), de 143 aminoácidos (16kDa), com distribuição plasmática ubíqua e encontrada em concentração de 6-12 nM em condições basais em muitos tecidos humanos. Esta proteína representa 80% da chemerina total em um homem sadio. Suspeita-se que o fígado e o tecido adiposo branco sejam os principais produtores da prochemerina. (BONDUE et al., 2011; ZHAO et al., 2011). A partir de estímulos locais, a prochemerina <sup>20-163S</sup> é submetida a uma sequência de cortes enzimáticos no domínio C-terminal envolvendo serina proteases extracelulares relacionadas à coagulação (trombina, os fatores XII-A e VII-A), fibrinólise (plasmina, a uPA, tPA), e inflamação (a elastase, catepsina G, triptase) ou cisteína proteases relacionadas ao

recrutamento de células apresentadoras de antígenos (catepsina K e L). (WITTAMER et al., 2005; KULIG et al., 2011). Após os cortes, os fragmentos da chemerina e / ou suas isoformas com baixo peso molecular e diferentes perfis de bioatividade ficam imediatamente disponíveis para lançar sua ação quimioatratora no microambiente celular. (ZABEL, 2006) Aparentemente as chemerinas existem em quantidades inativas escassas em condições basais (3 - 4,4 nM), embora tenha sido também relatado que a proteína pode ser armazenada em grânulos de plaquetas de uma forma parcialmente ativada (SYEDA et.al., 2014; ZABEL, 2006; DU et al., 2009).

Originalmente é atribuído a chemerina um efeito quimioatrativo potente que levou muitos estudos a classificar chemerina<sup>157</sup> e a chemerina<sup>156</sup> como as isoformas de atividade mais elevadas, enquanto chemerina<sup>158</sup>, chemerina<sup>155</sup>, chemerina<sup>154</sup> e chemerina<sup>152</sup> (este último fragmento com funções desconhecidas) como isoformas de baixa ou nenhuma atividade (WITTAMER et AL., 2004; ZABEL et al., 2005; KULIG et al., 2007; DU; LEUNG, 2009; YAMAGUCHI et al., 2011; ZHAO et AL., 2011).

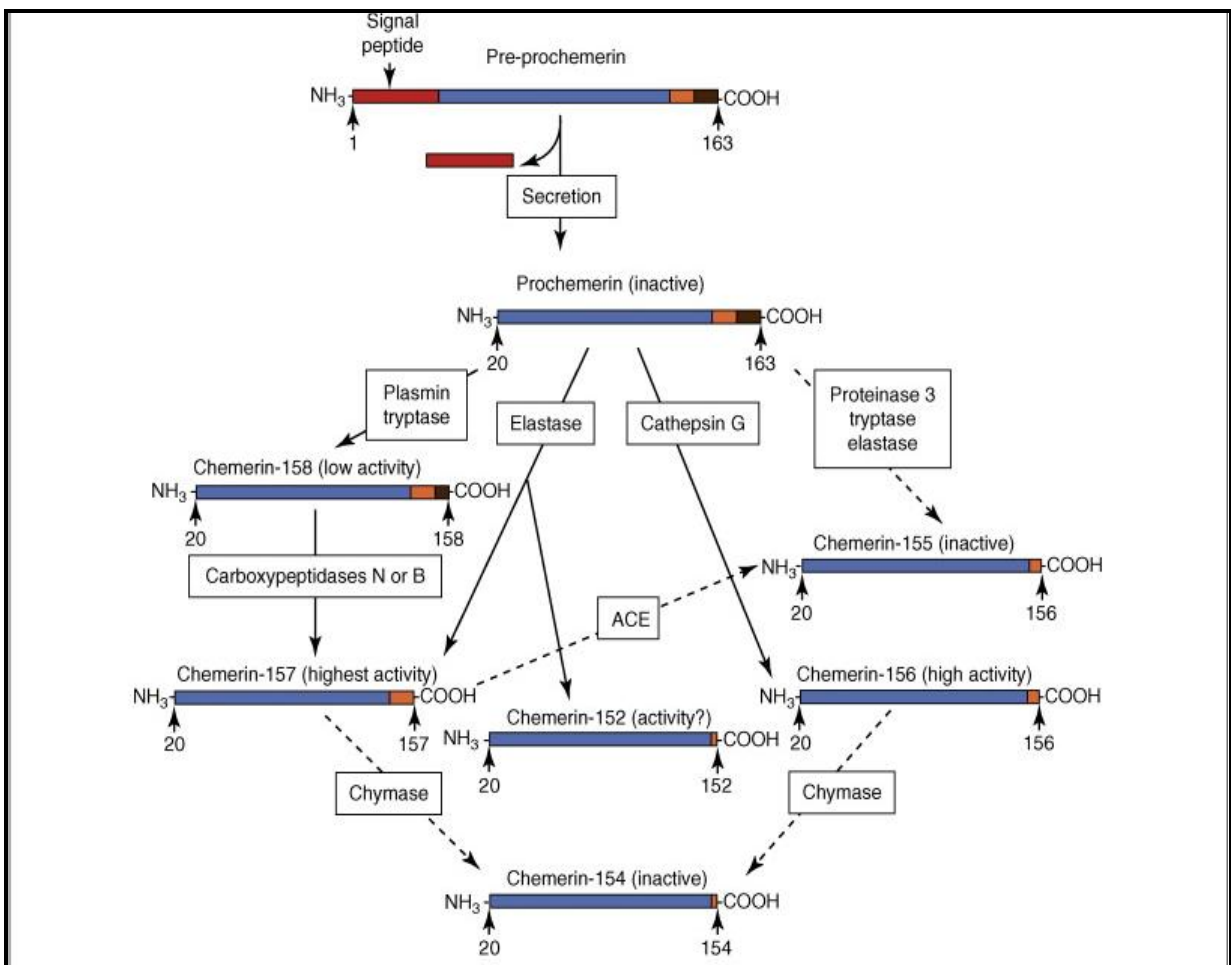
Estes achados reforçaram e corroboraram com outros estudos onde a bioatividade das isoformas não está estritamente interligada com o peso molecular do resíduo, mas principalmente relacionadas com o microambiente fisiológico das clivagens celulares como foi o caso da chemerina<sup>15</sup> (CASH JL. et al, 2008; CASH JL. et al, 2013) e o nonapeptídeo da chemerina<sup>9</sup> (<sup>149</sup>YFPGQFAFS<sup>157</sup>) com bioatividades comparáveis às isoformas chemerina<sup>157</sup> e chemerina<sup>158</sup> respectivamente. (WITTAMER et AL., 2004; SHIMAMURA et AL., 2009; YAMAGUCHI et al., 2011; ZHOU et al., 2014).

Os fragmentos Chemerin<sup>Ser157</sup> e Chemerin<sup>Arg125</sup> com suas sequências finais exercem efeitos antimicrobianos de amplo espectro. Os fragmentos foram investigados quanto ao seu potencial inibidor do crescimento contra *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Embora ambos tenham demonstrado ser menos potentes em comparação ao clássico peptídeo antibacteriano LL-37, as chemerinas suscitarão propriedades bactericidas em concentrações muito mais baixas (ZAIYOU et al., 2003; KULIG et al., 2011; BANAS et al., 2013; BANAS et al., 2015).

A figura 5 mostra as principais isoformas de chemerina originadas após a clivagem por proteases de serina típica e principalmente secretadas por neutrófilos (elastase, triptase e proteinase 3) e também por macrófagos e mastócitos (catepsina G e quimase) recrutados ao ambiente pró-inflamatório.

### 1.3.3 Receptores

Chemerina é um ligante constitutivo, de ação quimiotáxil, não pertencente às quimiocinas, que pode interagir e ativar três tipos de receptores celulares ao se fixar aos seus domínios transmembranares acoplados às proteínas: o receptor transmembranar de sete domínios acoplado a proteína G ou receptor 1 tipo quimiocina (CMKLR1) ou ChemR23; o receptor 2 tipo quimioquina (motivo C-C) (CCRL2) e o receptor 1 acoplado a proteína G (GPR1) (LEI LI et al., 2014; BONDUE et al., 2011).



**Figura 5: Processamento proteolítico da chemerina.** Chemerina é produzida como uma pré-pró-proteína, pré-pro-chemerin (1-163), que requer a clivagem N-terminal de um peptídeo de sinal de secreção, antes de ser segregada como uma proteína precursora inativa, pro-chemerin (20-163). Os números referem-se à posição do aminoácido terminal da proteína processada. Ex: R<sup>140</sup>AGEDPHSFYF<sup>150</sup>PGQF<sup>154</sup>A<sup>155</sup>F<sup>156</sup>S<sup>157</sup>K<sup>158</sup>ALPRS<sup>163</sup>, as setas sólidas representam vias de ativação; setas quebradas representam vias de inativação.

Fonte: Ernst; Sinal, (2010)

Uma vez que estes três receptores de superfície para chemerina têm sido extensivamente descritos na literatura, a tabela 4 resume as suas principais características até então descritas. Relevante ressaltar que o receptor multifuncional ChemR23 transduz efeitos anti-inflamatórios e pró-resolutivos dos peptídeos C-terminais da chemerina, através de dois outros ligandos: a C15 chemerina e o lipídeo Resolvin E1 (RvE1). Embora os estudos sobre RvE1 ainda sejam controversos, muitas pesquisas em andamento têm mostrado evidências da ação pró-resolutiva de RvE1.

Tabela 4: Aspectos gerais dos receptores de chemerina

Aspectos gerais dos receptores		ChemR23 <sup>36,37,38,41,48,50,51,52,54,55</sup>	CCRL2 <sup>53,54,55</sup>	GPR1 <sup>35,50,56</sup>	Referências
<b>BIOATIVIDADES</b>	Recrutamento de leucócitos à inflamação; quimiotaxia ; adipogênese; angiogênese metabolismo carboidratos- lipídeo		Concentra chemerina na superfície da célula via domínio N-terminal e dá suporte a sua apresentação via domínio C-terminal ao receptor ChemR23 da célula vizinha principalmente para a ativação de células NK	Receptores chamariz ou “decoy” (reconhecem certos fatores de crescimento com ↑ afinidade e especificidade, mas são estruturalmente incapazes de sinalizar ou apresentar o agonista à sinalização de complexos receptores	<b>CMKLR1</b> 8-Du XY, Leung, 2009; 11-Cash JL et al,2013; 15-Banas M.et al, 2013 ;36- Du XY.et al,2009; 37-Kulig P.et al, 2007 ; 38-Berg V.et al,2010 ; 41- Wittamer V.et al, 2004; 48-Becker, M.et al 2010;49- Mattern A. et al,2014;50- Zabel B. A.et al,2005; 51-Monnier J.et al,2012; 52-Zabel BA et al,2008 ; 54- Yoshimura T.et al, 2011;55- Huang J.et al, 2010;60- Ohira T.et al, 2010;61- Arita M.et al, 2005
<b>LOCUS CROMOSSOMIAL</b>	Região 12q.24.1	Região 3p.21-23	Região 2q.33.3		
	Elevada afinidade agonista para Chemerina	+++ EC <sub>50</sub> = 4.9 nM for Chem <sup>157</sup> (8)	+++ *EC <sub>50</sub> = 0.2 nM (53)	+++ EC <sub>50</sub> ~ 5.3 nM for Chem <sup>157</sup> (8)	
	tipo de célula imunitária, expressão do receptor versus tecidos humanos	e.g.iDCs,pDCs <sup>51</sup> , macrófagos residentes <sup>41</sup> , NK células, plaquetas, ECs,Neutrófilos <sup>11</sup> , fibroblastos, adipócitos, placenta, folículos ovarianos, cél. micróglia,osteoclastos, condrócitos, órgãos linfoides secundários <sup>60</sup>	e.g.mastócitos, macrófagos ativos, células Dendríticas, Neutrófilos, células T naïve, cél. TCD34+, cél. NK , ECs <sup>52</sup> ,tecidos linfóides, cél. de glioblastoma	Epidermis / Dermis, WAT, fígado, músculo esquelético, cél.tipo fibroblásticas derivadas do cérebro e tecido hipocampal	
<b>EVENTOS EXTRACELULARES</b>	Receptores relacionados <sup>36,50,55</sup>	C3aR, C5aR,DP2, fMLPR1-3,GPR32-33	CCR1, CCR2, CCR3, CCR5	C3aR, C5aR, fMLPR1-3	<b>CCRL2</b> 15-Banas M.et al,2013 ;36- Du XY.et al,2009; 50-Zabel B.A.et al, 2005; 52-Zabel BA et al ,2008;53-Del Prete A.et al,2013; 54- Yoshimura T.et al,2011 ;55- Huang J.et al,2010 ;61-Arita M.et al,2005
	Ligandos constitutivos secundários <sup>15,55,61</sup>	Lipid RvE1 <sup>61</sup> : ↓ citocina, ↓ produção de quimiocina e ↓ fagocitose através de PI3K/Akt – mTOR/rS6 C15 chemerin <sup>55</sup> : ↓ citocina, produção de quimiocina, ↓ fagocitose através Syk/ PI3K/Akt - mTOR/rS6 Afeta as interações subsequentes com β2-integrin-ICAM-1 <sup>15</sup> . ↑TGF-β, Promove reparo tecidual <sup>15</sup>	n.d	n.d	
	Pós ligação desencadeia a assoc. com β-arrestina 2	SIM	NÃO	YES	
	Pós ligação Receptor / Ligando leva a internalização	SIM	NÃO	YES	<b>GPR1</b> 8-Du XY, Leung, 2009 ; 15- Banas M.et al,2013 ;35- Bondue B.et al, 2011;36- Du XY.et al, 2009;50- Zabel B.A.et al,2005;56- Tönjes A. et al,2014;61- Arita M. et al,2005
<b>EVENTOS INTRACELULARES</b>	Pós ligação libera a secreção de Ca <sup>++</sup> Intracelular	+++	NÃO	+ <sup>36</sup> / Incerto <sup>35</sup>	
	Pós ligação inibe a acumulação de cAMP	SIM	n.d.	n.d	
	fosforilação MAPK ERK1/2	“Upregulation” ou regulações iniciadoras da via	n.d.	Fraca ativação ERK1/2 <sup>36</sup>	
	fosforilação PI3-k/Akt	“Upregulation” ou regulações iniciadoras da via	n.d.	n.d.	
	Sinalização p38 and NFκB	Downreg <sup>48</sup> : terminais da via / Upreg <sup>49</sup> : iniciais da via	n.d.	n.d.	



### **1.3.4 Aspectos pleiotrópicos na saúde e na doença**

Ao longo de mais de 25 anos de pesquisa sobre eixo chemerina / ChemR23, muitas evidências foram acumuladas para poder afirmar a sua participação em uma miríade de processos fisiopatológicos ligados à inflamação multifocal (promotor e/ou inibidor), presente na obesidade, no diabetes tipo 2, na asma alérgica, vários tipos de cânceres, doenças auto-imunes (doença de Crohn, lúpus, psoríase, artrite), aterosclerose, síndrome do ovário policístico (PCOS), no desenvolvimento gestacional, no Mal de Alzheimer (processamento e “clearance” de proteínas  $\beta$ -amilóides do tipo A $\beta$ 42) , colite ulcerativa e doença de Crohn e outros eventos biológicos de acordo com o seu local do corpo. (VERMI et al., 2005; BOZAOGLU et al., 2007; LUANGSAY et al., 2009; ALBANESI et al., 2009; VERMI et al., 2009; KAUR et al., 2010; WEIGERT et al., 2010; GAO et al., 2011; ZHAO et al., 2011; EISINGER et al., 2012; RUTKOWSKI et al., 2012; YAN et al., 2012; ROURKE et al., 2013; SYEDA et al., 2014; REVERCHON et al., 2014; WALUGA et al., 2014; MARIANI; RONCUCCI, 2015; BANAS et al., 2015; PENG et al., 2015).

As propriedades quiméricas da chemerina podem ser observadas a partir do seu desempenho e participação na defesa do hospedeiro das seguintes formas:

#### a) ação antiinflamatória

Estudos observaram que a proteína em sua isoforma chemerin<sup>141-155</sup> de 15 amino ácidos (chemerin15: AGEDPHGYFLPGQFA), originada da clivagem por proteases de cisteína, exerce efeitos antiinflamatórios em concentrações picomolares, inibindo o recrutamento de macrófagos e neutrófilos, reduzindo a expressão de mediadores pró-inflamatórios e trazendo melhora em modelo de inflamação peritoneal; (CASH et al., 2008; CASH et al., 2013);

#### b) ação pró-inflamatória

A isoforma chemerin<sup>157S</sup>, após clivagem da prochemerina<sup>163S</sup> por proteases de serina, exerce a função de atrator leucocitário para macrófagos, células dendríticas

(principalmente pDCs) e células NK. (“Natural killer”). Níveis significativos da chemerina ativa (chemerin<sup>157S</sup>) na concentração variando entre 33–358 ng/ml, foram encontrados por Wittamer V. et al.(2003) em diversos fluidos ascíticos de tecidos inflamados (ovário, fígado e líquidos sinoviais) comprovando a sua correlação com processos inflamatórios.

No contexto do tecido adiposo *In Vivo*, é muito provável que a secreção da chemerina por adipócitos maduros exerça um efeito pró adipogênico em células precursoras contribuindo assim para a expansão da massa de tecido adiposo e as alterações metabólicas sistêmicas indesejáveis, comuns da obesidade. (ROMACHO et al., 2014).

#### 1.3.4.1 Chemerina e a psoríase

Nestle et al. (2005) demonstrou, com uso de modelo xenógrafo de psoríase humana, que as pDCs, células naturalmente produtoras de IFN- $\alpha$  (tipo I), infiltravam-se na pele psorásica e secretavam esta citocina durante as fases iniciais da doença.

Diversas contribuições acadêmicas de diferentes grupos (WITTAMER et al., 2003; VERMI et al., 2005; PAROLINI et al., 2007), levaram Albanesi et al. (2009) à descoberta sobre a forte expressão da chemerina em queratinócitos e fibroblastos psorásicos humanos como fontes responsáveis pela atração e migração das pDCs ChemR+, oriundas dos órgãos linfóides secundários, para a região dérmica e epidérmica. Nestes locais, as pDCs desencadeiam a cascata imunológica das fases iniciais da psoríase através da secreção de citocinas IL-17 e IL-23, amplificadoras da doença. Queratinócitos, células endoteliais e fibroblastos dermais em pele inflamada secretam chemerina significativamente enquanto pDCs infiltrantes da pele expressam marcadamente o receptor ChemR23. (ALBANESI et al.,2009).

Neste contexto, é fundamental considerar a liberação de enzimas proteolíticas, tais como a catepsina G, elastase e triptase por neutrófilos ativados e quimase por mastócitos para conversão de prochemerina inativa (18KDa) em chemerina funcional (16KDa). (ERNST; SINAI, 2010).

Na epiderme humana sadia, chemerina é abundante e na derme é escassa. Já na psoríase este perfil é invertido reforçando o papel recrutador para pDCs ao se concentrar mais na derme psorásica. (NESTLE et al., 2005; ALBANESI, 2009; GIRONDI et al., 2013; LORA et al., 2013 ) Banas et al. (2015) demonstrou esta forma regionalizada de produção de chemerina por parte dos queratinócitos normais e psorásicos incluindo a expressão dos seus três receptores nas barreiras epiteliais, sugerindo que este tecido pode ser tanto uma origem como um destino para efeitos mediados pela chemerina.

Guzel et al. (2015), correlacionou positivamente os níveis séricos de chemerina e calprotectina (S100A 8 e 9) com a severidade da doença em estudo envolvendo 80 pacientes.(30 controles e 50 indivíduos com psoríase). Ao final, os pesquisadores demonstraram que os níveis de chemerina e calprotectina no grupo de pacientes psorásicos foram significativamente maiores do que no grupo controle ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente) e que os níveis chemerina e calprotectina nos grupos graves e moderados foram significativamente maiores do que no grupo neutro.

Considerando a importância epidemiológica mundial da psoríase assim como o uso clínico da fitoterapia como método terapêutico complementar alternativo no tratamento da doença, chancelado por instituições de alcance mundial como a ONU, o presente estudo propõe uma avaliação da bioatividade do extrato da *Aloe vera barbadensis* quanto ao seu potencial cicatricional e sobre a expressão das proteínas pró inflamatórias (chemerina e citocinas) em modelos experimentais *In Vitro* e *In Vivo*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos gerais

Avaliar comparativamente a bioatividade dos fitocompostos da *Aloe vera barbadensis* em modelo experimental murínico *In Vivo* mimético à psoríase humana e *In Vitro* com linhagens celulares humanas integrantes da pele.

### 2.2 Objetivos específicos

#### **2.2.1 Modelo *In Vivo* muríno Imiquimode – induzido mimético à psoríase humana**

- Reproduzir no modelo animal murino aspectos fenotípicos típicos da psoríase humana observando as modificações macroscópicas da pele no dorso do animal após a aplicação tópica do imunossupressor imiquimode;
- Avaliar a atividade bioenzimática de imunócitos pró-inflamatórios potencialmente presentes em biópsias de pele do dorso do animal após o tratamento tópico com creme a 70% de extrato seco liofilizado, concentrado à 200:1 de *Aloe vera*.(AVFDE).

#### **2.2.2 Modelo *In Vitro* de linhagens celulares humanas de queratinócito imortalizado (HaCat) e de fibroblastos dermais primários com e sem tratamento do extrato concentrado e dos fitoconstituintes de *Aloe vera***

- Avaliar a capacidade cicatricional de diferentes concentrações do extrato concentrado de *Aloe vera* (AVFDE) em modelo de cicatrização (Ensaio do Arranhão);
- Avaliar a viabilidade celular frente ao tratamento com giberelina em cultura de fibroblastos primários dermais humanos (hDF);

- Avaliar quantitativamente o poder de expressão das citocinas próinflamatórias IL-6, IL-8, MCP-1 em sobrenadante celular de culturas primárias de hDF, frente ao tratamento com diferentes concentrações do extrato concentrado (AVFDE) e dos cinco fitoconstituintes do *Aloe vera*;
- Avaliar quantitativamente os níveis de expressão de chemerina em sobrenadante celular de culturas primárias de hDF, frente ao tratamento com diferentes concentrações do extrato concentrado (AVFDE) e dos cinco fitoconstituintes do *Aloe vera*;
- Avaliar a expressão da citocina pró inflamatória IL-8 em sobrenadante de cultura celular primária de hDF 24 hr após tratamento com Calcitriol (Vit.D3) 1uM e com ácido all trans-retinóico (ATRA)5 uM;
- Avaliar a expressão da proteína chemerina em sobrenadante de cultura celular primária de hDF 24 hr após tratamento com Calcitriol (Vit.D3) 1uM e com ácido all trans-retinóico (ATRA)5 uM;
- Avaliar a expressão da proteína chemerina em sobrenadante de cultura celular primária de hDF após tratamento com Calcitriol (Vit.D3) 1uM por diferentes tempos de incubação (48 e 72 hr).

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Materiais

#### 3.1.1 Manejo de animais

Foram disponibilizados camundongos macho BALB/c (*Mus musculus domesticus*) com 30-34 dias de vida, pesando em média 28,93g, mantidos pelo biotério central do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais tinham livre acesso à ração e à água filtrada ad libitum. Os animais foram aclimatados em ambiente com ciclo de iluminação de 12 h (luzes acesas às 6:00 h) e temperatura controlada (20-25°C).

O manuseio, cuidado e experimentos foram realizados quando os animais atingiram a maturidade sexual, ou seja, 6-8 semanas de idade. O manejo dos animais transcorreu de acordo com os princípios éticos da pesquisa com animais estabelecidos pelo The Guide for Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council, 2011) and the “EC Directive 86/609/EEC”. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação e Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES- CEUA 061/2012).

#### 3.1.2 Reagentes e substratos

**Ensaio de MPO:** Brometo de hexadecil trimetil amônio (HTAB),; 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina (Ultra TMB® - Thermo),; ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), dihidrocloreto de O-Dianisidina (O-dianisidine - Sigma), Fosfato monobásico de potássio 50mM (6,8g /L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e Fosfato dibásico de potássio 50mM (8,7g /L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Nos **experimentos In Vivo** foram usados os seguintes fármacos nos animais: xilazina (Rompun® 2% sol injetável - Bayer), ketamina (Ketamina Agener 10% sol.injetável – União Química), Lidocaína 25 mg/g + Prilocaína 25 mg/g em creme (Emla® - Astra Zeneca), Imiquimode (Ixium® - Farmoquímica), creme à 70% de Aloe vera freeze dried extract 1:200 pó (produto manipulado), e betametasona

dipropionato 0,05% creme tópico (Laboratório EMS) e vaselina pastosa grau farmacêutico (LIFAR®).

Nos **experimentos In Vitro com linhagens celulares** foi feita uma revisão de literatura de onde foram selecionados 5 produtos químicos de maior significado farmacológico relacionados à categorias de fitofármacos componentes da planta *Aloe vera barbadensis Miller*. O ácido retinóico ou ácido all trans retinóico (ATRA) e o calciferol (VTD<sub>3</sub>) foram utilizados, após consulta bibliográfica, como estimulantes da produção e ou secreção da proteína chemerina, alvo deste estudo.

Todos os compostos químicos estão especificados na tabela 5 e suas concentrações equivalem a dose final por poço em placa de 6 poços:

**Tabela 5:** Descrição dos compostos químicos usados nos experimentos *In Vitro* para expressão da chemerina

Composto químico	Abrev	Conc	Solvente	Categoria farmacológica	CAS No.	Lote	Origem
<b>Acemannan</b>	ACM	250ug/ml 50ug/ml	Água Ultra pura	Polissacarídeo da família das Lectinas de ação imunomoduladora	110042-95-0	B15Z0411	BOC Sciences /USA
<b>Ácido giberélico 90% pó</b>	GA <sub>3</sub>	750uM 150uM 30uM	DMSO PA	Fitoesterol regulador morfo fisiológico de plantas	77-06-5	16GHZ94-1	TRC – Toronto Research Chemicals Inc./ Canadá
<b>Ácido retinóico</b>	ATRA	5uM	DMSO PA	Metabólico da vitamina A que agem como ligantes de receptores retinóicos do tipo RAR e RXR	302-79-4	SQN 01502 (01/09/15)	Cayman/USA
<b>Aloe vera freeze dried extract 200:1 pó concentrado</b>	AVFDE	1250ug/ml 500ug/ml 250ug/ml 50ug/ml	Água Ultra pura	Suplemento alimentar; ação antiinflamatório e cicatrizante dose dependente	8001-97-6	NC	JCB Jungconsult do Brasil Produtos Naturais Ltda
<b>Aloeresin A</b>	ALA	100uM 20uM	DMSO PA	Glicosil cromona de ação antioxidante e inibidor da $\alpha$ -glicosidase	74545-79-2	A00601	Adipogen/USA
<b>Aloesin ou Aloeresin B</b>	ALB	250uM 50uM	DMSO PA	Glicosil cromona de ação antioxidante, antiinflamatória e inibidor da tirosinase	30861-27-9	0449092-4	Cayman/USA
<b>Beta sitosterol</b>	BST	16uM 8uM 4uM	Álcool Etílico PA (EtOH)	Fitoesterol com ação imunomoduladora e antiinflamatória	83-46-5	0439526-16	Cayman/USA
<b>Calcitriol, Vit.D3 ou</b>	VTD <sub>3</sub>	1uM	DMSO PA	Hormônio ligado ao metabolismo e a absorção óssea	32222-06-3	0460879-15	Cayman/USA

1) Obs: Todos os produtos, exceto pelo AVFDE, foram adquiridos através distribuidor autorizado, Sapphire Bioscience Pty. Ltd. – NSW / Austrália.

2) Obs: a breve descrição farmacológica foi baseada nas fichas técnicas dos produtos disponível no site dos fornecedores

Legenda: NC - não consta; SQN – Sales Quote Number



### **3.1.3 Linhagens celulares primárias, imortalizadas, meios de cultura e suplementos**

#### *3.1.3.1 Linhagem celulares primárias*

Todas as células primárias foram obtidas criopreservadas em 2ª passagem, sendo seus lotes testados para os marcadores específicos do tipo celular, morfologia, tempo de duplicação da população, e capacidade de proliferação. Além disso, foram realizados ensaios para a ausência de HIV-1 / -2, VHB, VHC, HTLV-1 / -2, fungos, micoplasma, e outras bactérias. Todas as linhagens foram cultivadas em incubadoras estéreis a uma temperatura de 37°C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> em prateleiras internas da incubadora separadas das células imortalizadas. Para destacar as células e efetuar passagens foi usada a solução Triple Express® (Gibco) tanto para células 1ª ou imortalizadas.

- Fibroblastos dérmicos: Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF) adquiridos da PromoCell GmbH (Alemanha); isolados de pele adulta de diferentes locais como face, seios, abdômen ou coxa, contidas em um criotubo com 5x10<sup>5</sup> células e identificadas pelo CD 90 positivo. O meio de cultura adquirido da PromoCell foi o "Fibroblast Growth Medium 2" é isento de antibióticos e/ou antimicóticos, possui baixa concentração de Soro Fetal Bovino (SFB 2% V/V), Fator de Crescimento de Fibroblastos recombinante humano (rhFGF 1ng/ml) e Insulina recombinante humana (5ug/ml) específico para este tipo celular.

#### *3.1.3.2 Linhagem celulares imortalizadas*

- Células de queratinócitos humanos do tipo HaCat já expandidas no laboratório, identificadas como sendo de passagem No.14. O meio de cultura usado foi o RPMI 1640® (Gibco) suplementado com 5% de SFB (Gibco), complementado com mistura de penicillin 100U/mL + streptomycin 100 µg/mL (Sigma Aldrich) e 2 mM L-glutamine.(Gibco).

### 3.1.4 Equipamentos e softwares

Na tabela 6 estão descritos os principais equipamentos e softwares utilizados durante o desenvolvimento deste estudo:

**Tabela 6:** Descrição dos equipamentos chave usados nos experimentos *In Vitro*

<b>Descrição do Equipamento</b>	<b>Marca / Origem</b>
Citômetro de Fluxo mod. FACS Canto II	Becton Dickinson® / USA
Incubadora CO <sub>2</sub> estéril para cultivo de células 170Lt	Panasonic®/ USA
Cabine de Segurança Biológica Classe II (70% de recirculação e 30% de exaustão do ar) - Safemate ECO	EuroClone / Itália
Ultrafreezer – 80°C	Thermo® / USA
Microscópio óptico invertido 10X,20X, 40X - Trinocular	Nikon® / JAPAN
Centrífuga Refrigerada	Hettich® / Alemanha
Sistema de imagem digital p/ microscopia DSFi1 + DSL2	Nikon® / JAPAN
Espectrofotômetro / Leitor de ELISA CLARIOstar	BMG Labtech / Alemanha
CLARIOstar Software - MARS Data Analysis	BMG Labtech/ Alemanha
Contador automático de células - Countess®	Life Scientific / USA
Evolution 300 UV/VIS Espectrofotometro	Thermo/ USA
Agitador tipo gangorra Mod.SSL4	Stuart / UK

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Modelo experimental de indução da psoríase *In Vivo*

#### 3.2.1.1 Tricotomia e depilação dos animais

Foram constituídos 3 grupos com 3 animais em média por grupo, perfazendo um total de 09 animais. O modelo foi baseado no método original desenvolvido por Van der Fitts et al (2009) e reproduzido com pequenas alterações por Baek et al. (2012). Após uma semana de adaptação ao laboratório e ao manipulador dos animais, todos os 6 grupos foram submetidos a tricotomia feita à máquina após sedação do animal com Ketamina (125mg/Kg) e Xilazina (12,5mg/Kg) segundo Demoyer et al (2000) i.p. utilizando seringa hipodérmica Ultra Fine com agulha 29G.

A sedação foi monitorada com termômetro Infra Vermelho (I.R) e uso de manta térmica (Metalvet, Brasil) de modo a oferecer conforto para o animal e evitar o óbito por hipotermia. (DE BERNARDIS et al., 2009). Todos os animais foram raspados ao

longo de suas costas e o restante do pêlos foram completamente removidas com creme depilatório (Veet®, Reckitt Benckiser) (POWIS et al., 1976). (Figuras 6 e 7).



**Figura 6:** Uso de manta térmica durante a sedação do animal para dar conforto e evitar óbito por hipotermia. Fonte:acervo pessoal



**Figura 7:** Tricotomia seguida do uso de depilatório para avaliação do efeito de produto de uso tópico. Fonte:acervo pessoal

### 3.2.1.2 Coleta de sangue

Após a tricotomia foi feita uma coleta de sangue para avaliar o perfil leucocitário dos animais. A flebotomia foi opcional e não compunha um dos passos para mimetização experimental da psoríase. Para a coleta, foram retirados 20uL de sangue através de um pequeno “pique” com agulha 25 ou 26G na veia safena lateral / femural segundo método em literatura. (Hem, Smith & Solberg 1998; Janet Hoff - LVT – RLATG, 2000; Janis Ott Joslin - DVM, 2009) ([http://www.uib.no/vivariet/mou\\_blood/Blood\\_coll\\_mice\\_.html](http://www.uib.no/vivariet/mou_blood/Blood_coll_mice_.html)).

Este método não requer anestesia, mas sim uma boa contenção animal em flanela ou tubo cortado de seringa plástica descartável de 50ml. Uso-se vaselina (lubrificante) no local flebotomizado; o uso do anestésico tópico (tipo Emla®) foi opcional. Um torniquete montado pelo manipulador facilita a coleta realizada com uma ponteira de micropipeta ajustada em 20uL. Após a coleta, pressiona-se o local flebotomizado para acelerar cicatrização e retorna-se o animal para uma caixa separada para que não seja importunado pelos outros animais da caixa e sua recuperação seja mais tranquila. Com a amostra de 20uL, usou-se uma gota para fazer um esfregaço sanguíneo para posterior contagem diferencial de neutrófilos (método panótico) e o restante foi colocado em eppendorf contendo 200uL de

solução de Turk para visualização / contagem de leucócitos totais em câmara de Neubauer. (Fig 8-11).



**Figura 8:** Veia safena lateral após uso de depilatório.  
Fonte:acervo pessoal



**Figura 9:** Preparo antecipado de materiais utilizados na coleta de sangue do animal.  
Fonte:acervo pessoal



**Figura 10:** Uso da vaselina pastosa na flebotomia. Facilita a passagem do torniquete feito pelo manipulador e otimiza a coleta evitando perda do sangue.  
Fonte: Janet Hoff (2000)



**Figura 11:** Ponto de flebotomia feito com agulha fina 25 ou 26G na veia safena lateral após leve compressão do torniquete.  
Fonte: Janet Hoff (2000)

### 3.2.1.3 Indução do quadro fenotípico semelhante à psoríase

Após mais 24 horas de descanso para os animais, dá-se início ao tratamento indutor da doença. Todos os grupos de animais foram tratados por 6 dias consecutivos com doses tópicas diárias de 80 mg (contém 4mg do ativo) de Imiquimod Creme 5% (Ixium®; FQM, Brasil) aplicadas à tarde no dorso tricotomizado e depilado do animal. Imiquimod é um fármaco imunomodulador que ativa principalmente receptores do tipo Toll 7/8 e que suscita um quadro fenotípico semelhante a psoríase (hiperqueratose, eritema, coceira, descamação) como efeito adverso do fármaco. Em paralelo, todos os grupos, exceto o Grupo 2, receberam 12 horas mais

tarde, um tipo de tratamento farmacológico conforme descrição do desenho experimental na tabela 7.

**Tabela 7:** Desenho experimental do estudo *In Vivo*

GRUPOS IMQ 5% (80mg) Uso Vespertino	Tratamento farmacológico tópico Uso matutino	VEÍCULO	DOSE DIA / VIA ADM	EFEITO ESPERADO
<b>Grupo 0</b> Controle Positivo	Betametasona dipropionato 0,05%	*Creme: cera auto emulsificante não iônica, petrolato líquido, oleato de decila, propilenoglicol, mistura de parabenos simeticona e água purificada.	±100mg Via Tópica	Reversão dos efeitos do IMQ tópico
<b>Grupo 1</b>	Aloe vera extrato conc 1:200 pó (creme à 70%)	**Creme base do tipo Lanette (produto manipulado),	±100mg Via Tópica	Alvo do estudo
<b>Grupo 2</b> Controle negativo	----XX----	----XX----	----XX----	Controle

**Legenda:** \*A composição do creme está descrita na bula do produto

\*\*Os creme base do tipo Lanette são veículos cosméticos padrão, considerados inertes elaborados com ceras auto emulsificantes + Triglicérides do ácido cáprico (Ex:oleato de decila, estearato de octila) + propilenoglicol + conservantes (Ex:parabenos) + derivados de silicone (Ex: dimeticona)+ EDTA(opcional)+água purificada.(Zanin et al, 2001)

### 3.2.1.4 Eutanásia e coleta de material para análise histopatológica e demais análises

No sétimo dia os animais foram sacrificados por método físico (deslocamento cervical) após terem sido submetidos a um método químico complementar (exposição à altas concentrações de CO<sub>2</sub> sob condições controladas por 3-4 minutos ) conforme preconizado no CCAC (Canadian Council on Animal Care) " Guidelines on euthanasia of animals used in science"(2013).

As biópsias (baço e pele dorsal) foram removidos e armazenados em microtubo tipo eppendorf® que foi imediatamente colocado em Ultra freezer -80°C para análises posteriores. Para as análises histopatológicas, os tecidos de interesse foram fixados em solução tampão neutro de paraformaldeído à 10%, submetidas à desidratação, diafenização, impregnação e inclusão em parafina. Os fragmentos incluídos em parafina foram cortados em sessões de 4 - 5 µm utilizando-se micrótomo manual modelo Leica RM 212 RT (Leica Biosystems Nussioch GmbH, Alemanha).

As lâminas foram mantidas em estufa para secagem e os cortes posteriormente submetidos às análises histoquímicas e Imunohistoquímicas.

### **3.2.2 Ensaio da atividade enzimática da Mieloperoxidase (MPO)**

Os experimentos da atividade enzimática da MPO foram realizados no Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares (LABIOM / UFES). Foi empregado um protocolo baseado em métodos descritos em literatura. (HILLEGRASS et al., 1990; RAO; CURIE; SHAFFER e ISAKSON, 1993; DA SILVA, 2009; BENINCÁ, 2010; NOLDIN, 2011). As concentrações da atividade MPO foram estimadas por meio de espectrofotômetro Evolution® 300 UV/VIS de feixe duplo em faixa de absorbância de 520nm e 460nm, respectivamente.

O preparo das soluções estoque utilizadas no protocolo está descrito no anexo IV. A leitura resultante das amostras é interpolada à curva padrão e os resultados expressos em mU/mL. O ensaio consiste nos seguintes passos:

#### a) coleta das amostras

Para ensaio enzimático, foram biopsados e pesados 100 – 200mg de tecido (pele do dorso do camundongo) de cada Grupo e congelado imediatamente em gelo seco. Depois transferiu-se as amostras para o ultrafreezer -70°C até serem processadas. Há perda de aproximadamente 15% da atividade de MPO por semana à temp. de 20°C negativos;

#### b) Preparação das amostras de tecidos animais

Homogenizamos os tecidos com Polytron por 30 seg. - 1 min em tampão HTAB ( 50mg da amostra em 1ml HTAB) em um tubo falcon 15ml cortado ao meio. Os tubos devem permanecer todo o tempo em gelo. Pipetamos todo o homogenato ( ~1ml) p/ um eppendorf 1,5ml; agitamos em vórtex (15 seg) e centrifugamos (centrífuga de eppendorf) à temp. de 4°C 12.500 RPM (4.200g) por 15min (ou 13.000 RPM/10min). Os sobrenadantes obtidos foram submetidos a análise de atividade da MPO. Todas as amostras foram preparadas, centrifugadas em conjunto, mantidas geladas para então fazermos a leitura em espectrofotômetro;

c) análise da atividade da MPO

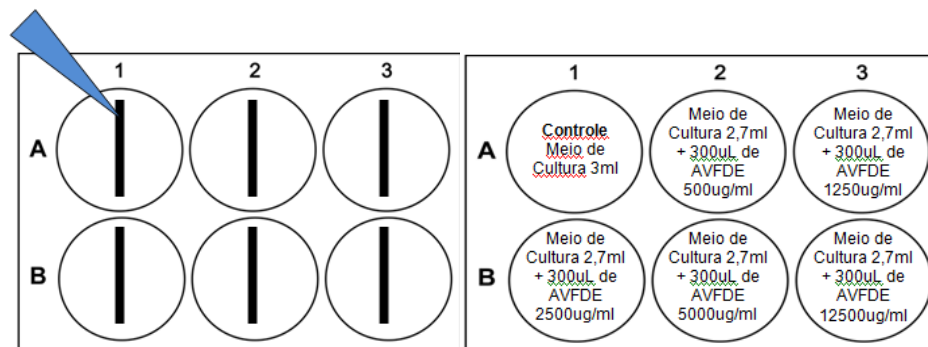
Zerou-se o espectrofotômetro de duplo feixe Evolution 300 UV/VIS Spectrophotometer utilizando 1,5ml de tampão substrato (branco) para faixa de leitura de 460nm com intervalos de 15seg por 10min por amostra.

Para cada amostra, pipetou-se um volume de 75µL do sobrenadante mantido resfriado à 4°C (banho de gelo) obtido na centrifugação e adicionou-se 1425µL de solução Orto Dianisidina 0,0167%. Leu-se IMEDIATAMENTE a amostra em 460nm sendo o resultado expresso em unidades de atividade da MPO (mD.O. por mg de proteína.).

### 3.2.3 Modelo Experimental In Vitro

#### 3.2.3.1 Scratch Assay ou ensaio do arranhão

Criou-se um arranhão com a ponta de uma ponteira azul ( $\pm 0,6\text{mm}$ ) em uma monocamada de células HaCat (Meio RPMI + 5% FBS + L-Glutamina + antibióticos) cultivadas à 37°C, 5% atm CO<sub>2</sub>, em placa de 6 poços, após as células terem atingido uma confluência entre 80-90%. Após o arranhão, lavam-se as células com PBS por 2 vezes seguido da adição de novo meio de cultura (3ml / poço). Parte-se então para os tratamentos farmacológicos com 5 diferentes concentrações da solução aquosa de Aloe vera extrato conc. 200:1 em pó liofilizado (AVFDE) recentemente preparada e filtrada em filtro biológico de 0,2 µm. A Figura 12 descreve o protocolo de tratamento utilizado:



**Figura 12:** Esquema da feitura do “arranhão” com uma ponteira azul para micropipeta de 1ml. Uso de placa de 6 poços indicando as condições de tratamento usadas por poço para as células HaCat após confluência 80-90%.

Ao final do tratamento os 6 poços contendo 3 ml cada, apresentam as seguintes concentrações finais:

Poço 1A - Controle – Meio de Cultura - sem tratamento

Poço 2A - 50ug/ml de solução aquosa de AVFDE 1:200

Poço 3A - 125ug/ml de solução aquosa de AVFDE 1:200

Poço 1B - 250ug/ml de solução aquosa de AVFDE 1:200

Poço 2B - 500ug/ml de solução aquosa de AVFDE 1:200

Poço 3B - 1250ug/ml de solução aquosa de AVFDE 1:200

É importante ressaltar que as placas de 6 poços estéreis são levadas para dentro da cabine biológica e são marcadas com três traços escuros equidistantes no fundo dos poços, externo à placa, para que sejam criados pontos de referência e observação ao microscópio enquanto monitoramos o fechamento da “ferida” ao longo do tempo.

Foi criada uma tampa especial que originou a patente desta tese. Esta melhoria tecnológica facilitou a feitura do arranhão e evitou a entrada de material potencialmente contaminante para a cabine de cultura (régua, caneta marcadora).

A mudança na área de superfície da “ferida” ou arranhão é medida em três pontos diariamente entre os grupos tratados e não tratados ao longo do tempo. Imagens fotográficas digitais são obtidas nos mesmos três pontos de referência eleitos inicialmente à 0hr, 12hr, 24hr, 36hr e 48 horas; ou até observar-se ao microscópio o fechamento completo da “ferida” do poço controle.

Após a aquisição de todas as imagens, a área da superfície de cada arranhão é medida e delineada por dois observadores cegos independentes (para o grupo de tratamento) utilizando um software (Image J por exemplo) ou medindo foto à foto os espaços dos intervalos das fendas ao longo dos tempos registrados. A área da superfície de cada região da ferida na monocamada de células é então transformada em um quadrado de área de superfície igual, e a média do comprimento linear de cada quadrado é comparado entre os grupos ao longo do tempo. A taxa de fechamento é quantificada e comparada entre os grupos para a análise estatística.

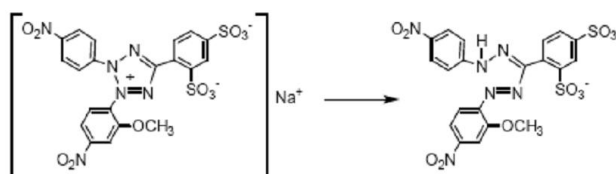


### 3.2.3.2 Ensaio de Viabilidade celular

Utilizamos para este ensaio o Kit 8 de Contagem Celular ou CCK-8 (Sigma Aldrich) onde o princípio baseia-se na reação de um sal de tetrazólio altamente solúvel em água, conhecido como WST-8 ou [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazólio monossódico. O sal é reduzido na presença de um transportador de elétrons, como as desidrogenases celulares, dando formação a um sal de formazan de cor amarela alaranjada, solúvel em meio de cultura conforme reação mostrada na Figura 13. A intensidade do corante formazan gerado pela ação das desidrogenases é diretamente proporcional ao número de células viáveis.

A cor gerada pela formação do WST-8 formazan foi mensurada por um espectrofotômetro (CLARIO Star) na faixa de absorção de 450nm.

O limite de sensibilidade deste ensaio segundo o fabricante é maior que outros sais de tetrazólio como o MTT, XTT, MTS ou WST-1.

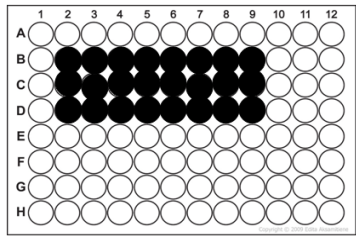


**Figura 13:** Estrutura química do WST-8 e o sal WST- 8 / formazan (amarelo alaranjado)

O protocolo realizado assemelhou-se as orientações do fabricante, exceto por poucas alterações como o número de células dispensadas por poço em placa de 96 poços. O ensaio dura 3 dias iniciando da seguinte forma:

- Após atingir confluência de 80-90% na cultura 1ª de fibroblastos dérmicos, fez-se uma contagem celular utilizando o Countess® (Life Scientific) de modo a obter  $2 \times 10^4$  células por 100 uL. Este volume é transferido para a placa de 96 poços utilizada no ensaio;
- Pré-incubação da placa durante 24 hrs em incubadora umidificada a 37°C temperatura e 5% CO<sub>2</sub>;

- Adicionou-se 10 ul de várias concentrações de Giberelina e os respectivos controles conforme esquema descrito na Figura 14 abaixo:



Coluna 2 B-D	Coluna 3 B-D	Coluna 4 B-D	Coluna 5 B-D	Coluna 6 B-D	Coluna 7 B-D	Coluna 8 B-D	Coluna 9 B-D
Meio de Cultura + células	Meio de Cultura + DMSO 0,1%	Meio de Cultura	Meio de Cultura + DMSO 0,1% + células	Meio de Cultura + DMSO 0,1% + células	Meio de Cultura + DMSO 0,1% + células	Meio de Cultura + DMSO 0,1% + células	Meio de Cultura + DMSO 0,1% + células
Sem tratar	Sem tratar	Sem tratar	Sem tratar	GB 750uM	GB 150uM	GB 30uM	GB 6uM

**Figura 14:** Desenho da placa de 96 poços para realização do ensaio de viabilidade celular CCK-8

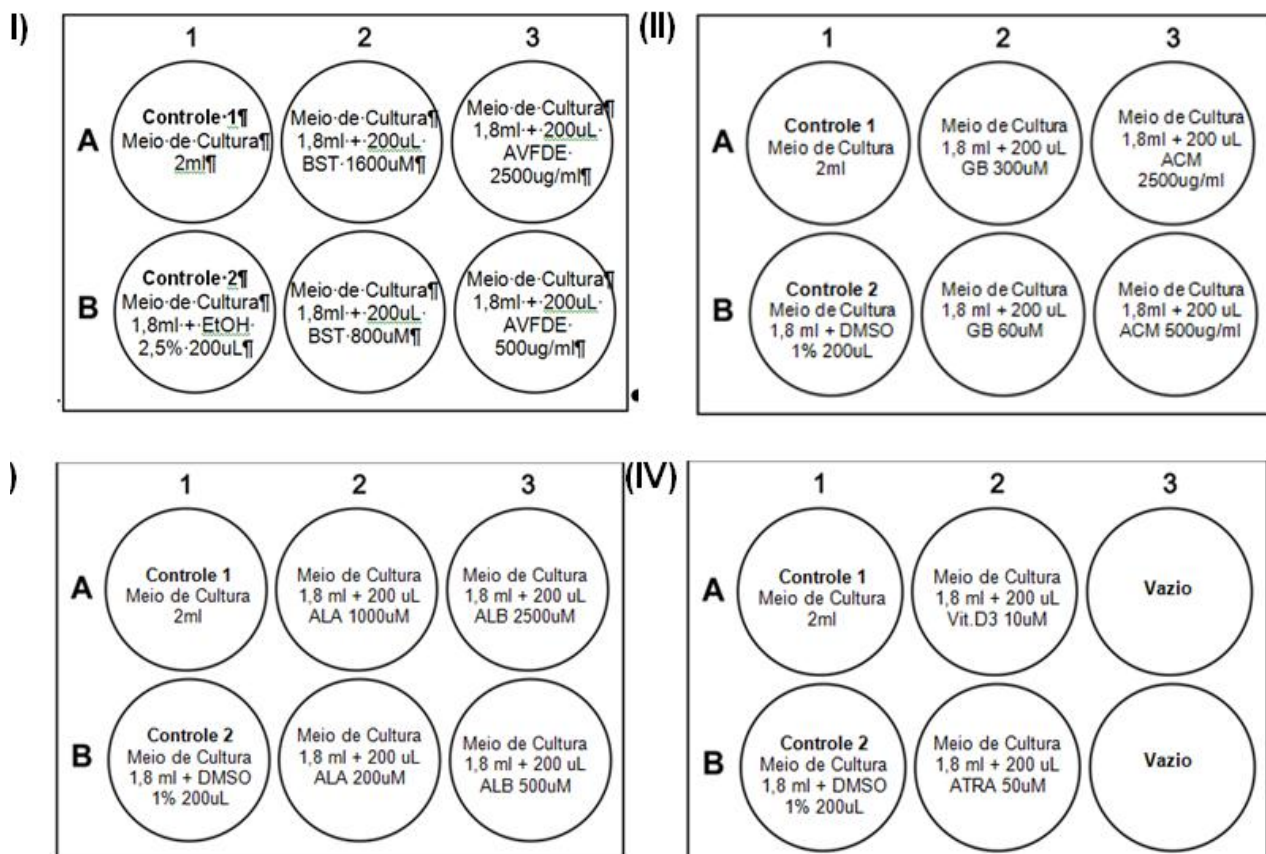
- Incubação novamente a placa durante 24 hrs ( 37°C / 5% CO<sub>2</sub>);
- Descongelou-se o CCK-8 sobre o topo da bancada ou num banho de água a 37°C, se congelado. Nota: Foi necessário cerca de 30 minutos sobre o topo da bancada, a 25°C ou 5 minutos em banho-maria a 37 ° C;
- Adicionou-se 10 uL de solução de CCK-8 para cada uma das cavidades da placa na 23<sup>a</sup> hora para que ao final das adições estará próximo de completar 24 horas de tratamento. Tenha cuidado para não introduzir bolhas aos poços, uma vez que estes interferem na leitura de densidade ótica (D.O.);
- Incubação da placa por 1 hora e feita a leitura em espectrofotômetro ajustado em 450nm (faixa de absorção).

### 3.2.3.3 Estudo de expressão da proteína chemerina

Para a investigação da expressão da proteína chemerina foram utilizados Fibroblastos Dérmicos Humanos adultos Normais (NHDF) adquiridos da PromoCell GmbH (Alemanha), cultivados em meio de cultura especial com baixa concentração de Soro Fetal Bovino (SFB 2% V/V) , Fator de Crescimento de Fibroblastos ( rhFGF 1ng/ml), Insulina recombinante humana (5ug/ml), isento de antibióticos e/ou antimicóticos adquirido da mesma empresa acima citada.

As células eram incubadas à temperatura de 37°C / 5% CO<sub>2</sub> e tinham o meio trocado a cada 3 dias até atingirem uma confluência de 80-90% do frasco T-75 equivalente à aproximadamente 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> células / ml.

A partir da confluência, placas de 6 poços eram preparadas e no 5<sup>o</sup> ou 6<sup>o</sup> dia as placas estavam prontas (confluência de 80-90%) para serem tratadas com as substâncias químicas pré-selecionadas constituintes do Aloe vera, previamente preparadas em seus respectivos solventes conforme mostrado na seção “Materiais”. Os compostos químicos foram deixados por 24 horas em contato com a cultura para em seguida os sobrenadantes serem centrifugados, recolhidos em tubos de centrifugação de 1,5ml e armazenados à -20°C até a realização do ensaio de ELISA. As Figuras 15(I-IV) descrevem o protocolo utilizado para tratamento dos fibroblastos dérmicos confluentes em placas de 6 poços:



**Figura 15:** (I) Controle 1 (CT1) para AVFDE, CT2 (Álcool etílico solução 2,5%) para betasitosterol (BST) e demais poços tratados com diferentes concentrações de BST e AVFDE; (II) CT1 para Acemannan (ACM), CT2 para dimetilsulfóxido (DMSO) solução 1% para giberelina (GB) e demais poços tratados com diferentes concentrações de ACM e GB; (III) CT1 (Meio de cultura), CT2 (DMSO 1%) para ALA / ALB e demais poços tratados com diferentes concentrações de ALA e ALB; (IV) CT1 (Meio de cultura), CT2 (DMSO 1%) para VitD3 1uM / ATRA 5uM e demais poços vazios

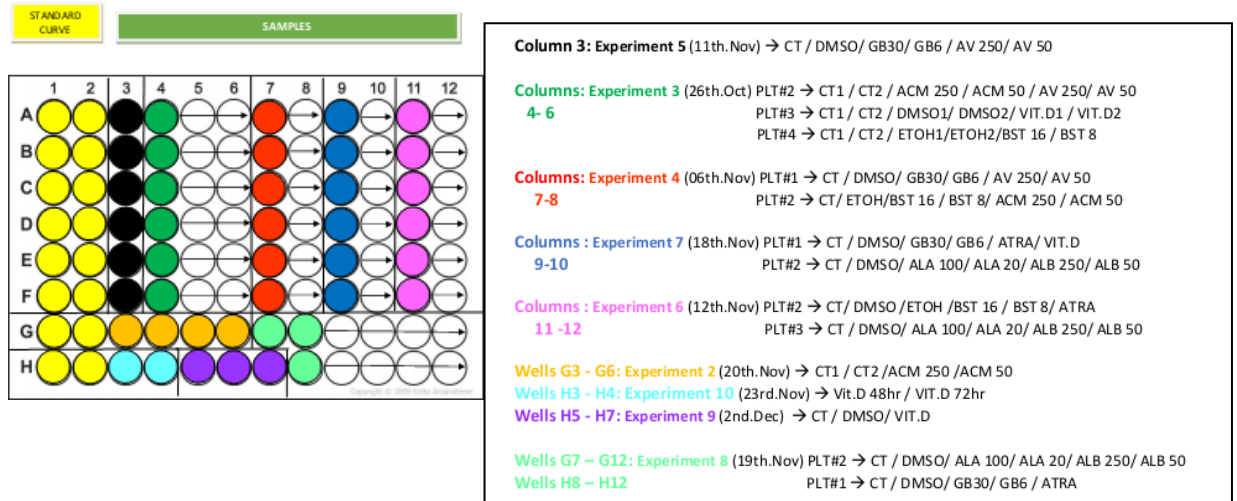
Ao final do tratamento os poços contendo 2 ml cada, apresentam as seguintes concentrações finais:

CT 1	Meio de Cultura - sem tratamento
CT 2	DMSO 0,1% dissolvido em meio de cultura ou;
CT 2	EtOH 0,25% dissolvido em meio de cultura
BST	16uM e 8uM
GB	30uM e 6uM
ACM	250ug/ml e 50ug/ml
AVFDE	125ug/ml e 50 ug/ml
ALA	100uM e 20uM
ALB	250uM e 50uM
VitD3	1uM
ATRA	5uM

#### 3.2.3.4 Ensaio de imunoadsorção ligado à enzima (ELISA) em sobrenadante celular

Após 24 horas de tratamento com os fitocompostos da Aloe vera, 1ml dos sobrenadantes celulares foram recolhidos, centrifugados por 3 minutos a 2500 RPM / 23°C, armazenados em microtubos rotulados à -20°C. Para investigar a potencial secreção da chemerina foi utilizado um Kit Quantikine® (ELISA R&D Systems/USA) contendo o anticorpo humano da Chemerina. Este kit foi selecionado devido a sua sensibilidade que detecta a presença da chemerina na faixa de 78pg/ml até 5000pg/ml. Foi utilizada uma placa de poliestireno com 96 poços , tratadas para proporcionar alta capacidade de ligação do anticorpo (Thermo Scientific Pierce® Clear 96-Well Microplates) especial para este ensaio.

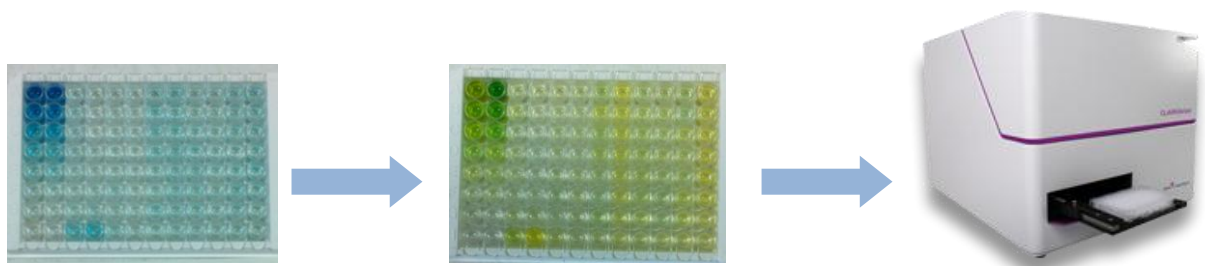
A figura 16 mostra o desenho de distribuição das soluções padrão em duplicata e das amostras teste em uma única replicata , realizado 24 hr antes do ensaio.



**Figura 16: Desenho da placa do ensaio de ELISA.** Distribuição das sol.padrão de chemerina em duplicata e das amostras teste em uma única replicata acompanhado da legenda das cores indicando 3 experimentos independentes

- 1-21 por poço;
- A seguir, 50uL das soluções padrão e dos controles foram adicionados, a placa lacrada e incubada por 2 horas à temp. ambiente em agitador orbital à 500RPM volume de 150uL dos sobrenadantes da amostra foi pipetado seguindo a distribuição correta das amostras. Após a pipetagem, a placa foi armazenada em freezer -80°C;
- No 2ºdia do ensaio foram preparadas as soluções padrão, as soluções tampão, controles e os reagentes. Após descongelamento total das amostras foram retirados 100uL de cada poço e adicionados 100uL da solução diluente RD RPM;
- Após o período os poços foram aspirados e lavados 4x com solução tampão (100uL cada). Na última limpeza para retirada do tampão a placa foi invertida e seca em papel toalha;
- 200uL do conjugado de chemerina foram adicionados a cada poço, a placa foi novamente lacrada e incubada por 1 hora à temp. ambiente em agitador orbital à 500 RPM;

- Repetiu-se os passo da aspiração e das lavagens;
- 200uL da solução substrato foram adicionados aos poços e a placa incubada por 30 min à temp. ambiente protegida da luz;
- Desenvolveu-se cor azul que foi modificada para cor amarela quando adicionou-se 50 uL por poço de solução de parada. (Figura 17);
- O ensaio ELISA foi realizado mediante a instrução do fabricante (R&D System) e e após 30min. a placa foi lida em espectrofotômetro, em dois comprimentos de onda: 450 nm e 570 nm. Este último para corrigir as imperfeições óticas da placa e deve ser subtraído da leitura em 450nm.



**Figura 17:** Leitura do ensaio de ELISA. Identificação de chemerina em sobrenadante de cultura primária de fibroblastos dérmicos humanos após tratamento químico. Reação colorimétrica em azul que é interrompida pela solução de parada originando cor amarela. A Leitura espectrofotométrica em dois comprimentos de onda: 450 e 570nm.

### 3.2.3.5 Deteção de quimiocinas e citocinas

#### 3.2.3.5.1 Citometria de Fluxo

Após 24 horas de tratamento com os compostos químicos da planta Aloe vera, 1ml dos sobrenadantes celulares foram recolhidos, centrifugados por 3 minutos a 2500 RPM / 23°C, armazenados em microtubos rotulados à -20°C. Para investigar citocinas e quimiocinas potencialmente secretadas no sobrenadante de fibroblastos dermais primários foram utilizados os kits para quimiocinas humanas MCP-1/CCL2, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\beta$ /CCL4, MIG/CXCL9, G-CSF (Human Chemokine 6plex - Bender Med Systems / Austria); para citocina humana IL-6 (BD OptEIA® human IL-

6 ELISA kit, BD Systems/USA) e para a quimiciana RANTES/ CCL5 (BD OptEIA® human RANTES ELISA kit, BD Systems/USA).

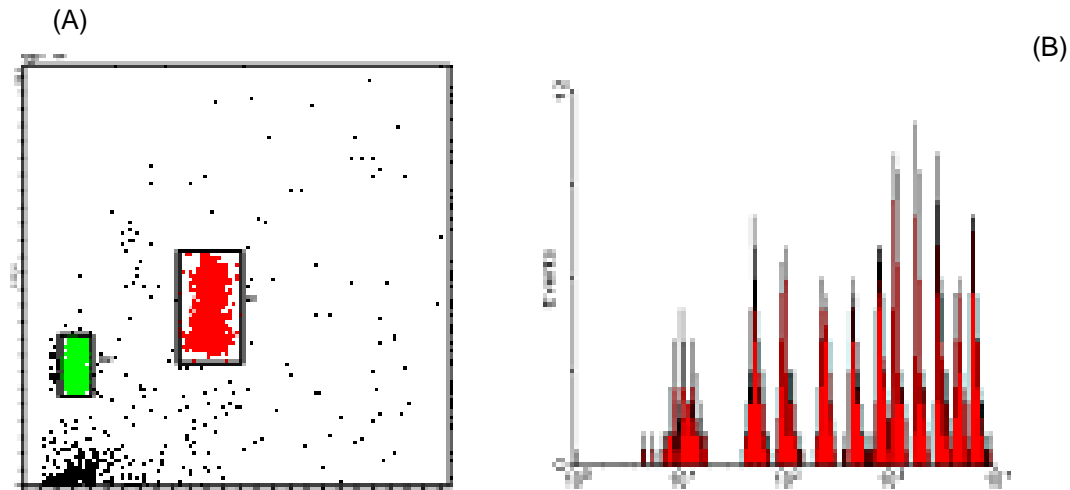
O “lay-out” de distribuição das soluções padrão em duplicata e das amostras teste em uma única replicata foi realizado 24 horas antes do ensaio conforme mostra figura 16. Apenas as amostras teste (150uL) foram pipetadas para os poços.

As placas foram armazenadas, seladas e rotuladas em freezer -80°C.

No 2º dia do experimento, foram rotulados 96 tubos falcon de 5ml (BD Systems), próprios citometria, seguindo a posição de distribuição das amostras na placa previamente preparada.

- Preparou-se o tampão, o conjugado de biotina, a mistura de esferas marcadas (“beads”) e os padrões conforme indica o kit do fabricante;
- Um volume de 100uL da solução tampão multiplex foi pipetada a cada um dos 96 poços após total descongelamento da placa. Homogenizou-se mistura;
- A placa foi incubada por 30 minutos à 4°C e em seguida 200uL da solução são retransferidos da placa para cada um dos tubos rotulados conforme poço referência.

Para o preparo dos tubos padrão foi seguido o manual do fabricante. Por último adicionou-se 500ul do tampão e feita a leitura em citômetro FACS Canto II Becton Dickinson® / USA). As esferas contendo os anticorpos marcados possuem características que permitem suas leituras individuais dentre até 20 diferentes analitos em um único canal do citômetro (690nm) conforme mostram os histogramas da figura 18 (A-B):



**Figura 18; Histogramas da citometria de fluxo: (A)** Tamanhos das esferas A = 5,5 $\mu$ m e B = 4,4 $\mu$ m ao serem lidas no citômetro; (B) : Histograma dos diferentes Intensidades do Fluorocromo interno (Ficoeritrina = PE) por analito marcado

Assim a marcação com um único Fluorocromo (Streptavidina – Ficoeritrina) permitiu a identificação dos seguintes anticorpos conforme mostra a tabela 8 :

**Tabela 8:** Especificação dos anticorpos utilizados para detecção de citocinas e quimiocinas inflamatórias por citometria de fluxo utilizando a Streptavidina – Ficoeritrina como único fluorocromo

Especificidade do Anticorpo	População de esferas	Clonalidade
h G-CSF	A11	Monoclonal
h IL-8	A10	Policlonal
h IL-6 (BD OptEIA (BD Systems/USA)	nd	Monoclonal
h MCP-1	A7	Monoclonal
h RANTES/ CCL5 (BD OptEIA® (BD Systems/USA)	nd	Monoclonal
h MIG	B4	Monoclonal
h MIP-1 $\alpha$	A9	Policlonal
h MIP-1 $\beta$	A5	Policlonal

Os anticorpos marcados foram analisados utilizando um programa FACScan (Becton&Dickinson) e o programa da software Cell Quest.



### *3.2.3.6 Repetição do Ensaio de imunoadsorção ligado à enzima (ELISA) em sobrenadante celular*

Após 24 horas de tratamento com os compostos químicos da planta Aloe vera, 1ml dos sobrenadantes celulares foram recolhidos, centrifugados por 3 minutos a 2500 RPM / 23°C, armazenados em microtubos rotulados à -20°C. Para investigar a potencial secreção da quimiocina humana CXCL12 ou SDF-1 (Fator 1 Estromal derivado de célula) foi utilizado o kit DuoSet® (ELISA R&D Systems/USA) e o anticorpo humano da Chemerina (Quantikine® ELISA R&D Systems/USA).

Este kit foi selecionado devido a sua sensibilidade que detecta a presença da CXCL12 na faixa de 31,3pg/ml até 2000pg/ml.

O protocolo seguido foi de acordo com o manual do fabricante.

A placa com os sobrenadantes acompanharam o mesmo “lay out” de distribuição das amostras do ensaio com a chemerina e não necessitaram ser diluídos. Foi utilizada uma placa de poliestireno com 96 poços, tratadas para proporcionar alta capacidade de ligação do anticorpo (Thermo Scientific Pierce® Clear 96-Well Microplates) especial para este ensaio. As amostras foram distribuídas na placa no dia anterior ao ensaio que foi conduzido conforme a seguir:

- Os passos de cobertura Cobertura ou “coating” da placa com solução tampão recentemente preparada (passo limitante); as lavagens, o bloqueio com solução de BSA 0,1% em PBs recém preparados, adição da solução substrato e da solução de parada foram conduzidos conforme as instruções do fabricante;
- Segundo as instruções do fabricante (R&D System) a placa foi lida imediatamente em espectrofotômetro utilizando dois comprimentos de onda: 450 nm e 570 nm. Este último para corrigir as imperfeições óticas da placa e deve ser subtraído da leitura em 450nm.

### **3.2.4 Análise estatística**

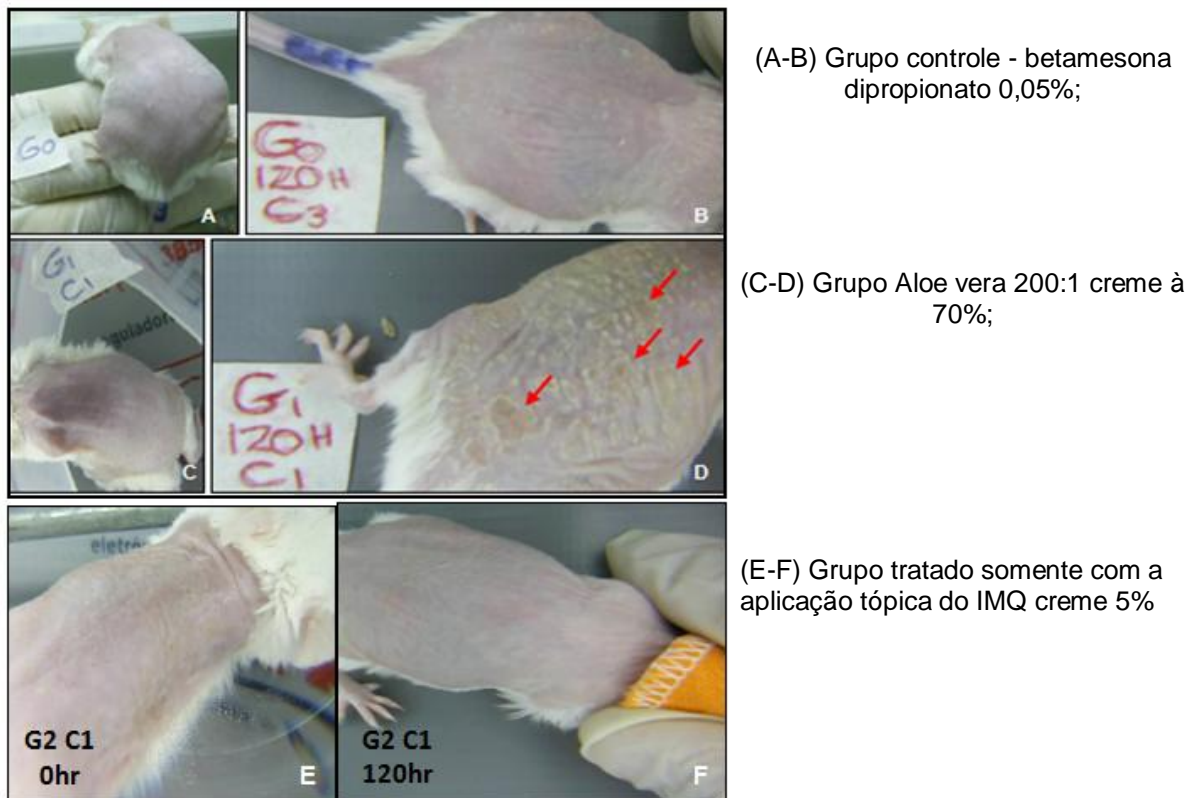
Para as análises estatísticas foram utilizados os valores de média e desvio padrão ( $\pm$  SD). A comparação entre grupos no ensaio de cicatrização foi realizada através do teste estatístico ANOVA de duas vias seguido do teste post hoc de Bonferroni. Os demais experimentos utilizaram o teste ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey. Um  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo e um  $p < 0,01$  foi considerado altamente significativo.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Modelo *in vivo*

#### 4.1.1 Aspectos macroscópicos da pele do dorso do modelo murino semelhante ao fenótipo psorásico em humanos

Após a indução da psoríase segundo o protocolo do modelo experimental que utiliza o imunomodulador imiquimode (IMQ) as seguintes imagens foram obtidas após o 5º dia (120horas) de tratamento tópico do dorso dos animais (figura 19 A-F).



**Figura 19:** Imagens feitas nas primeiras 24 hr após a depilação de todos os animais e após 120 hr de tratamento vespertino com IMQ 80mg (exceto G2) e matutino com as substâncias investigadas, o controle betametasona e o grupo não tratado conforme descrito na tabela 11.

Fonte: fotos do autor.

Esperava-se que o grupo tratado somente com o imiquimode desenvolvesse uma hiperqueratose mais severa (Grupo 2). Ao contrário, em todos os animais deste grupo, este efeito foi praticamente nulo. Durante os preparativos técnicos, prévio ao experimento oficial, o mesmo procedimento com o imiquimode sobre o dorso de

camundongos elicitou uma resposta mais pronunciada em relação ao efeito hiperqueratótico. Por não dispor de um número maior de animais utilizamos os dados do experimento oficial onde o efeito adverso da hiperqueratose causado pelo uso tópico do imiquimode não se manifestou no grupo esperado (Grupo 2).

Os efeitos adversos observados após a aplicação tópica de IMQ 5% em seres humanos levam em conta uma extensão relativamente baixa da absorção tópica de doses do fármaco estimada em menos de 0,6% em qualquer indivíduo. Este índice foi medido através do nível de extensão de recuperação urinária do imiquimod e seus metabólitos como método de avaliação da biodisponibilidade após o uso tópico do fármaco (HARRISON et al., 2004) . A baixa absorção percutânea do fármaco em pele de camundongo somada a outros fatores desconhecidos pode ter também contribuído para não observação da esperada hiperqueratose nos animais tratados somente com o Imiquimode.

O Grupo 1 tratado com aloe vera ext concentrado 200:1 em creme 70%, desenvolveu, inesperadamente alguns sinais de hiperqueratose. Infere-se que o creme com o extrato concentrado à 70% não suplantou o efeito adverso parcialmente elicitado pelo imiquimode quando comparado ao tratamento padrão com betametasona (G0). É importante considerar que o produto utilizado foi um preparado magistral, podendo este ter também corroborado para a eliciação do efeito hiperqueratótico. Vários fatores inerentes à formulação tais como: a correta concentração (70%) do extrato AVFDE incorporado no creme; os tipos e concentrações de coadjuvantes farmacotécnicos utilizados no preparo da fórmula; a estabilidade do ativo durante os dias da aplicação ( tonalidade marrom clara inicial que sofre uma leve alteração com o passar dos dias); ou ainda a soma deste e de outros fatores podem também ter influenciado na eficácia do produto manipulado.

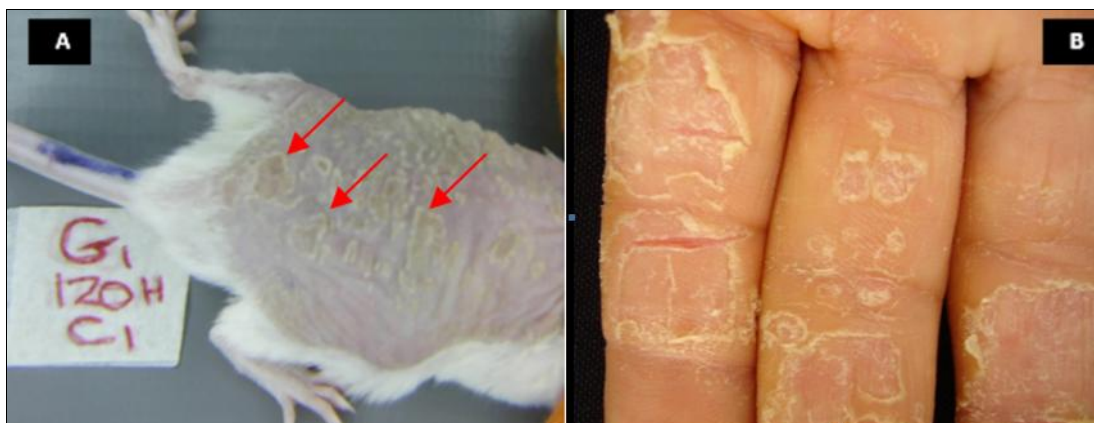
A hiperqueratose parcial pode ainda ter sido causada por um tipo de irritação dérmica causada pela elevada concentração do extrato concentrado em creme quando aplicado em camundongos. Isto porque durante o experimento, observou-se que logo após a aplicação tópica do creme à 70% os camundongos demonstravam reações de desconforto, emitindo sons e fazendo pequenas corridas nos momentos iniciais da aplicação do creme. No artigo usado como referência, Choonhakarn et al.

(2010) obteve sucesso ao comparar o uso tópico da triamcinolona 0,1% (corticoide de alta potência, um nível abaixo da betametasona dipropionato 0,05%). e o creme com extrato mucilaginoso à 70% em pacientes humanos. Logo, considerando que o extrato utilizado no presente experimento era do tipo concentrado 200:1 e que este foi aplicado sobre o dorso de camundongos, é também possível que os efeitos irritativos tenham sido causados pela alta concentração dos fitoativos contidos no extrato concentrado 200:1 de Aloe vera.

Já o Grupo 0, controle positivo (doença não manifesta) tratado com betametasona dipropionato 0,05%, resultou um efeito esperado de não manifestação da doença, já que o corticóide de alta potência utilizado (1ª escolha nos tratamentos de psoríase leve a moderada), inibe os efeitos adversos hiperqueratóticos semelhantes à psoríase causados pelo imiquimode. Mesmo assim, sugere-se a repetição do experimento com a adição de mais um grupo tratado somente com creme base lanete®, para que os efeitos nulos (não manifestação da doença) sejam devidamente comparados.

As figuras 20(A-B) mostram aspectos semelhantes da hiperqueratose humana em psoríase palmar e a hiperqueratose sucitada no modelo murino IMQ induzida durante o experimento.(Grupo 1, camundongo 1, 5ºdia do experimento).

O efeito de pele “enrugada” observado em um dos grupos de animais sugere uma hiperproliferação causada pelo efeito adverso do fármaco IMQ. *In Vivo*, este efeito sobre os queratinócitos , leva a produção de várias citocinas pró-inflamatórias., dentre as quais o TNF $\alpha$  que é o alvo terapêutico mais visado no tratamento das manifestações moderadas à severas da psoríase



**Figura 20:** (A) Animal com descamação da pele após 5ºdia de tratamento (B) hiperqueratose e descamação típica da psoríase palmar humana. Fonte: Camundongos No.1 / G1 (Aloe vera ext conc. 200:1 creme á 70%), foto nº256 do autor.Psoríase palmar URL: <http://www.adrianaschmidt.com/kb/index.php?a=55>

#### ***4.1.2 A atividade bioenzimática de neutrófilos medida em pele imiquimode (IMQ) induzida do dorso do modelo murino com fenótipo semelhante à psoríase***

Conforme pode ser observado na figura 21, o grupo zero (G0) tratado com um dipropionato de betametasona 0,05% apresentou níveis de atividade da MPO mais reduzidos quando comparado ao controle (G2) sem tratamento farmacológico exceto a aplicação tópica do IMQ. Este efeito era esperado pois a betametasona é um corticóide de alta potência, classificado como primeira escolha nos tratamentos de psoríase leve a moderada. A não significância estatística do experimento pode ser advinda do número amostral pequeno.

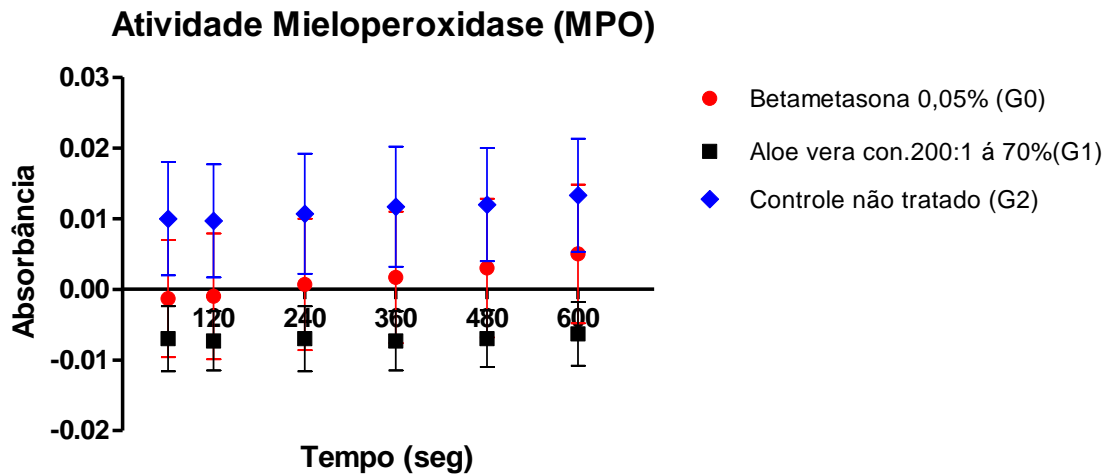
Já o tratamento com o creme à 70% do extrato concentrado 200:1 de Aloe vera liofilizada em pó (G1) mostrou um resultado que surpreendeu em relação à redução observada dos níveis de MPO. A queda na expressão da MPO foi menor que o grupo controle (G2) e ainda mais acentuada no grupo tratado com o corticoide. (G0). Interessante que o efeito observado macroscopicamente (fenótipo de hiperqueratose moderada) não acompanhou coerentemente os achados de redução da atividade neutrofílica da MPO que é proporcional à “inflamação” provocada no local.

O ensaio utilizou tecidos biopsados do modelo experimental e os resultados sugerem uma típica resposta imune imediata ligada à presença migratória neutrofílica e sua conseqüente atividade enzimática (MPO). Para reforçar esta afirmativa, seria fundamental a confecção de lâminas histológicas, avaliadas por pelo menos dois patologistas experientes para verificar a presença ou não de neutrófilos e/ou outros imunócitos do tipo macrófagos que também secretam MPO. Além da presença poderia-se avaliar a concentração dos mesmos no sítio induzido à inflamação.

A enzima mieloperoxidase (MPO) é contida em abundância nos grânulos azurófilos dos neutrófilos (10-25% do sangue periférico murino). A enzima é secretada pelos neutrófilos como 1ª barreira imunológica à invasão de patógenos ou na resposta a algum estímulo inflamatório. A enzima pode ser também secretada por algumas populações de macrófagos que, juntamente com os neutrófilos e monócitos, respondem pela imunovigilância primária da pele contra potenciais estímulos agressores. (MCMILLEN; TIMOTHY et al., 2005).

A estrutura geral do sistema imune de espécies murino e humanos é bastante semelhante. No entanto, o sangue humano é rico em neutrófilos (50 -70% de neutrófilos, 30 -50% linfócitos) enquanto o sangue murino tem uma forte preponderância de linfócitos (linfócitos 75-90%,  $\pm$ 10%-25% neutrófilos). (MESTAS; HUGHES, 2004; BOXIO et al., 2004; LAU et al., 2005).

Na psoríase, a presença de neutrófilos é marca registrada dos estágios iniciais da doença. Quando os neutrófilos estão presentes na região da papila dérmica, próximo aos microvasos, originam o sinal de Auspitz (pequenas hemorragias pontuais) que prenunciam a emigração destas células para a camada epidérmica formando, na porção intracórnea, um achado histológico típico da psoríase chamado microabscesso de Munro. Esta emigração dos PMN a partir dos vasos na derme é regulada por citocinas inatas, tais como o fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ), que induz a expressão de moléculas de adesão de ligação dos PMN através da estimulação de células endoteliais expressoras do receptor TNF-1. (CHRISTOPHERS, 2014).



**Figura 21: Gráfico dos níveis de atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) medida cineticamente em espectrofotômetro de duplo feixe utilizando amostras de pele de camundongos do grupo tratado com Aloe vera extrato conc.200:1 em creme à 70% (G1), não tratado (G2) e tratado com betametasona dipropionato 0,05% em creme como controle positivo (G0). Todos os grupos foram previamente tratados com imiquimode, induzindo o fenótipo semelhante à psoríase em todos os animais em investigação.**

Fonte: Dados do autor.

## 4.2 Modelo *in vitro*

A falta de modelos experimentais *In Vitro* cientificamente testados e aceitos, de fácil reprodutibilidade para o estudo dos processos fisiopatológicos e celulares em torno da psoríase, direcionou a escolha dos modelos celulares em monocamada selecionados neste estudo. (BARKER et al., 2004; JEAN; POULIOT, 2010; PRIGNAMO et al., 2015). Embora o modelo reproduza apenas uma parte do microambiente tridimensional da pele, o estudo selecionou desenhos experimentais que mimetizam eventos fisiopatológicos e celulares presentes na psoríase, dentre eles: o processo cicatricial (fase de remissão da doença) usando queratinócitos humanos imortalizados (células do tipo HaCat); e a inflamação através da avaliação do nível de expressão da chemerina, proteína pró-inflamatória presente na fase inicial da psoríase, sintetizada por fibroblastos dermais primários.(ALBANESI et al., 2009).

Para elucidar eventos implicados no controle do crescimento epitelial e diferenciação celular, queratinócitos humanos normais (NHK) cultivados em meio



adequado, fornecem um sistema experimental ideal. Mas a sua utilização pode ser limitada pelas complexidades envolvidas na sua recuperação de doadores, cultivo e número limitado de passagens. Para excluir estes problemas, a linhagem celular de queratinócitos humanos espontaneamente imortalizados do tipo HaCaT é frequentemente utilizada como um modelo para o estudo de funções de queratinócitos. (MICALLEF et al., 2009).

A hipótese para a “imortalidade” das HaCaT (Ha = human adult, Ca = calcium, T = temperature) deve-se supostamente a uma ação conjunta das mutações dos alelos do gene TP53 (típicas das mutações induzidas pela radiação U.V.), supressor de tumores envolvidos na reparação de DNA , nas condições de cultivo de longa duração de queratinócitos de pele humanas normais sob reduzidas concentrações de cálcio e elevadas temperaturas da cultura, induzindo assim alterações genéticas acumuladas (BOUKAMP et al.,1988).

#### ***4.2.1 Avaliação da capacidade cicatricional em cultura de células humanas queratinocíticas imortalizadas (linhagens HaCat) após tratamento com Aloe vera extrato seco pó concentrado liofilizado 200:1 em diferentes concentrações***

O típico ensaio do “arranhão” estima o tempo de “cura” da ferida (arranhadura), onde uma "lacuna" deliberadamente feita pelo pesquisador sobre uma monocamada de cultura de células mimetiza o dano celular. A migração celular e o crescimento em direção ao centro do espaço são monitoradas frequente e quantitativamente. Os fatores que alteram a motilidade e / ou proliferação das células pode levar a taxa de aumento ou diminuição da "cura" do hiato em monocamada celular. (CHUN-CHI LIANG; ANN Y PARK; JUN-LIN GUAN, 2007; YANLING CHEN, 2011).

As imagens dos “gaps” mostrados nas figuras 22 e 23 registram a fenda (“gap”) feita na monocamada da cultura de células imortalizadas de queratinocitos (HaCat) nos momentos “Zero” hora e próximo ao final do experimento (22ª hora) que é marcado pelo fechamento total de um dos poços. Foram testadas 5 diferentes concentrações de extrato de Aloe vera conc.200:1 pó liofilizado (AVFDE).

O resultado esperado era observar que o extrato, em alguma de suas concentrações fosse apresentar um potencial cicatricial (fechamento da fenda ou “arranhão” artificialmente feito) maior que as células não tratadas. Embora isto não tenha ocorrido, na figura 24 foi possível identificar diferenças estatisticamente significativas quanto à concentração deste tipo de extrato de aloe vera aparentemente imprópria para uso como cicatrizante. No caso, a concentração de 1250ug/ml mostrou-se inadequada para fins terapêuticos cicatriciais com uso deste lote do extrato.

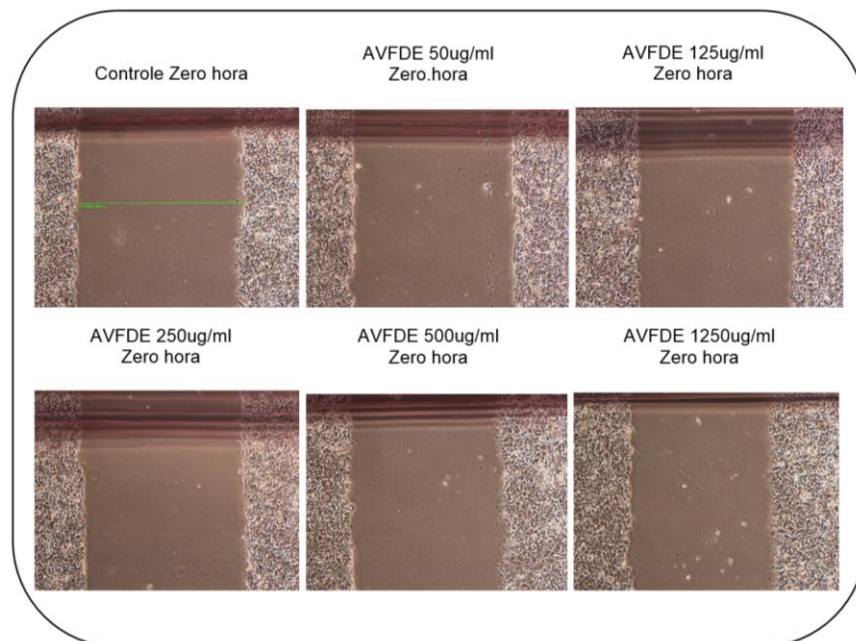
Vários estudos sobre a bioatividade do aloe vera citados na introdução deste trabalho aborda o potencial cicatricial de preparações à base de seus extratos mucilaginosos brutos e/ou concentrados utilizando diferentes concentrações (MOGHBEL et al., 2007 ; SHAHZAD; AHMED, 2013; XING et al., 2015) , fato que não foi comprovado nas condições experimentais do presente estudo.

O extrato conc 200:1 de Aloe vera utilizado no experimento deveria ter apresentado uma atividade cicatricial melhor que o grupo controle, não tratado. Embora não tenha sido feita uma análise quantitativa prévia ao experimento, supõe-se que o ocorrido deve-se principalmente ao teor mínimo de acemannan ( $\geq 10\%$ ), bioativo cicatrizante principal, preconizado pelo Conselho de Ciência Internacional do Aloe (IASC) presente no extrato. O IASC estabelece vários critérios qualitativos e quantitativos para o uso de preparações orais e tópicas à base de Aloe vera gel e derivados.

Logo, o resultado negativo obtido neste estudo pode ser reflexo de alguns fatores inerentes à qualidade do extrato utilizado e / ou a concentração de outros importantes fitocompostos do aloe vera de ação cicatrizante. No laudo do produto de origem nacional (único produtor no Brasil – anexo III) não há nenhuma especificação quanto ao teor de acemannan ou qualquer outro fitocomposto em específico. Este fato demonstra a necessidade de uma análise quantitativa da substância, prévia ao experimento, e também a definição de um padrão de qualidade que exija a descrição da composição das principais substâncias ativas contidas no fitoextrato mucilaginoso, liofilizado ou foliar bruto de Aloe vera.

Os erros padrões elevados podem também ser indicativos das limitações inerentes à técnica de execução e as restrições do método em si, já que o Ensaio do Arranhão apresenta limitações, revistas por Chun-Chi Liang et al. (2007) corroboradas pela variabilidade do comportamento celular.

Segundo Chun-Chi Liang et al. (2007), o ensaio do Arranhão é um método fácil, simples, econômico e bem desenvolvido para estudar a migração de células *In Vitro*. Os padrões de migração tanto de populações celulares mais fracamente ligadas (por exemplo, fibroblastos) ou aquelas que se apresentam em camadas interconectadas (por exemplo, células epiteliais e endoteliais) apresentam um comportamento semelhante a sua migração *In Vivo* durante o ensaio do Arranhão.



**Figura 22:** Ensaio do arranhão ou Scratch Assay no momento “Zero”. É feita uma abertura ou gap que mimetiza o dano ou lesão na “pele” representada pela cultura de células imortalizadas de queratinocitos humanos (HaCat). Cinco concentrações diferentes do AVFDE são testadas frente a um controle (Tampão PBS).

Fonte: Fotos do autor. Objetiva de 4X

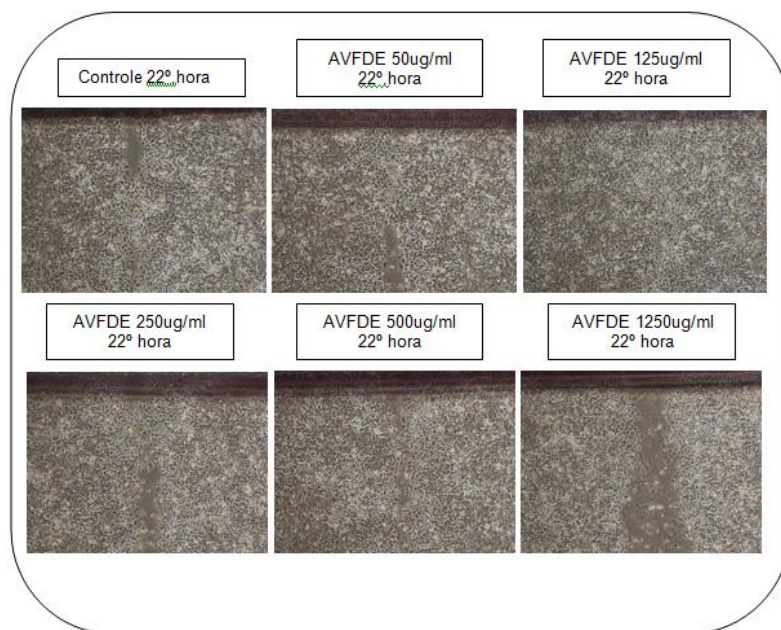
Outra vantagem deste ensaio é a sua adequação especial para o estudo da regulação da migração das células por interação da célula com a matriz extracelular (ECM) e as interações célula-célula. Além disso, o ensaio do Arranhão é compatível com microscopia de imagem de células vivas permitindo inclusive a análise dos acontecimentos de sinalização intracelular. Por exemplo, através da visualização da

proteína fluorescente verde – GFP- para proteínas marcadas com localização subcelular ou pela transferência de energia de ressonância de fluorescência para interações proteína-proteína durante a migração celular.

Por outro lado, há uma série de desvantagens e limitações deste em comparação com outros métodos disponíveis. Algumas delas são:

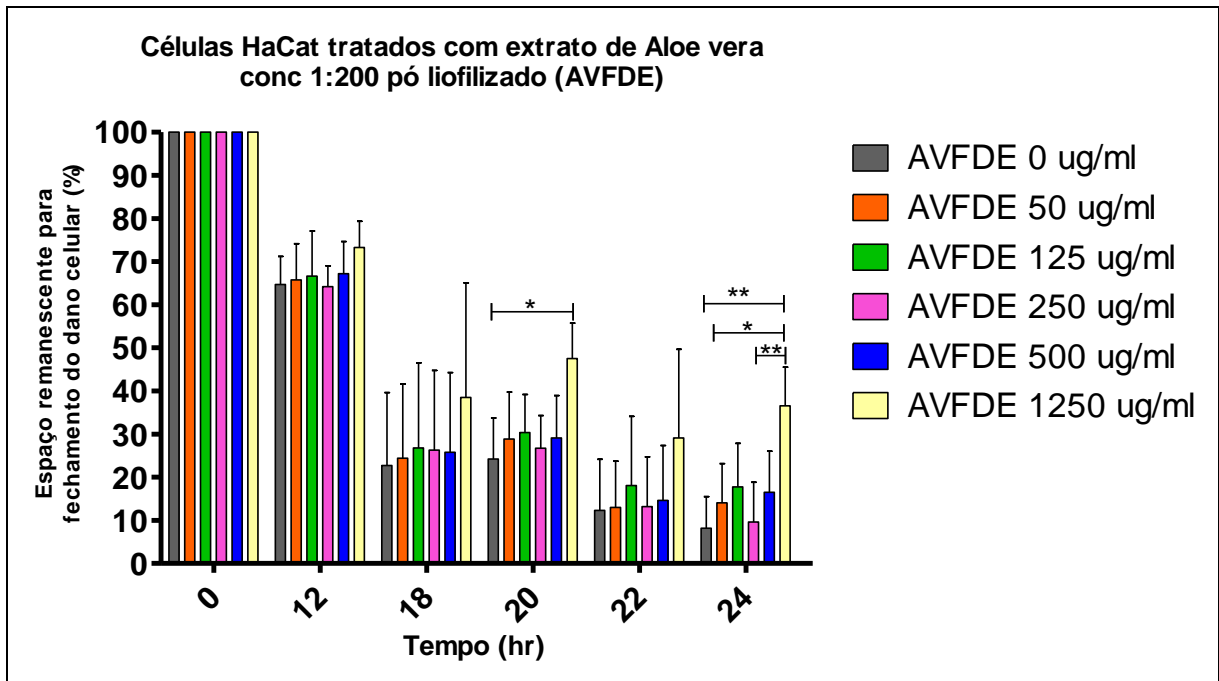
- O tempo relativamente longo de realização comparado a alguns outros métodos. São necessários um a dois dias para a formação da monocamada de células e, em seguida, 8-18 h, pelo menos, para a migração celular para fechar a arranhadura;
- A quantidade relativamente grande de células e produtos químicos necessários para o ensaio, uma vez que é usualmente executada de uma placa de cultura de tecido.

Portanto, não é um método de escolha se a disponibilidade de células (por exemplo, células primárias especializadas que são difíceis de obter em quantidade suficiente) ou dos produtos químicos (por exemplo, reagentes caros) forem limitantes. Chun-Chi Liang et al. (2007) em estudo de revisão aborda comparativamente o ensaio do Arranhão com vários outros métodos.



**Figura 23:** Ensaio do arranhão ou Scratch Assay no momento “22º. hora”; tempo decorrido para que haja o fechamento ou “cicatrização” da ferida (e.g. gap) feita na monocamada de cultura de células imortalizadas de queratinócitos humanos (HaCat). Cinco concentrações diferentes do AVFDE são testadas frente a um controle (Tampão PBS)

Fonte: Fotos do autor. Objetiva de 4X



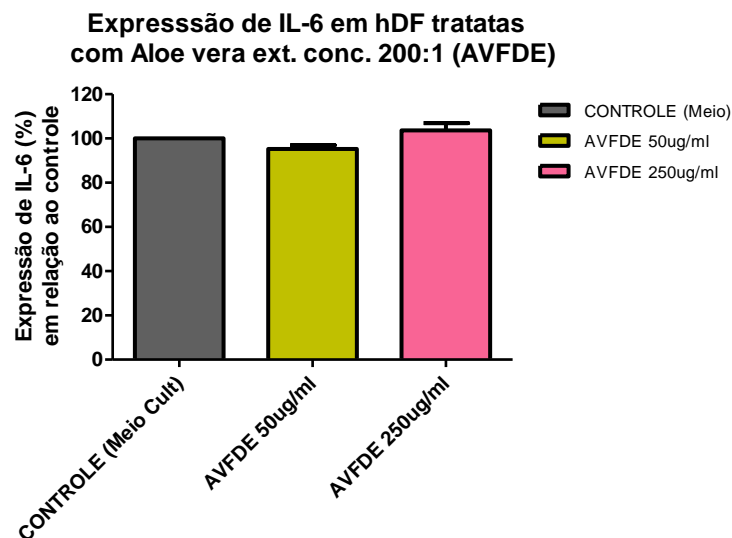
**Figura 24:** Gráfico do comportamento das células queratinocíticas quanto a capacidade de proliferação ou migração ao longo do tempo após sofrerem uma lesão representada pelo “gap” ou ferida artificialmente feita sobre a monocamada de células queratinocíticas humanas do tipo HaCat. As concentrações são dadas em ug/ml de Aloe vera extrato conc 200:1 dissolvido em tampão fosfato. Para análise estatística, foi utilizada a ANOVA de duas vias com  $p < 0,05$  (\*) e  $p < 0,01$  (\*\*) associado ao teste post hoc de Bonferroni. Os dados estatísticos foram obtidos a partir do Prisma Graph V.5.01. Resultados obtidos após quatro experimentos independentes em duplicata.

Outra informação obtida e utilizada a partir dos resultados do ensaio do arranhão dizem respeito às concentrações selecionadas para a continuidade dos experimentos In Vitro realizados neste estudo. Mesmo não demonstrando um resultado estatisticamente significativo em relação ao controle (Zero ug/ml), as concentrações de 50ug/ml e 250ug/ml do AVFDE apresentaram um comportamento estatisticamente significativo em relação ao efeito de não cicatrização (AVFDE 1250ug/ml). Teoricamente, e segundo os padrões do órgão regulador (IASC), caso estas duas concentrações mais baixas de AVFDE estivessem dentro do teor mínimo de  $\geq 10\%$  de Acemannan (ACM), elas seriam equivalentes à  $\pm 5$ ug/ml (AVFDE 50ug/ml) e  $\pm 25$  ug/ml (AVFDE 250ug/ml) do polissacarídeo respectivamente. Conforme poderá ser visto mais adiante, utilizamos o Acemannan puro em escala 10X superior a estas supostas doses iniciais contidas no AVFDE, ou seja ACM 50ug/ml e ACM 250ug/ml. O ideal seria a realização de um experimento dose

dependente e curso temporal, no entanto esbarramos no custo do reagente (AU\$ 1.000/ grama) como um fator limitante para cumprir esta etapa do projeto.

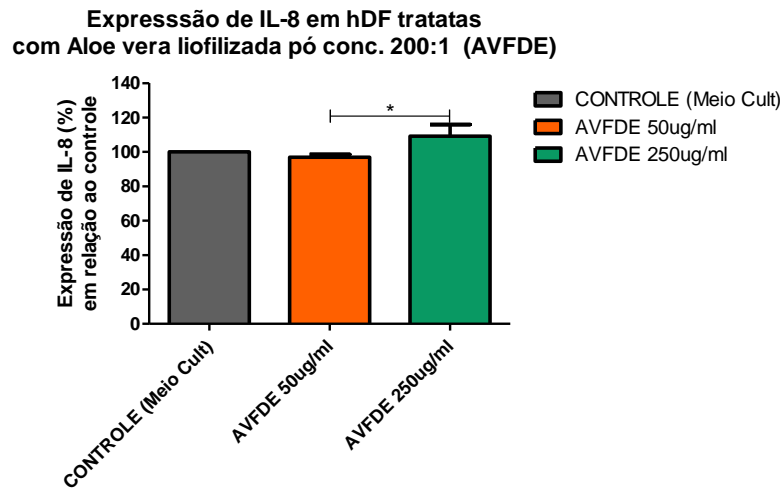
#### **4.2.2 Expressão do perfil de citocinas próinflamatórias em sobrenadante de cultura celular primária de hDF após tratamento com Aloe vera extrato seco pó concentrado liofilizado 200:1 (AVFDE) em diferentes concentrações**

Na figura 25 é possível observar que Aloe vera extrato concentrado 200:1 em pó liofilizado (AVFDE) não demonstrou efeito significativo sobre os níveis de expressão da IL-6 em nenhuma das concentrações selecionadas.



**Figura 25:** Nível percentual da expressão de IL-6 em Fibroblastos dermais humanos (hDF) após 24 horas de incubação e tratamento com AVFDE 50ug/ml e 250ug/ml. (ELISA) Resultados obtidos a partir de replicata de três experimentos independentes.  $p < 0,05$ ; one-way ANOVA. e teste post hoc de Tukey .Prism Graph V.5.01

Já os níveis de expressão da IL-8 mostraram-se significativamente aumentados após estímulo com aloe vera extrato liofilizado pó concentrado 200:1 (AVFDE) 250ug/ml conforme mostra a figura 26. Esta citocina, leva ao recrutamento neutrofílico conforme observado por Larsen et al. (1989).



**Figura 26:** Nível percentual da expressão de IL-8 em Fibroblastos dermais humanos (hDF) após 24 horas de incubação e tratamento com aloe vera extrato liofilizado pó concentrado 200:1 (AVFDE) 50ug/ml e 250ug/ml. (ELISA) Resultados obtidos a partir de replicata de três experimentos independentes.  $p < 0,05$  (0.0229); one-way ANOVA. e teste post hoc de Bonferroni.

Na pele, as quimiocinas são secretadas tanto pelas células residentes, tais como os queratinócitos, melanócitos, fibroblastos, células dendríticas e mastócitos, bem como por células infiltradas -. Linfócitos, eosinófilos e monócitos (COMMINS et al., 2010; SINGH et al., 2013; NEDOSZYTKO et al., 2014). As citocinas selecionadas no presente estudo representam algumas destas proteínas sinalizadoras secretadas quer constitutivamente por fibroblastos dérmicos ou induzidas por fatores externos à célula.

Os fibroblastos, por sua vez, são tipos celulares onipresentes, responsáveis primariamente pela deposição e degradação da matriz extracelular. Estas células são consideradas bastante heterogêneas e contribuem para a especificidade tecidual das reações inflamatórias. Sua proximidade com as células do sistema imune nos tecidos conectivos e linfóides faz com que respostas imunes normais e especialmente as crônicas, desencadêm a proliferação fibroblástica e consequente aumento de produção da matriz celular que acompanha os processos biológicos da cicatrização. (APTE, 1995).

Fibroblastos dermais, sinoviais, de origem linfonódica e demais tecidos, respondem, em alguma extensão, distintamente a estímulos semelhantes provocados por

indutores pró-inflamatórios tais como TNF- $\alpha$  ou IFN- $\gamma$ . Este comportamento mostra-se biologicamente relevante quando observado que o TNF- $\alpha$ , por exemplo pode induzir a secreção de diferentes padrões e quantidades de citocinas tais como a CCL-2 (MCP-1), IL-6 e IL-8 em tipos distintos de fibroblastos. Portanto, os fibroblastos são suscetíveis de desempenhar um papel ativo na persistência de reações inflamatórias crônicas dependendo das condições do microambiente celular no qual ele está inserido. (APTE, 1995; PARSONAGE et al., 2003; OUWEHAND et al., 2008; LINDNER et al., 2012; PIOTROWSKA et al., 2016). Como exemplo de algumas citocinas e quimiocinas que podem ser secretadas constitutivamente pelos fibroblastos pode-se citar a IL-6, IL-8, a enzima COX<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, CCL-2, CCL-5 (RANTES), as MMP-1,-3,-9, CXCL12 (SDF-1), (LARSEN et al., 1989; OUWEHAND et al., 2010; SAALBACH et al., 2009).

IL-8 ou CXCL-8 é um membro da família CXC de quimiocinas que foi primeiramente identificada como o maior fator ativador e quimiotático para neutrófilos. IL-8 é um mediador do recrutamento e ativação de leucócitos polimorfonucleares humanos com papel também no recrutamento de linfócitos T e células T “natural killers” (NK).

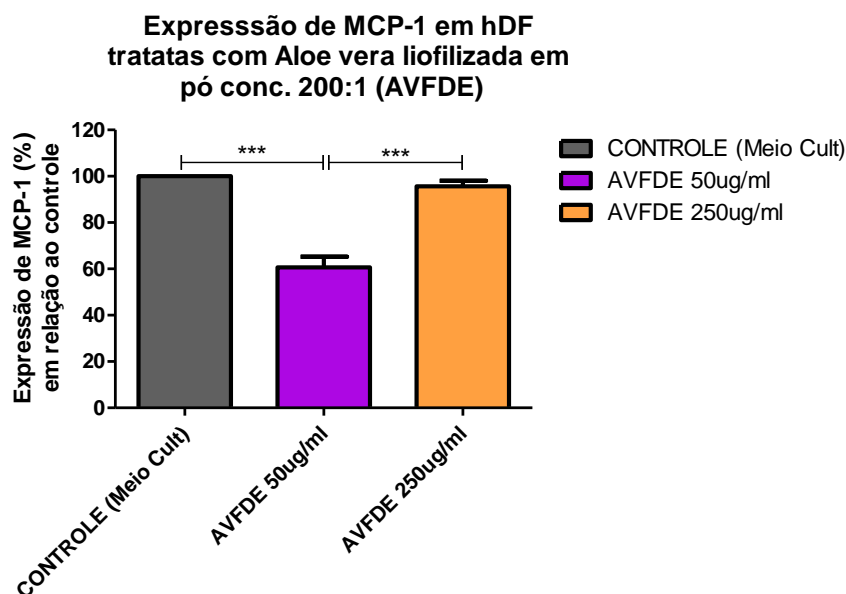
Esta citocina interage com seus receptores CXCR1 e CXCR2 elicitando uma cascata de eventos pró-inflamatórios incluindo o aumento na expressão do receptor de adesão celular CD11b/CD18 (antígeno 1 de macrófagos) nos neutrófilos; aumento da adesão de leucócitos à células endoteliais humanas; quimiotaxia e degranulação de neutrófilos ;e indução à angiogênese. CXCL8 tem um grande espectro de atividades biológicas, atuando de forma central sobre muitos processos fisiopatológicos tais como psoríase, artrite reumatoide, colite ulcerativa, fibrose cística, lesão isquêmica e choque séptico. (HOUIMEL; MAZZUCHELLI L, 2009)

O resultado mostrado na figura 26 sugere que outras substâncias ativas contidas no AVFDE, além do possível efeito imunomodulador provocado pelo acemannan , contribuem para o aumento da secreção de IL-8 em fibroblastos dermais. Isto porque o AVFDE utilizado no experimento não declara o teor mínimo de acemannan  $\geq 10\%$  (anexo III) conforme preconiza os “guidelines” do Conselho Internacional de Ciência do Aloe vera (IASC). Caso contivesse, poderíamos considerar que AVFDE 250ug/ml equivaleria à 25ug/ml de ACM no extrato concentrado (AHP, 2012). Desta forma,



esta concentração isoladamente não seria suficiente para eliciar um aumento na expressão do IL-8 pois o resultado mostrado mais adiante neste estudo demonstra que apenas concentrações de 250ug/ml de ACM puro foram capazes de causar um aumento da expressão de IL-8 em sobrenadante de cultura de fibroblastos dermais. A seguir, a figura 27 mostra um gráfico onde a Aloe vera extrato concentrado 200:1 à 50ug/ml provocou uma redução altamente significativa na expressão de MCP-1 pelos fibroblastos dermais humanos (hDF).

A maioria das quimiocinas produzidas no corpo humano pertence ao grupo das quimiocinas inflamatórias que tem como importantes representantes a CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES) e a CCL11 (Eotaxina). Estas proteínas são produzidas de modo induzível por muitos tecidos e muitos leucócitos infiltrantes em resposta a toxinas bacterianas e após a ativação de citocinas pró inflamatórias chave como as IL-1, TNFs e os IFNs.



**Figura 27: Nível percentual da expressão de MCP-1 em Fibroblastos dermais humanos (hDF) após 24 horas de incubação e tratamento com Aloe vera liofilizada em pó conc. 200:1 (AVFDE) 50ug/ml e 250ug/ml. (ELISA) Resultados obtidos a partir de replicata de três experimentos independentes.  $p < 0,0001$ ; one-way ANOVA e teste post hoc de Tukey .Prism Graph V.5.01**

A principal função das quimiocinas inflamatórias é regular o recrutamento dos leucócitos para os locais da inflamação ou infecção de modo a proporcionar a

defesa do hospedeiro. Uma extensa revisão de literatura abordando a expressão de citocinas e quimiocinas em fluidos corporais e teciduais durante procedimentos cirúrgicos, nos episódios inflamatórios crônicos e agudos, tem demonstrado que ligantes para receptores de monócitos, DCs, NKs e Th1 dos tipos CCR1 (CCL4), CCR2 (MCP-1), CCR5 (CCL3 e CCL5), e CXCR3 (CXCL9-11) são distribuídos de forma ubíqua nas inflamações crônicas enquanto na inflamação aguda as quimiocinas ligantes de receptores de neutrófilos ativados e células T do tipo CXCR1 (CXCL1-3; CXCL5-8) e CXCR2 (CXCL-6;-8) dominam o microambiente celular. (NEDOSZYTKO et al., 2014).

A proteína 1 quimioatratora de monócito (MCP-1) tem sido identificada como uma das maiores responsáveis pelo recrutamento de monócitos e células T durante as condições inflamatórias incluindo a psoríase. A MCP-1 é secretada por várias células incluindo os macrófagos, queratinócitos e fibroblastos. Sua concentração é aumentada pela presença de TNF- $\alpha$ , citocina chave na patogênese da psoríase. Uma alta expressão de MCP-1 em lesões psoríasicas já foi detectada por Gillitzer et al. (1993) e Deleuran et al. (1996) e uma alta expressão do seu receptor CCR2 em monócitos e macrófagos de pacientes com psoríase foram determinados por Vestergaard et al (2004).

Aliás, além destes imunócitos, o receptor CCR2 é também expresso em células T ativadas, incluindo Th17, células dendríticas imaturas, células NK e células  $\gamma\delta$ T. (BROMLEY et al., 2013).

Lembo et al. (2013) sugere que a interação MCP-1 / CCR2 é crucial para o tráfego de monócitos para o interior das lesões psoríasicas. Adicionalmente, propõe a proteína MCP-1 com um potencial marcador inflamatório local para os pacientes psoríasicos. Esta, ao ser combinada com outros mediadores e marcadores celulares, com parâmetros inflamatórios clássicos (ex: hPCR) e com o PASI score, permite a avaliação da severidade da doença e a eficácia do tratamento com agentes biológicos anti TNF  $\alpha$ , tendo em vista a relação direta existente entre os níveis locais das duas citocinas.

O efeito observado pode ser benéfico e protetor ao indivíduo levando a uma redução de um processo inflamatório inicial por deficiência no recrutamento de células monocíticas e demais imunócitos que expressam receptores CCR2.

Uma outra possível interpretação que pode explicar parcialmente a redução da quimiocina MCP-1 pode ser a partir de uma observação feita por Distler JHW et al (2006) que pontuou a inexistência constitutiva de receptores CCR2a ou 2b, receptores D6 e US28, todos relativos a MCP-1, em fibroblastos dermais normais ou mesmo quando induzidos por IL-1, IL-4 ou pelo fator derivado de plaquetas (PDGF). Partindo desta informação, e considerando que hDF secreta constitutivamente a quimiocina MCP-1, o resultado sugere que após a sua secreção inicial não haveria como manter níveis contínuos (“loops”) da proteína via efeito autócrino pois não haveria receptores disponíveis nos hDF para a MCP-1. Logo, manteriam-se os níveis basais ou estes reduziriam-se com o passar do tempo.

*In Vivo*, a MCP-1 secretada atua sobre receptores CCR2 expressos nos tipos celulares citados anteriormente. Em especial as DCs imaturas, amplificam a resposta inflamatória com o recrutamento de linfócitos T e diferenciação dos DCs em seus subtipos (pDcs e DCs dérmicos). Segundo Pivarcsi et al. (2005) a MCP-1, demonstra atividade quimiotática para células T linfocíticas de memória, monócitos e eosinófilos mas não para neutrófilos. No entanto, em discordância com esta afirmativa, estudos anteriores abordados em revisão de Futosi et al. (2013) lista o CCR2 dentre os mais importantes receptores de superfície para quimiocinas presentes em neutrófilos humanos pertencentes à classe das quimiocinas de motivos C-C.

Ainda com relação ao forte efeito redutor ( $p < 0,0001$ ) do aloe vera extrato concentrado observado na figura 27, sugere-se que uma ação inibitória dose dependente de algum outro biocomposto com ação imunomoduladora, (ácido salicílico, alprogen, veracil glucans, dentre outros) pode ter sido elicitada.

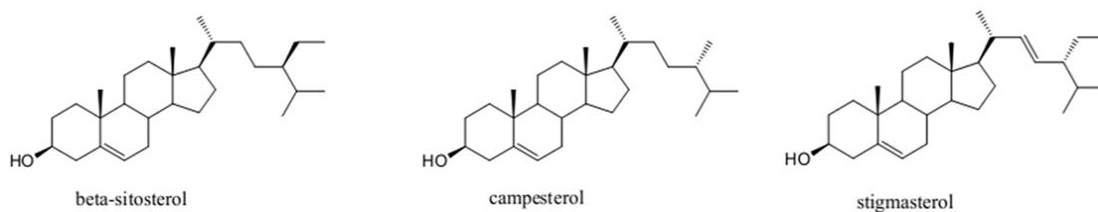
### **4.2.3 Ensaio de viabilidade celular frente ao tratamento com giberelina em cultura de fibroblastos primários dermais humanos (hDF)**

Inicialmente, os experimentos *In Vitro* foram realizados utilizando-se o extrato concentrado 200:1 do Aloe vera (AVFDE) que representa uma mistura de mais de 75 substâncias ativas contidas em um único produto. Partiu-se então para a investigação de fitocompostos bioativos do aloe vera isoladamente, selecionando-os a partir de estudos *In Vitro* e *In Vivo* previamente publicados com evidência sobre suas bioatividades. O intuito foi testá-los isoladamente utilizando concentrações em uma faixa de bioatividade consensual entre os artigos consultados preferencialmente frente a células humanas e também em modelos murino.

As substâncias ativas selecionadas foram categorizadas conforme a classe fitoquímica e farmacológica que pertenciam. Foram elas: os fitohormônios (betasitosterol e giberelina), um polissacarídeo (acemannan) e as cromonas (aloesina A e B).

Beta-sitosterol (BST) é um dos fitoesteróis mais comuns encontrados naturalmente em uma grande variedade de plantas e em boas quantidades em leguminosas como o amendoim e sementes oleaginosas tais sementes de gergelim e soja. Este fitoesterol não é sintetizado pelo homem e seu consumo em quantidades de 2g/dia de fontes naturais tem papel protetor cardiovascular segundo o Comitê de Nutrição da Associação Americana do Coração. (LICHTENSTEIN; DECKELBAUM, 2001, VALERIO; AWAD, 2011).

Três fitoesteróis de ocorrência natural, análogos estruturais de colesterol são encontradas nas plantas: o  $\beta$ -sitosterol (65%), o campesterol (30%) e estigmasterol (3%). (Figura 28).



**Figura 28.** Imagem das estruturas químicas dos três principais fitoesteróis encontrados nas plantas em geral.  
 Fonte: Saeidnia et al., 2014

Selecionamos as concentrações de 8uM (3,32ug) e 16uM (6,64ug) de BST para nossos experimentos com fibroblastos dermais humanos focando principalmente nos níveis de expressão de chemerina e das citocinas pro-inflamatórias mensuradas frente ao tratamento com o AVFDE. Os artigos que deram suporte a seleção das concentrações são discutidos a seguir.

Betasistosterol (PM 414,7) em concentrações de 2uM demonstrou efeitos angiogênicos (MOON et al.,1999) em células endoteliais humanas (HUVEC).

Efeitos imunomoduladores sobre macrófagos murino levando a um efeito redutor da regulação dos fatores de transcrição pró-inflamatórios do tipo STAT1 e NF-kB ,após o estímulo do eixo LPS / TLR4 , foi observado em concentrações de betasistosteol variando de 1 à 16uM. (VALERIO et al., 2013).

Tanaka et al. (2015) em estudo recente com um extrato seco padronizado do gel de Aloe vera tratou fibroblastos dermais humanos com fitoesteróis do tipo cicloartenol (precursor biosintético do BST) e lofenol, contidos no aloe vera pó concentrado e demonstrou um aumento dose dependente em nível de expressão mRNA de quatro enzimas chave responsáveis pelo colágeno (COL1A1 e COL 3A1) e pelo ácido hialurônico (HAS2 e HAS3) utilizando doses de 0,02 – 2 uM. Estes dados sugerem que os estes fitoesteróis do Aloe têm a capacidade de melhorar a hidratação da pele através do aumento do teor de HA na matrix extracelular (ECM) dérmica.

Segundo o grupo de Awad e Fink (2000), as concentrações de betasistosterol (BST) até 16uM (6,64ug) são consideradas de maior potencial de proteção contra os cânceres mais comuns nas sociedades ocidentais, tais como câncer do cólon (HT-29

e HCT116), da mama (MDA-MB-231 e MCF-7) e da próstata. Baseado nestes artigos citados e outros, selecionamos as concentrações de 8 $\mu$ M (3,32 $\mu$ g) e 16 $\mu$ M (6,64 $\mu$ g) para nossos experimentos com fibroblastos dermais humanos focando principalmente nos níveis de expressão de chemerina.

O Acemannan, acemanano (ACM) ou Carrysina, principal constituinte bioativo do Aloe vera é formado por uma molécula de peso molecular aproximado de 80 - 130KDa. Representa a maior fração da porção carboidrato do gel extraído do parênquima de reserva. Trata-se de um polissacarídeo que apresenta duas características básicas:

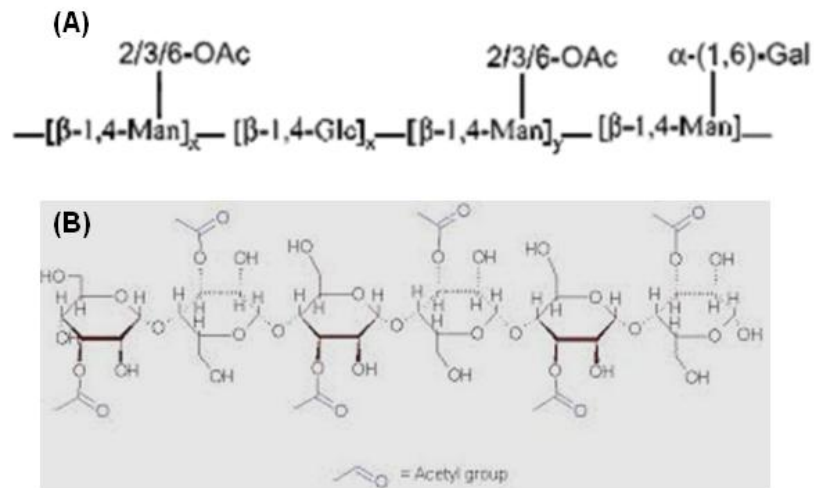
- São, na sua maioria, compostos por resíduos polimerizados de manose com um pequeno percentual de glicose conectado por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -(1,4);
- São resíduos polimerizados de manose acetilados na segunda (O-2), terceira (O-3) ou sexta (O-6) posição dos átomos de oxigênio, com uma taxa média de acetilação de  $\pm 0,78$  por resíduo de manose.

O “esqueleto” estrutural dos polissacarídeos acetilados consistem principalmente de ligações  $\beta$ -(1,4) de manose e glicose em proporção equivalente à 15 (Man) : 1 (Gli) com substituições laterais a cada 16 resíduos de manose. (AHP, 2012).

Sendo assim, o acemannan é um polímero misto de mananas acetiladas com cadeias de vários tamanhos conforme mostra a figura 29, tendo em média, cada manose um grupo acetil em uma das três posições restantes do anel. (NI et al., 2004).

Foi observado por Jettanacheawchankit et al. (2009) que em concentrações de 2, 4, 8 e 16 mg/ ml estes polissacarídeos induziam significativamente a proliferação celular ( $p < 0.05$ ) em fibroblastos gengivais e nesta mesma faixa de concentração estimulavam significativamente a expressão de KGF-1, VEGF e colágeno tipo I.

Ainda dentro desta faixa de concentração (2mg/ml – 4mg/ml) Jittapiromsak N. et al (2010) observaram que ACM promove a formação de dentina em células primárias humanas de polpa de dente via proliferação, diferenciação, formação da ECM e mineralização.



**Figura 29: Estrutura do Acemannan (ACM).** (A) estrutura proposta do polisacarídeo acetilado em diferentes posições do esqueleto manose:glicose; (B) estrutura química do ACM.

Fonte: Femenia et al., 1999; AHF, 2012

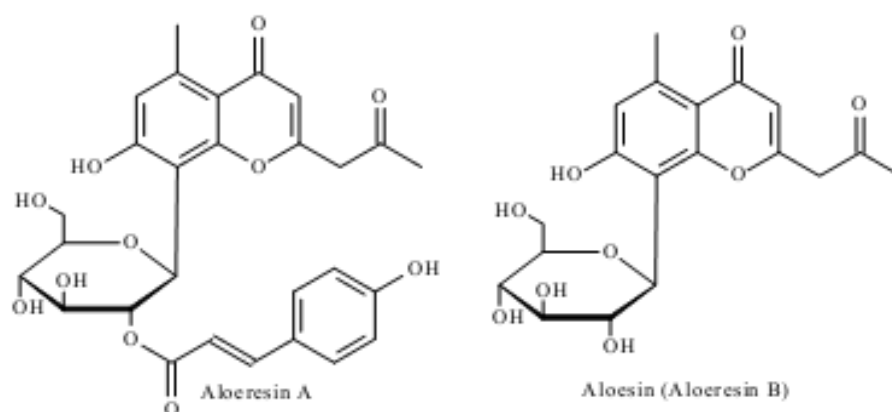
Em um modelo de avaliação de resposta imunomoduladora em células dendríticas imaturas de camundongos, a expressão de IL-12 por ACM em uma faixa de 10-100ug / ml foi mensurada em comparação ao estímulo inflamatório por LPS. ACM 100 ug/ml elicitou forte expressão da IL-12 em comparação ao controle, medido por ELISA. (LEE et al., 2001).

Mais recentemente, Xing et al. (2015) demonstrou um efeito acelerador sobre a cicatrização e proliferador celular significativo, sobre fibroblastos murinos utilizando concentrações de ACM variando entre 100 – 200ug/ml.

Considerando estes e outros estudos e adaptando-os à quantidade de reagente em estoque, foram selecionadas as concentrações de 50ug/ml e 250ug/ml de ACM para conduzir os experimentos que visavam o efeito imunomodulador do ACM.

O grupo das cromonas, constituído pelas substâncias Aloeresina A (ALA) e Aloeresina B (ALB) ou Aloesina, mostradas na figura 30, pertence à classe das cromonas C-glicosiladas que, por sua vez, fazem parte do grande grupo dos constituintes fenólicos juntamente com as antronas, representadas pela aloína A e B (juntas formam a barbaloína, responsáveis por 10-25% do peso seco do exudato) e as antraquinonas (aloe emodina). Um número menor de artigos publicados foi encontrado envolvendo células humanas. Na falta destes, selecionamos alguns artigos abordando estudos fitoquímicos *In Vitro* com células murino.

Lv Liang et al. (2008), utilizou células de neuroblastoma de ratos, durante a triagem de extratos vegetais de Aloe vera com atividade inibitória sobre a Enzima Clivadora 1 do local  $\beta$  da proteína precursora da Amilóide (BACE1).



**Figura 30:** Estruturas química dos compostos Aloesina ou Aloeresina B (cromona 5-metilo com um substituinte 8- $\beta$ -D-glucopiranosilo), e Aloeresina A (cromona 5-metilo com um substituinte 8- $\beta$ -D-glucopiranosil-2-O-trans-p-cumárico)

Fonte: Saccù et al., 2001

O grupo descobriu que cromonas, incluindo a ALA e ALB, são moderadamente ativas para inibir de forma potente a  $\beta$ -secretase em concentrações de 100uM. BACE1 tem sido reconhecida como um alvo valioso para o tratamento da Doença de Alzheimer (AD) e os inibidores de BACE1 promete ser uma classe de farmacológica que interrompe a doença ao invés de somente aliviar os sintomas da doença.

Aloeresin B ou aloesin estimula a proliferação de células cultivadas de hepatoma SK- humano HEP-1 de um modo dependente da dose (0,01 - 100um). Os resultados sugeriram que aloesin estimula a proliferação de células SK-Hep-1, induzindo os



níveis intracelulares de ciclina E / complexo CDK2 quinase e Cdc25A, que, em conjunto, resultará na sobre-regulação da actividade de quinase dependente de E ciclina. (LEE et al., 1997).

Yagi et al. (2002) utilizando enzimas mitocondriais e microsossomiais de fígado de rato demonstraram a atividade anti-inflamatória destes derivados do extrato de Aloe vera em relação à cascata eicosanoide, através da inibição das enzimas tromboxano A2 sintetase e COX-2 sintetase a uma IC<sub>50</sub> > 100uM.

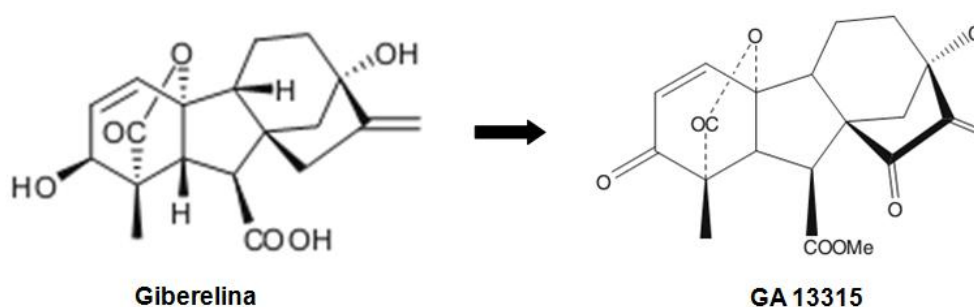
Como as cromonas selecionadas são quimicamente semelhantes, elegemos concentrações diferentes onde ALA foi preparada em DMSO nas concentrações de 10uM e 100uM e ALB nas concentrações de 50uM e 250uM.

A Giberelina A3 (GA3) ou ácido giberílico (PM 346,37) é o ácido diterpeno pentacíclico cuja propriedade principal é o efeito de alongamento e crescimento celular das partes apicais, frutos e sementes das plantas. O ácido giberílico age como um regulador do crescimento das plantas via efeitos fisiológicos e morfológicos a partir de doses extremamente baixas e é utilizado para aumentar o crescimento de frutas, como o morango, uvas e tamareira e alguns legumes, como tomates, couves, couve-flor, pimentão e azeitonas. (KLECZKOWSKI et al., 1995; KASAMATSU et al., 2012).

Muitos terpenos, incluindo diterpenos, triterpenos e sesquiterpenos, possuem atividade anti-inflamatória *In Vivo* e *In Vitro*. Embora as giberelinas não tenham ainda sido utilizadas clinicamente como drogas anti-inflamatórias e o mecanismo de ação ainda não foi relatado, várias preparações à base de giberelina estão sob patente para o tratamento da diabetes (Patente referência US 20050215496 A1), psoríase e prostatite (pedido de patente WO 1991008751 A1), destacando assim o crescente interesse em desenvolvimento de giberelinas para os ensaios pré-clínicos e clínicos.. (REIHILL et al., 2015).

Estudos do GA3 puro em células humanas são mais escassos no entanto, uma série de derivados de giberelina incorporadas com duas unidades de cetona  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturadas nas posições A e D dos anéis de giberelina (Figura 31) foram

desenhadas, sintetizadas e mostraram baixa toxicidade e forte atividade anti cancerígena em ensaio MTT para um número de linhagens de células de câncer humanas, incluindo HT 29 (carcinoma do cólon), A549 (adenocarcinoma do pulmão), HepG2 (hepatoma) e MKN28 (carcinoma gástrico). O derivado mais potente da giberelina (composto 10, IC<sub>50</sub> = 2,91 µM contra HT29) posteriormente denominado (GA-13315) inibiu completamente a atividade da topoisomerase I no nível de 8 ug / mL. (CHEN et al., 2009).



**Figura 31.** Estrutura química do composto derivado de giberelina GA-13315 (13-cloro-3,15-dioxi- metil éster do ácido giberílico)

Fonte: Chen J. et al , 2009; Zhang Y,Zhang H, Chen J. et al., 2012

Este mesmo grupo de pesquisadores explorando o potencial terapêutico antitumoral do composto derivado da giberelina (GA-13315) realizou ensaios de citotoxicidade demonstrando que o composto possui atividade antitumoral potencial e eficiente com uma concentração inibitória de 50 (IC<sub>50</sub>) variando 0,13-30,28 µg / ml (0,38 uM – 87,42uM) contra as seguintes 11 linhagens celulares de tumores humanos:

- O SGC-79 01 (câncer gástrico), MD-AMB -A231 (mama), BCAP-37 (mama), A549 (tumor de pulmão de células não pequenas), Anip 973 (adenocarcinoma de pulmão), HL-60 (leucemia promielocítica), A375 (melanoma maligno), HR 8348 (adenocarcinoma retal), Hep2 (carcinoma da laringe), Raji, linfoma de Burkett, A 431 (carcinoma epitelial) e U937 (linfoma de monócitos leucêmicos) (ZHANG Y; ZHANG H; CHEN et al., 2012).

GA-13315 também demonstrou toxicidade moderada para células mononucleares do sangue periférico com um valor de IC<sub>50</sub> de 14,2 µg / ml. In Vitro, o composto diminuiu o factor VIII+ de densidade microvascular e In Vivo reduziu a expressão fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em tumor A 549 (adenocarcinoma

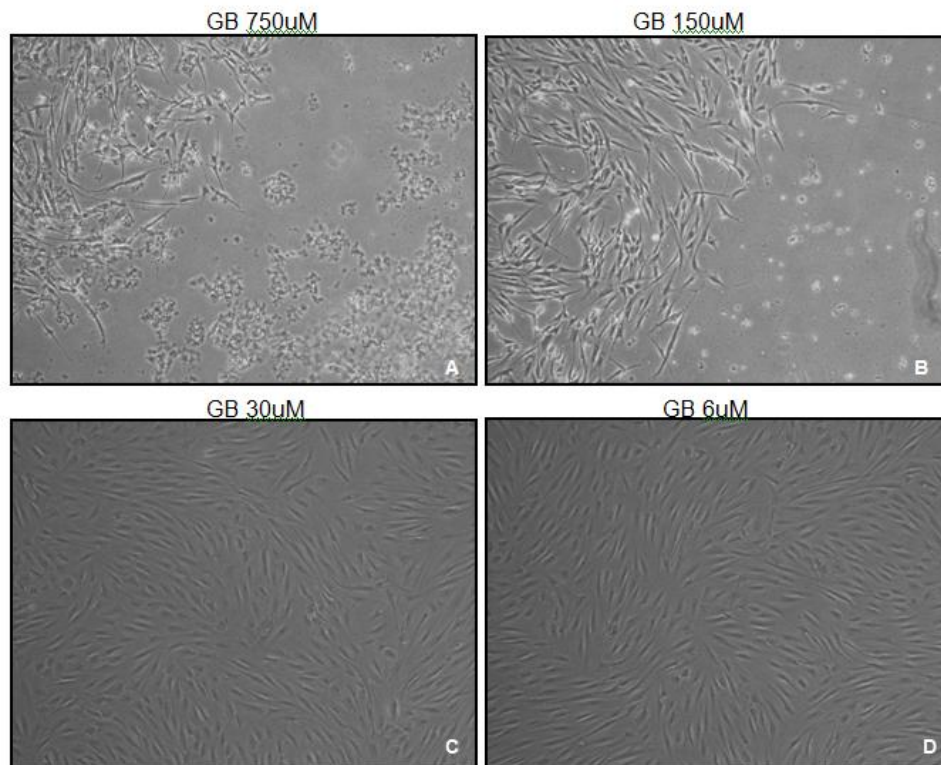
do pulmão), indicando a sua eficácia anti-angiogênica. (ZHANG Y; ZHANG H; CHEN et al., 2012).

Reihill et al. (2015) investigaram o ácido giberélico (GA 3) como responsável por uma atividade anti-inflamatória por indução das proteínas dedo de zinco A20- ou ZFP A20 (alojadoras de DNA) em plantas. A inflamação via NF-kB é regulada negativamente pela proteína de dedo de zinco A20 em humanos e em modelos murinos. Adicionalmente, estudos mostram que a ZFP A20 é um regulador negativo das vias induzidas pelo fator de necrose tumoral (TNF) que conduzem à apoptose, resposta ao estresse e a inflamação. (LADEMANN et al., 2001).

Usando concentrações que variavam de 0,03uM a 300uM, com melhor dose à 30uM, Reihill et al. (2015) mostrou que a indução de A20 por GA3 atenua a inflamação em células epiteliais das vias respiratórias (células epiteliais nasais primárias e uma linhagem celular epitelial brônquica humana) pelo menos em parte, através do seu efeito sobre a NF-kB e I $\kappa$ B $\alpha$ . O estudo coluiu que o GA3 e/ou seus derivados poderia potencialmente ser desenvolvidos em fármacos anti-inflamatórios para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas associadas com disfunção A20.

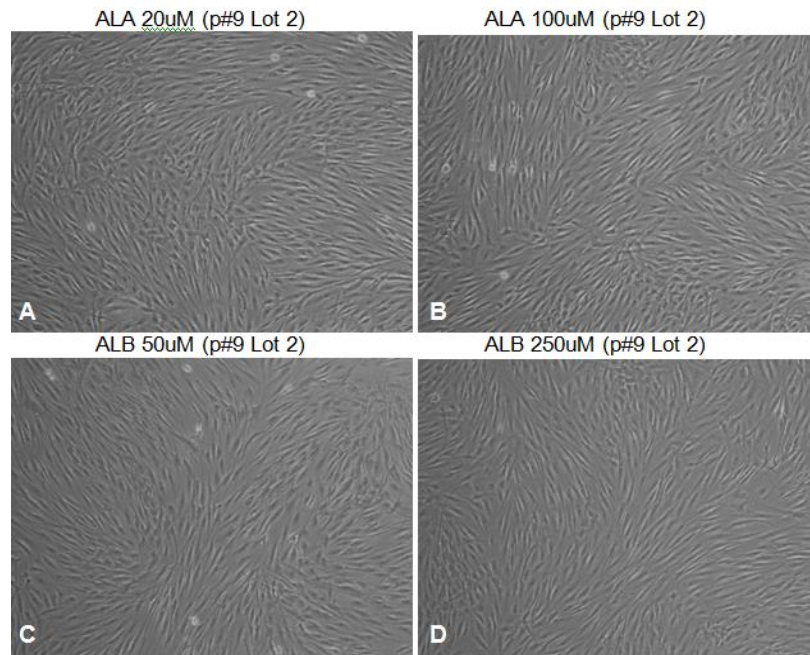
Inicialmente, no presente estudo, selecionamos as concentrações de 6uM, 30uM, 150uM e 750uM de giberelina. A maior dose testada foi selecionada com base no trabalho de Kasamatsu et al. (2012) que não observou nenhum efeito citotóxico após tratamento de células tronco adiposas com concentrações até 1mM de giberelina de modo dose e tempo dependente.

Conforme mostra a figura 32 (A-D), as concentrações de 6uM, 30uM foram selecionadas após tratamento das culturas primárias dos fibroblastos humanos dermais por 24 horas. As concentrações de 750uM e 150 uM foram descartadas devido ao comportamento de instabilidade morfológica e / ou adesiva das células quando comparadas as duas concentrações mais baixas.



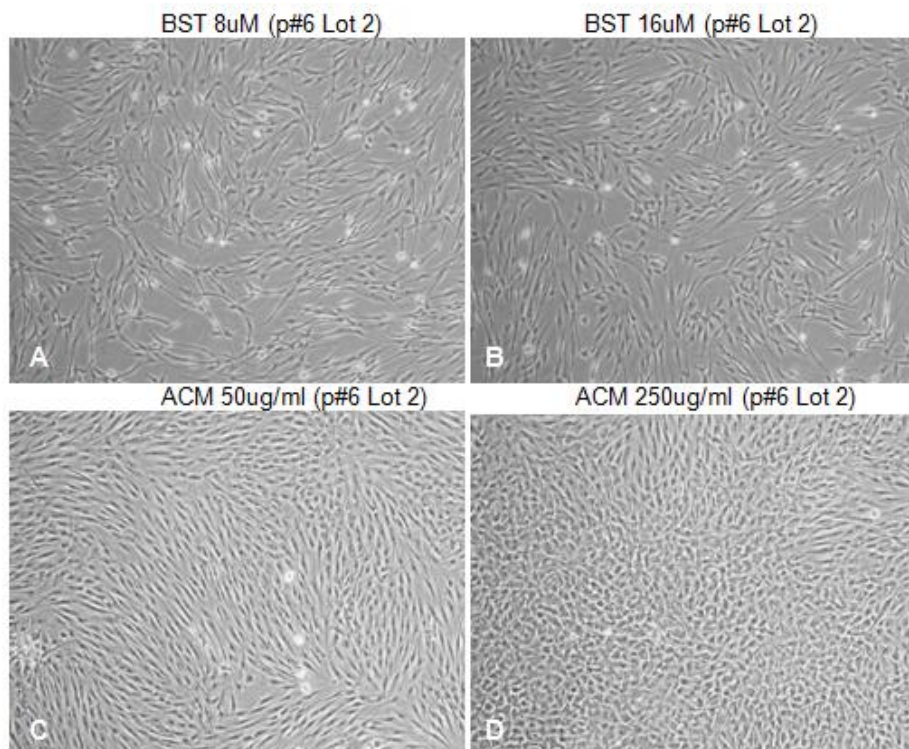
**Figura 32:** Falha na adesão celular dos fibroblastos dermais humanos primários após 24hr de tratamento farmacológico com a Giberelina em concentrações finais de 750uM (A) e 150uM (B). Monocamada íntegra de fibroblastos dermais humanos primários após 24hr de tratamento farmacológico com a Giberelina em concentrações finais de 30uM (C) e 6uM (D).  
 Fonte: Fotos do autor. Objetiva de 4X. Nikon DS L2

Apenas com a giberelina ocorreu esta inconformidade pois todos os demais fitocompostos apresentaram, após 24 horas de incubação, culturas com morfologia homogênea e monocamadas celulares sem sinais de desaderência ao poço conforme mostram as figuras 33 (A-D), 34 (A-D) e 35 (A –B). Pelo exposto, o ensaio de viabilidade celular foi realizado unicamente com a substância giberelina . As imagens da figura 32 mostram o aspecto das quatro concentrações selecionadas, quando monitoradas ao microscópio, e a inconformidade observada nas concentrações mais altas em relação à adesão das células de fibroblastos dermais humanos primários. (Figura 33 A-B).



**Figura 33:** Adesão normal aos poços e morfologia homogênea da monocamada de fibroblastos dermais humanos primários após 24hr de tratamento farmacológico com diferentes concentrações de (A/B) Aloeresina A 20uM e 100uM respectivamente; (C/D) Aloeresina B 50uM e 250uM respectivamente

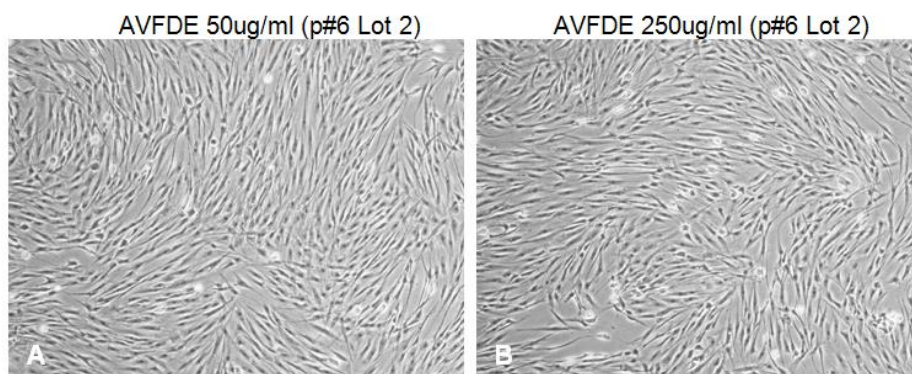
Fonte: Fotos do autor. Objetiva de 4X. Nikon DS L2



**Figura 34 (A-D):** Adesão normal aos poços e morfologia homogênea da monocamada de fibroblastos dermais humanos primários após 24hr de tratamento farmacológico com diferentes concentrações de (A/B) Betasitosterol 8uM e 16uM respectivamente; (C/D) Acemannan 50ug/ml e 250ug/ml respectivamente.

Fonte: Fotos do autor. Objetiva de 4X. Nikon DS L2

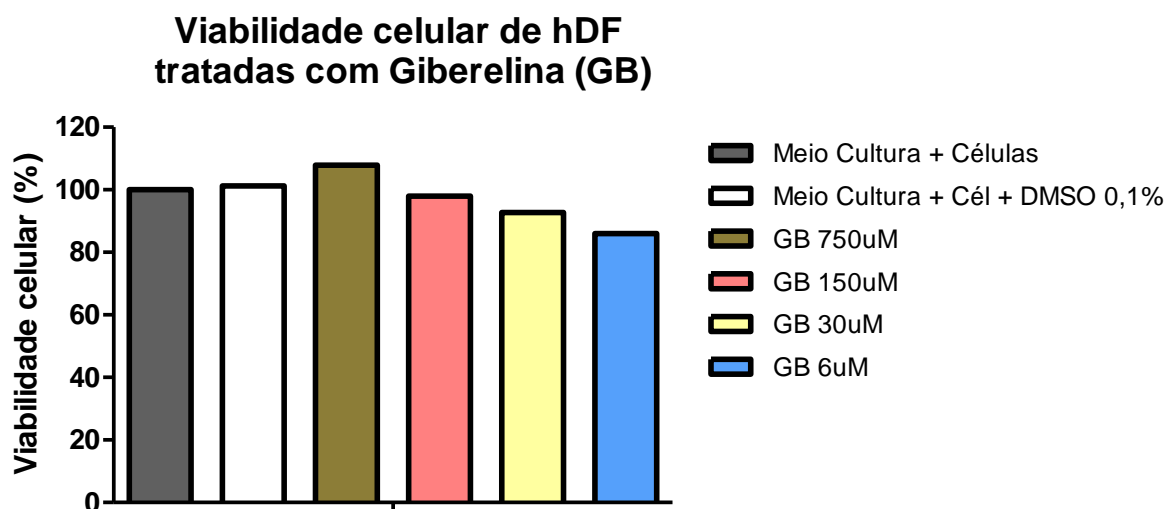




**Figura 35 (A-B):** Adesão normal aos poços e morfologia homogênea da monocamada de fibroblastos dermais humanos primários após 24hr de tratamento farmacológico com diferentes concentrações de (E/F) aloe vera extrato liofilizado concentrado 200:1 à 50ug/ml / 250ug/ml respectivamente.

Fonte: Fotos do autor. Objetiva de 4X. Nikon DS L2

A figura 36, mostra o comportamento do gráfico das quatro diferentes concentrações testadas da giberelina, o solvente controle (DMSO) e o meio de cultura puro. Embora tenham sido feitas apenas duas repetições do mesmo ensaio, o resultado demonstrou, curiosamente uma viabilidade celular aumentada para as concentrações mais altas que deveriam ser as mais tóxicas e de menor taxa de viabilidade celular. Inclusive, no gráfico, as concentrações mais baixas aparentaram uma viabilidade celular levemente menor que as mais altas. Inversamente, as imagens feitas das células nos poços demonstraram que os tratamentos com as menores concentrações não inviabilizaram a cultura das mesmas nem causaram o destacamento celular após 24 horas de incubação.



**Figura 36:** Gráfico do ensaio de viabilidade celular CCK-8 (Sigma). O ponto final da reação dá-se pela formação dos cristais de formazan de cor amarela à alaranjada de acordo com a concentração. As células viáveis aparecem coradas e são lidas em comprimento de onda duplo (correção do “background”) de 450 e 570nm. Resultados obtidos após dois experimentos independentes em triplicata e analisados pelo Prism Graph V.5.01

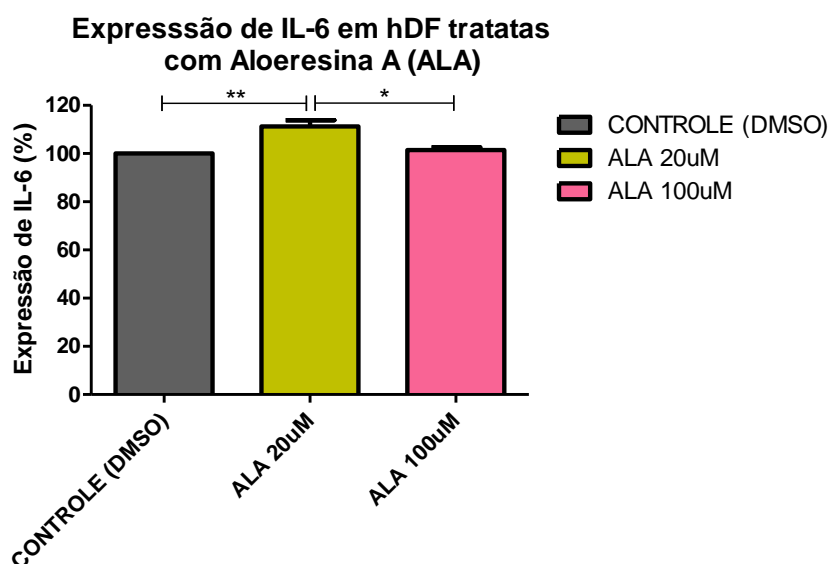
Supõe-se que os efeitos hormonais de crescimento / proliferação celular da giberelina, tenham sido responsáveis pela diferença observada na formação da quantidade de cristais de formazan, que, no caso, foi diretamente proporcional a maior densidade ótica observada nas concentrações mais altas. A estabilidade morfológica e a adesividade das células em cultura motivou a escolha das concentrações mais baixas.

As concentrações adotadas neste estudo para o composto giberelina (GA3) encontram-se na faixa de uso determinada por Reihil et al. (2015) relacionada aos efeitos anti inflamatórios da substância. (0,03uM à 300uM).

#### **4.2.4 Expressão do perfil de citocinas próinflamatórias em sobrenadante de cultura celular primária de hDF após tratamento com Aloeresina A (ALA)**

Na figura 37 foi observado que a cromona do tipo aloeresina A (ALA) à 20uM induziu significativamente, de modo dose dependente, a expressão de IL-6 em fibroblastos dermais quando comparado ao controle e a concentração de 100uM do composto.

Considerando que a IL-6 é uma citocina pró-inflamatória que induz o recrutamento celular de outros componentes da defesa imune inata tais como macrófagos, monócitos e neutrófilos, pode-se supor que a ALA exerça um efeito imunomodulador pró-resolutivo no caso de uma inflamação.



**Figura 37:** Nível percentual da expressão de IL-6 em Fibroblastos dermais humanos (hDF) após 24 horas de incubação e tratamento com Aloeresina A (ALA) 20uM e 100uM; (ELISA) Resultados obtidos a partir de replicata de três experimentos independentes.  $p < 0,05$  (0.0065); one-way ANOVA. e teste post hoc de Tukey .Prism Graph V.5.01

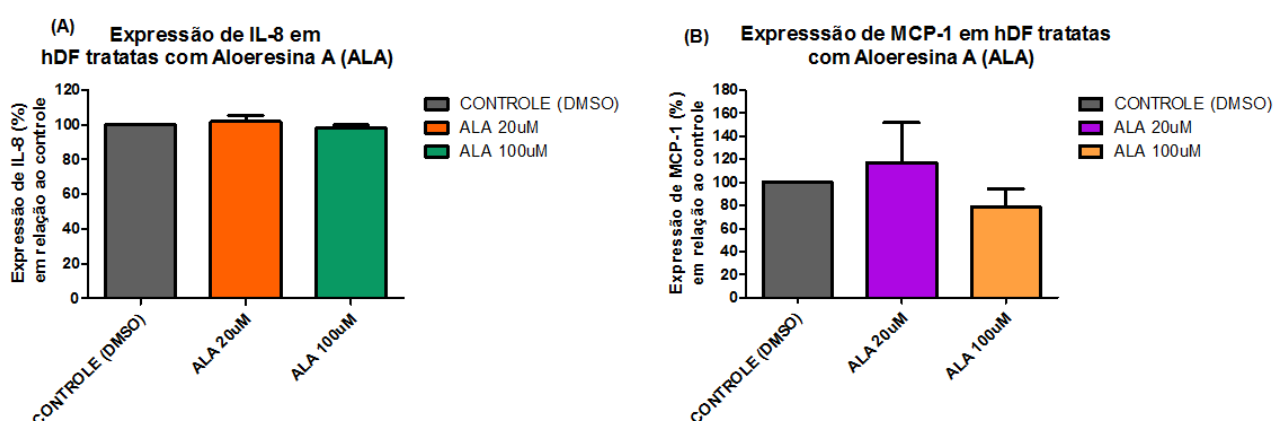
Por outro lado, a IL-6 no ambiente *In Vivo* pode também induzir uma resposta queratinocítica voltada à hiperproliferação por mecanismos autócrinos e parácrinos existentes entre fibroblastos dermais e queratinócitos. (PERERA et al., 2012). Esta hiperproliferação é mantida pela secreção de outras citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  secretadas continuamente pelos vários imunócitos atraídos pelo ambiente com células queratinocíticas hiperativas. Portanto, a ação pró-inflamatória ou pró-resolutiva da ALA, na concentração de 20uM dependerá não somente dos níveis locais de IL-6 mas também das condições do meio onde esta foi secretada. Em ensaio com hepatócitos murino Yagi et al.(2002) encontraram efeitos anti-inflamatórios diferentes daqueles encontrados neste estudo. O grupo ainda observou uma redução fraca da atividade “scavenger” para radicais livres usando uma concentração próxima aquela utilizada no experimento (IC<sub>50</sub> = 26uM  $\pm$  0,9). Estudos



de efeitos biológicos das cromonas em fibroblastos dermais primários humanos são escassos, daí a dificuldade em comparar com resultados prévios de estudos com linhagens celulares primárias humanas.

Embora seja necessário um número maior de repetições para confirmar os resultados obtidos neste estudo, os dados observados além de relevantes, trazem algo novo para o limitado acervo na área de investigação destes derivados frente a modelos *In Vitro* com células humanas.

A figura 38 (A e B) mostra que os níveis da citocina IL-8 e da quimiocina MCP-1 não apresentaram nível de expressão significativo pelos fibroblastos dermais quando tratados com as diferentes concentrações de ALA.

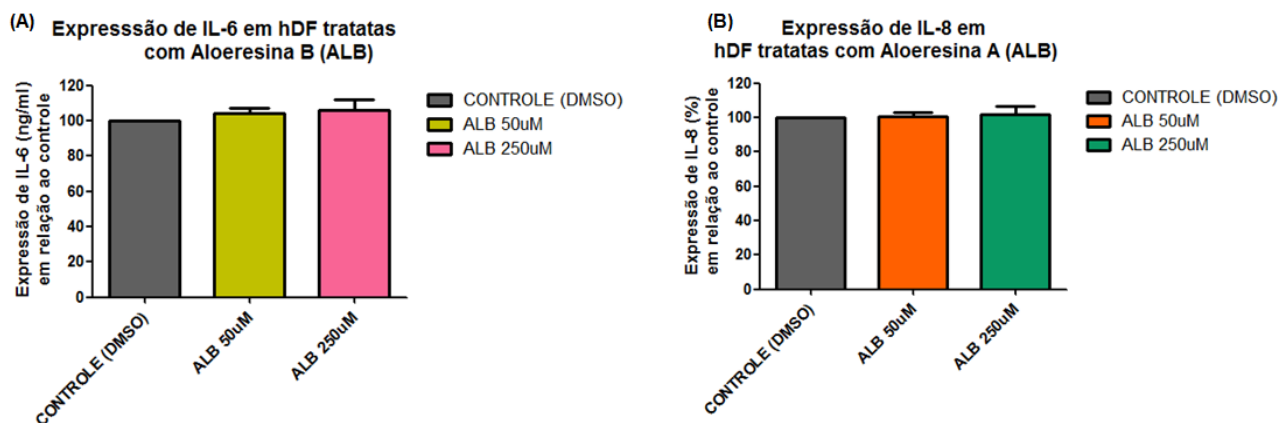


**Figura 38:** Nível percentual da expressão de citocinas (A) IL-8 e (B) MCP-1 em Fibroblastos dermais humanos (hDF) após 24 horas de incubação com e tratamento com Aloeresina A (ALA) 20uM e 100uM; (ELISA) Resultados obtidos a partir de replicata de três experimentos independentes.  $p < 0,05$ ; one-way ANOVA e teste post hoc de Tukey. Prism Graph V.5.01.  
Fonte: Dados do autor.

Embora sem força estatística e com desvio padrão muito alto, a concentração de 100uM da ALA mostrou uma forte tendência à redução da expressão da MCP-1, levando a supor que esta concentração pode apresentar um efeito benéfico quanto a redução do recrutamento de macrófagos e monócitos em processos inflamatórios.

#### 4.2.5 Expressão do perfil de citocinas próinflamatórias em sobrenadante de cultura celular primária de hDF após tratamento com Aloeresina A (ALB)

A figura 39 (A e B) mostra que os níveis das citocinas IL-6 e IL-8 não apresentaram níveis de expressão diferentes pelos fibroblastos dermais quando tratados com as diferentes concentrações de ALB.



**Figura 39:** Nível percentual da expressão das citocinas (A) IL-6 e (B) IL-8 em Fibroblastos dermais humanos (hDF) após 24 horas de incubação e tratamento com Aloeresina B (ALB) 50uM e 250uM; (ELISA) Resultados obtidos a partir de replicata de três experimentos independentes.  $p < 0,05$ ; one-way ANOVA e teste post hoc de Tukey. Prism Graph V.5.01.

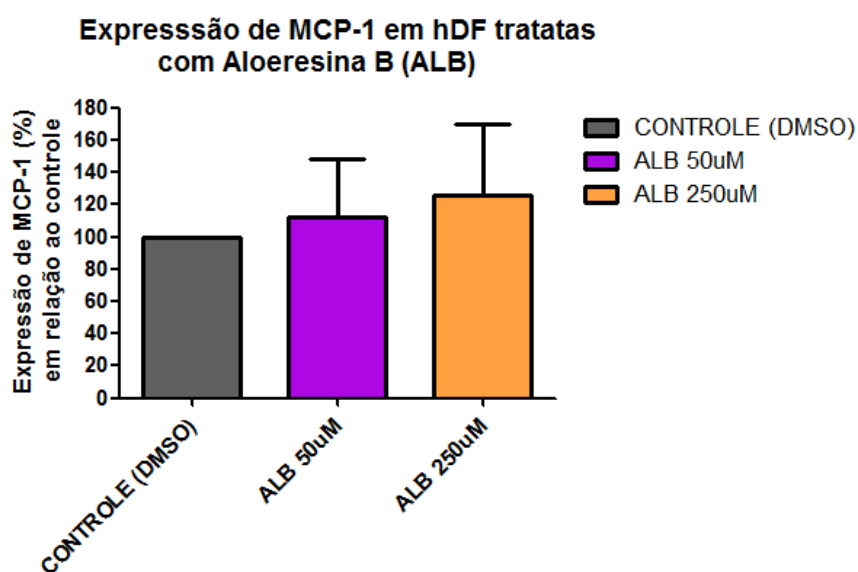
Fonte: Dados do autor.

A seguir, na figura 40, as concentrações da ALB mostram uma tendência ao aumento da expressão da MCP-1 de modo dose dependente embora o resultado não tenha força estatística e o desvio padrão seja muito alto. O resultado leva a supor que as concentrações de ALB pode suscitar o recrutamento de diferentes tipos celulares sensíveis à expressão de MCP-1 tais como macrófagos e monócitos em processos inflamatórios.

As implicações das interações quimiocinas receptores para as suas funções *In Vivo* são muito desafiadoras. Parece que muitos mecanismos reguladores podem entrar em cena para eliminar a redundância e dar a cada quimiocina uma função única e específica. Particularmente a CCL-2 medeia os seus efeitos através do seu receptor CCR2 que ao contrário da CCL2, é relativamente restrito a certos tipos celulares. Existem duas formas de splices alternativos de CCR2, ou seja, o CCR2A e o CCR2B que diferem apenas nas suas caudas C-terminais. CCR2A é a principal

isoforma expressa por células mononucleares e células do músculo liso vascular, enquanto os monócitos e células NK ativadas expressam a isoforma predominantemente CCR2B. É possível que CCR2A e CCR2B possam ativar vias de sinalização diferentes e exercerem ações diferentes. Deshmane et al., 2009).

Supõe-se então que a expressão de altos níveis de MCP-1 *In Vivo* pode elicitar diferentes respostas de acordo com o tipo de imunócito recrutado.

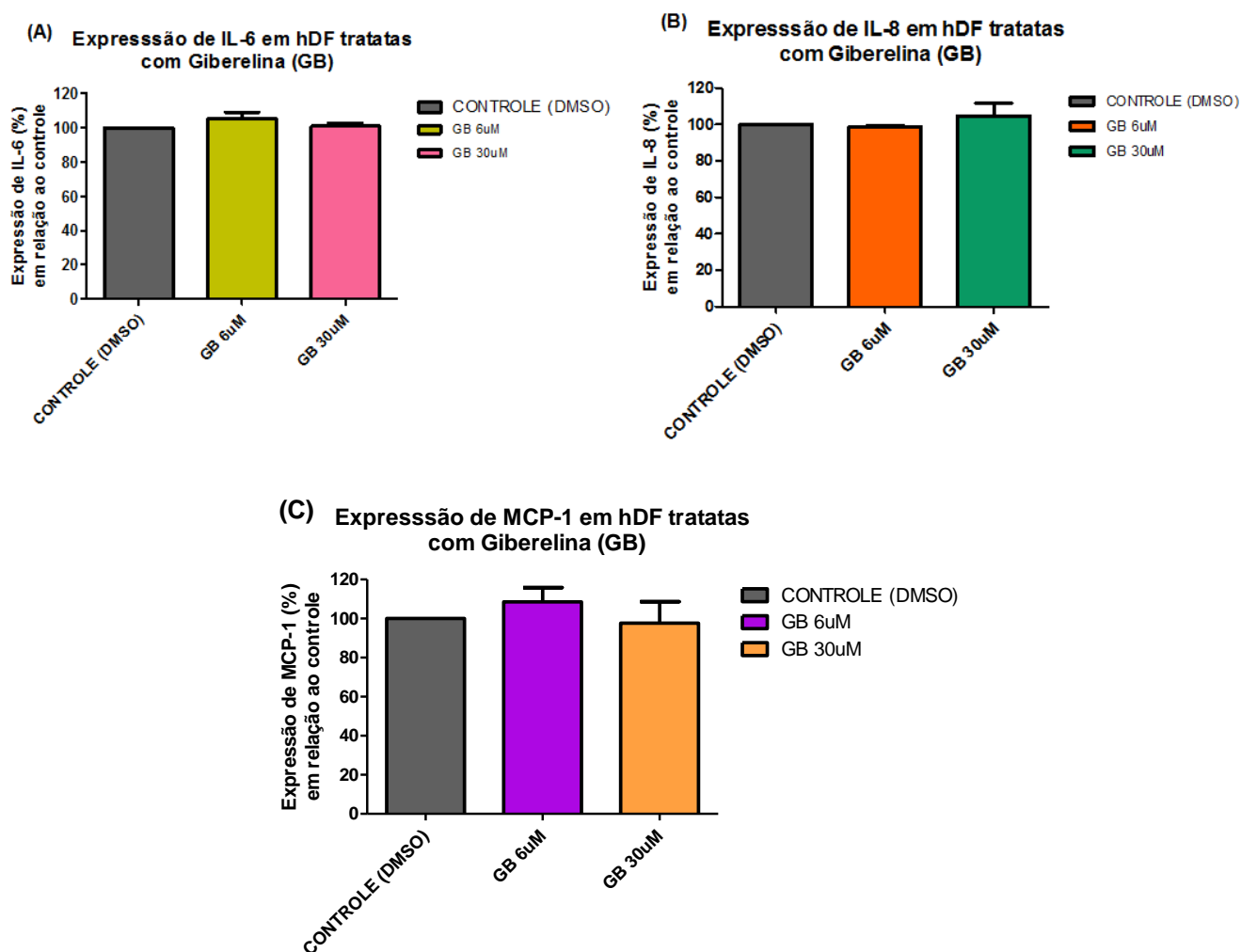


**Figura 40: Nível percentual da expressão da quimiocina MCP-1 em Fibroblastos dermais humanos (hDF)** após 24 horas de incubação e tratamento com Aloeresina B (ALB) 50uM e 250uM; (ELISA) Resultados obtidos a partir de replicata de três experimentos independentes.  $p < 0,05$ ; one-way ANOVA e teste post hoc de Tukey .Prism Graph V.5.01. Fonte: Dados do autor.

Além disso, dependendo do tecido onde a expressão de CCL2 ocorre, a quimiocina pode atuar como um mediador pro- ou anti-inflamatório. (RAMESH et al., 2013). A migração de tipos diferentes de macrófagos (M0, M1 ou M2) difere no sentido da quimiocina CCL2 em determinados processos patológicos. Na esclerose múltipla, por exemplo, a migração de M0 excede M1 e M2 no sentido de quimiocina CCL2, um dos fatores-chave para o recrutamento de monócitos em lesões da doença (VOGEL et al., 2014).

#### 4.2.6 Expressão do perfil de citocinas próinflamatórias em sobrenadante de cultura celular primária de hDF após tratamento com Giberelina (GB)

A figura 41 (A - C) mostra que os níveis da citocina IL-6, IL-8 e da quimiocina MCP-1 não apresentaram níveis de expressão diferentes entre os grupos de fibroblastos dermais quando tratados com as diferentes concentrações de GB.

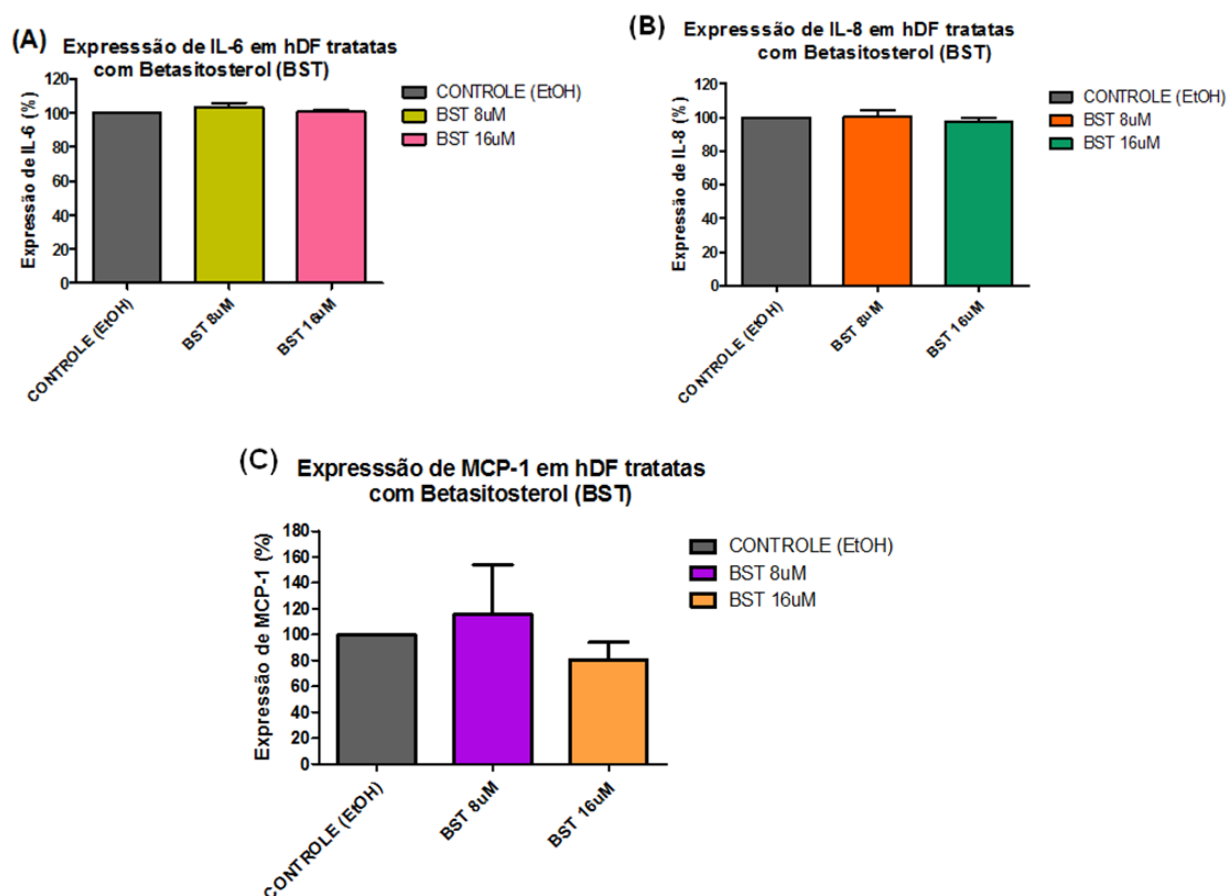


**Figura 41:** Nível percentual da expressão das citocinas (A) IL-6, (B) IL-8 e (C) MCP-1 em Fibroblastos dermais humanos (hDF) após 24 horas de incubação e tratamento com Giberelina (GB) 6uM e 30uM; (ELISA) Resultados obtidos a partir de replicata de três experimentos independentes.  $p < 0,05$ ; one-way ANOVA e teste post hoc de Tukey. Prism Graph V.5.01.

Fonte: Dados do autor.

#### 4.2.7 Expressão do perfil de citocinas próinflamatórias em sobrenadante de cultura celular primária de hDF após tratamento com Betasitosterol (BST)

A figura 42 (A - C) mostra que os níveis da citocina IL-6, IL-8 e da quimiocina MCP-1 também não apresentaram nível de expressão diferente entre os grupos de fibroblastos dermais quando tratados com as diferentes concentrações de BST.



**Figura 42: Nível percentual da expressão das citocinas (A) IL-6, (B) IL-8 e (C) MCP-1 em Fibroblastos dermais humanos (hDF) após 24 horas de incubação e tratamento com Betasitosterol (BST) 8uM e 16uM; (ELISA) Resultados obtidos a partir de replicata de três experimentos independentes.  $p < 0,05$ ; one-way ANOVA e teste post hoc de Tukey. Prism Graph V.5.01.**

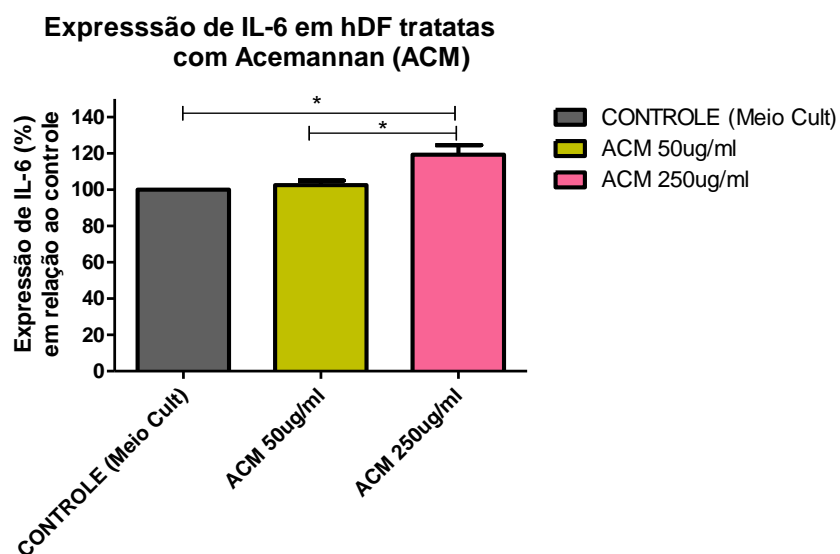
Fonte: Dados do autor.

A concentração de BST 16uM mostrou uma tendência à redução da expressão da MCP-1 de modo embora o resultado não tenha força estatística e o desvio padrão tenha sido muito alto. O resultado leva a supor que 16uM de BST pode diminuir o recrutamento de diferentes tipos celulares incluindo macrófagos e monócitos em processos inflamatórios.

#### **4.2.8 Expressão do perfil de citocinas próinflamatórias em sobrenadante de cultura celular primária de hDF após tratamento com diferentes concentrações de Acemannan (ACM)**

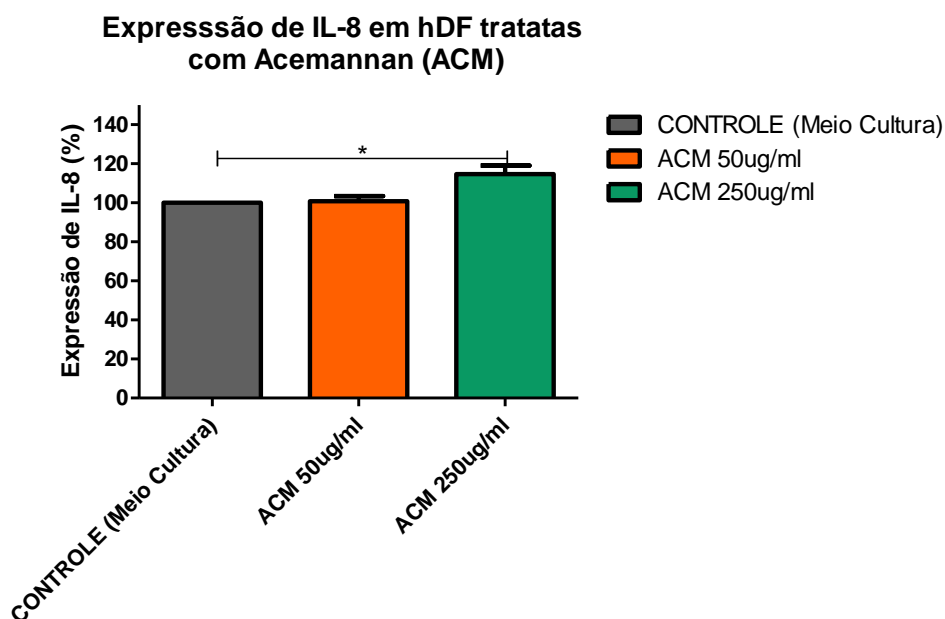
Conforme mostra a figura 43, a concentração de 250ug/ml de Acemannan testada em fibroblastos humanos dermais demonstrou um efeito indutor sobre a expressão de IL-6. Já o acemannan 50ug/ml demonstrou nenhum efeito quando comparado ao controle sem tratamento.

Os polissacarídeos tipo acemannan consistem de um “esqueleto” estrutural típico dos polissacarídeos acetilados formados principalmente de ligações  $\beta$ -(1,4) mas que podem também formar ligações  $\beta$ -(1,3) e  $\beta$ -(1,4). (NI Y et al. 2004). Estas estruturas compõem o grupo de polissacarídeos chamados  $\beta$ -glucans que apresentam como efeito biológico mais pronunciado o aumento das atividades fagocíticas e proliferativas de monócitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e demais fagócitos granulócitos. (NOVAK; VETVICKA, 2008). Os  $\beta$ -glucans são os principais componentes do grupo denominado Modificadores de Resposta Biológica (BRM) com marcada ação imunomoduladora. Em concordância com os resultados obtidos no presente estudo, Kougias et al (2001) demonstrou que glucans à concentração de apenas 1ug/ml pode estimular fibroblastos dermais humanos quanto a sua atividade ligadora à NF-kB nuclear e a expressão gênica de IL-6 de modo tempo – dependente através de receptores membranares do tipo  $\beta$ -(1,3) glucan. Baseado nas evidências de estudos prévios, sugere-se que o composto acemannan modulou diretamente as atividades funcionais dos fibroblastos dermais humanos, levando à indução da secreção de citocinas típicas destas células (IL-6, IL-8, MCP-1) através dos seus receptores membranares de reconhecimento padrão (PPRs). Segundo Novak e Vetvicka (2008), a liberação destas citocinas representa a expressão do papel recrutador e imunopotencializador dos  $\beta$ -glucans.



**Figura 43: Nível percentual da expressão de IL-6 em Fibroblastos dermais humanos (hDF) após 24 horas de incubação e tratamento com Acemannan (ACM) 50ug/ml e 250ug/ml. (ELISA)** Resultados obtidos a partir de replicata de três experimentos independentes.  $p < 0,05$  (0.0132); one-way ANOVA. e teste post hoc de Tukey .Prism Graph V.5.01

A figura 44 mostra um aumento significativo da expressão da citocina IL-8 por parte dos fibroblastos dermais quando tratados AL com ACM 250ug/ml. A mesma concentração induziu significativamente a expressão de IL-6. A indução de grandes quantidades de IL-8 em fibroblastos dermais é possível após o estímulo externo com IL-1, LPS ou quando é feita uma co-cultura destas células com linfócitos T. Por outro lado, a secreção de IL-6 é alcançada através do estímulo conjunto de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . (SAALBACH et al., 2009, SPÖRRI et., 1999).



**Figura 44:** Nível percentual da expressão de IL-8 em Fibroblastos dermais humanos (hDF) após 24 horas de incubação e tratamento com Acemannan (ACM) 50ug/ml e 250ug/ml. (ELISA) Resultados obtidos a partir de replicata de três experimentos independentes.  $p < 0,05$  (0.0225); one-way ANOVA. e teste post hoc de Bonferroni .Prism Graph V.5.01

Em experimento conduzido por Spörri et al. (1999) foi observado um efeito agonista de um receptor de citocina solúvel (sIL-6R $\alpha$ ) que gerou aumento na expressão de IL-6 e MCP-1, aumento agudo e transitório das concentrações intracelulares de cálcio mas não alterou os níveis de IL-8 em fibroblastos dermais, levando o autor a inferir a existência de uma via estimulatória alternativa para o IL-8. Embora o estudo citado sugira a existência de vias estimulatórias distintas que podem gerar uma relação inversa na expressão das citocinas IL-6 e IL-8, no presente experimento ambas tiveram suas expressões aumentadas, inferindo-se uma ação sinérgica no recrutamento de imunócitos para os sítios inflamatórios; em particular a IL-8 como recrutadora de neutrófilos e células T via CXCR1 e CXCR2. (MABUCHI et al., 2012).

Em psoríase, IL-8 e TNF- $\alpha$  são considerados citocinas pró-angiogênicas de fase inicial da doença, assim como a IL-17 em estágio mais adiantado da manifestação psoríase. Tais citocinas constituem alguns dos principais desencadeadores, juntamente com o VEGF secretado pelos queratinócitos, responsáveis pelo aumento da formação de novos vasos ou neoangiogênese na psoríase. (PERERA et al., 2012; GUÉRARD; POULIOT, 2012; BALATO et al., 2012).

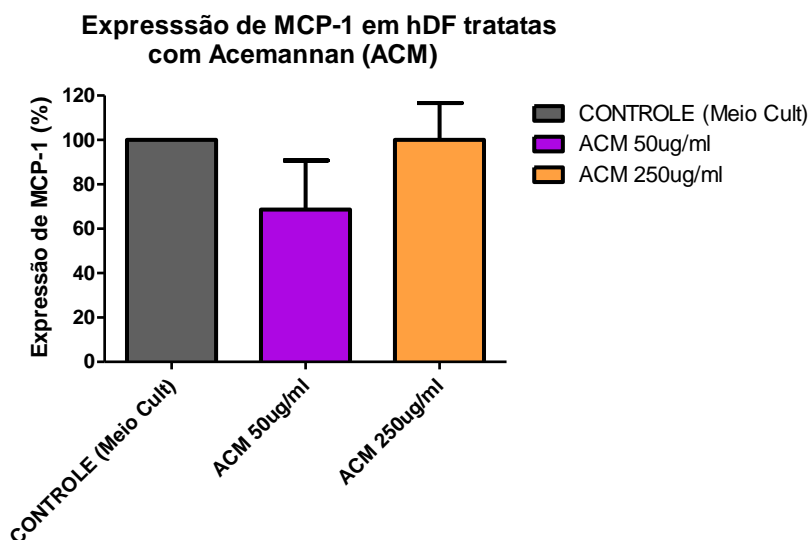


A neovascularização intensa é marcadamente uma das características de maior destaque nas inflamações observadas em lesões psoríicas. Um dos sinais histológicos típicos que ilustra a angiogênese na psoríase é o sinal de Auspitz que são pequenos pontos de sangramento quando a escamação é removida. (GUPTA et al., 2011). Isso ocorre porque os capilares sob a lesão psoríase localizam-se muito perto da superfície da pele, e ao remover a escama superficial traz à tona os capilares, causando pequenas hemorragias. Embora o sinal de Auspitz seja um sinal clínico da psoríase, este é não-específico da doença já que pode também ser encontrado em outros distúrbios descamativos, tais como a doença de Darier e queratose actínica. (WAGNER et al., 2010).

Um outro fator relacionado a angiogênese causada por citocinas próinflamatórias como IL-6, IL-8 e o  $TNF\alpha$ , refere-se as grandes quantidades de ROS e NO produzidas pelos queratinócitos e células inflamatórias, principalmente os neutrófilos, em lesões inflamatórias psoríicas. Este estresse oxidativo conduz à expressão de heme oxigenase-1 (HO-1), uma enzima estresse induzível, de propriedades antioxidante, citoprotectora e anti-inflamatória encontrada super expressa em pele psoríica. HO-1, por sua vez, contribui para a angiogênese na psoríase, por ser um mediador da produção e atividade de VEGF nas células endoteliais. (PELLE E, MAMMONE T, MAES D, et al., 2005; WOJAS-PELC A, MARCINKIEWICZ J.,2006).

A seguir, a figura 45 mostra a tendência do ACM puro na concentração de 50ug/ml em diminuir a expressão do MCP-1 pelas células hDF. Embora sem força estatística e com alto desvio padrão, esta concentração reduz visivelmente a expressão MCP-1. Efeito semelhante, porém com força estatística, foi observado com o uso do AVFDE à 50ug/ml. Analisando os resultados e comparando-os, os dados sugerem que o ACM pode ter sido um dos compostos responsáveis pela forte inibição do MCP-1 no extrato concentrado de aloe vera (AVFDE). Embora o lote de AVFDE utilizado no experimento não declare conter teores de ACM dentro do especificado pelo IASC ( $\geq 10\%$ ), o resultado sugere que ACM de modo dose dependente é um dos responsáveis pela queda dos níveis de expressão do MCP-1 em ambos os compostos.

Este efeito pode ser interpretado como um fator protetor do indivíduo quanto à capacidade de inibição do início de um processo inflamatório devido a uma menor eficácia no recrutamento de macrófagos do tipo M1 ativados.



**Figura 45: Nível percentual da expressão de MCP-1 em Fibroblastos dermais humanos (hDF) após 24 horas de incubação e tratamento com Acemannan (ACM) 50ug/ml e 250ug/ml. (ELISA)** Resultados não significativos (ns) obtidos a partir de replicata de três experimentos independentes.  $p < 0,05$  (0.0830); one-way ANOVA. e teste post hoc de Tukey .Prism Graph V.5.01

A forte tendência à redução da expressão do MCP-1 em hDF após o tratamento com AVFDE observado na figura 27 pode levar a algumas suposições tais como: 1) um outro princípio ativo do aloe com ação imunomoduladora sobre a MCP-1 não abordado neste estudo pode ter atuado sinergicamente no AVFDE quando o comparamos ao ACM; 2) outros polissacarídeos encontrados em menores concentrações tais como o glucomannan (3,2%); galactomannan (3,9%); maloil glucans e/ou arabinana (3,8-3,9%) podem ter exercido um efeito aditivo ao ACM no caso do AVFDE. Isto porque o polissacarídeo puro do tipo ACM manifestou também um efeito com tendência à redução da expressão de MCP-1 muito semelhante àquele observado no gráfico da figura 45. O alto desvio padrão observado, pode ter corroborado para não significância do efeito redutor do ACM sobre a expressão do MCP-1.

A relação entre a expressão das citocinas IL-6, IL-8, a quimiocina MCP-1 e os potenciais sítios de reconhecimento dos polissacáridos empregados no estudo por

receptores da superfície celular em fibroblastos humanos dérmicos (hDF) pode ser discutida de acordo com algumas evidências encontradas em literatura.

Conforme foi visto na introdução deste trabalho, os  $\beta$ -Glucans, como o acemannan, glucomannan e galactomannan podem exibir várias atividades biológicas, incluindo a imunomodulação e efeitos anti-inflamatórios que por sua vez são mediados pela interação com receptores de superfície celular específicos.

Acemananas, glucomananas, arabinanas e outros  $\beta$ -Glucans são reconhecidos por diversos tipos de receptores imunes, incluindo o receptor do complemento 3 (CR3), o receptor de manose (MR), Dectina-1, lactosilceramida, receptores do tipo Toll (TL-4), e outros receptores de Lectina tipo C (CLRs) que ativam um grupo de células imunitárias, incluindo macrófagos, neutrófilos, monócitos, células NK e células dendríticas em resposta a diferentes tipos de PAMPs (CHAN et al., 2009; WEINDL et al., 2010).

Receptores de mananas, glucanas e galactanas, além de outros sítios de ligação não específicos foram também encontrados em outros tipos celulares incluindo fibroblastos, queratinócitos e diferentes células epiteliais. De fato, já foi observado que queratinócitos e fibroblastos expressam receptores do tipo CLRs e TLR-4, sugeridos como sendo essenciais para o reconhecimento de galactose formadora de ligações O – manosil poliméricas tais como a acemanano, galactomanano e glucomanano (SONG et al., 2002).

Corroborando com o estudo anterior, Yao et al. (2015) demonstrou em publicação recente que todos os membros da família TLR-1/10 são constitutivamente expressos em fibroblastos de pele humana, incluindo o TLR-4. O grupo também provou que o desencadeamento de sinais através dos receptores TLR-1,-2,-3 e -4 induz a ativação de MAPK e  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  em fibroblastos e a indução dos TLR-1 à -9 induz à produção de IL-6 e IL-8 de uma forma dose-dependente.

De acordo com estes dados, a expressão elevada de IL-6 e IL-8 no presente estudo poderia ser atribuída parcialmente à indução de TLR-4 via interação com receptores

CLRs expressos constitutivamente na superfície da membrana celular dos hDF primários.

Outra explicação possível para o aumento de expressão de IL-6 observado no presente estudo via reconhecimento e indução pelos polissacáridos sobre os receptores da superfície celular dos fibroblastos dermais cultivados baseia-se nos achados de Kougias et al. (2001). O grupo demonstrou a presença de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) para ligações glicosídicas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3)-D-glucans fúngicas (originadas de *Saccharomyces cerevisiae*) sobre a superfície de fibroblastos dermais. Em última análise, a ativação destes PRRs conduziria a capacidade modulatória destes ligandos em ativar as vias de sinalização pró-inflamatória e imunorreguladora (NF-kB e de NF-interleucina 6) em células imunológicas competentes por interação com receptores específicos.

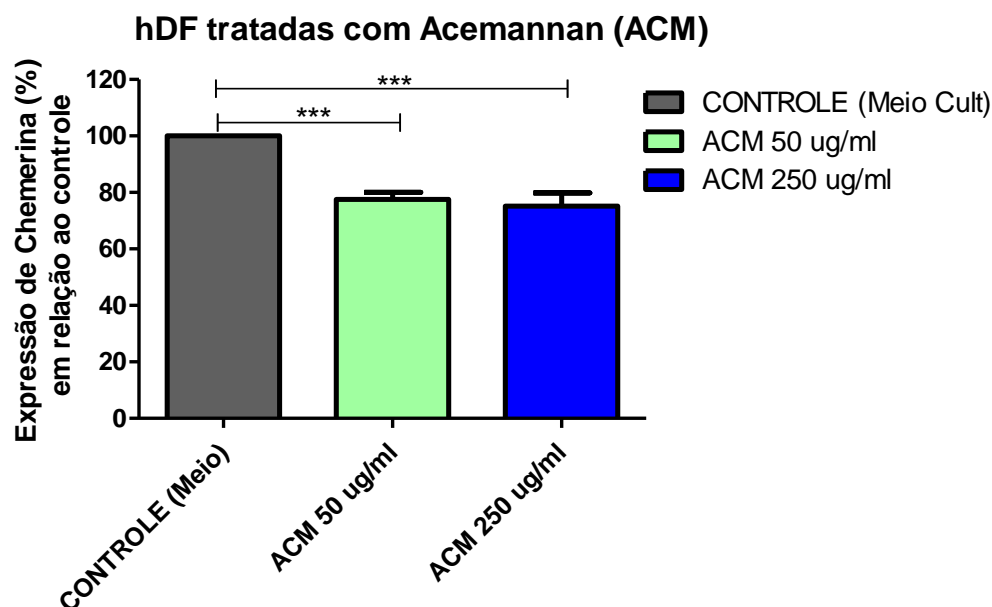
Um outro sítio específico que também foi descrito em queratinócitos e fibroblastos dermais é o da lectina alfa-L-Ramnose. Ao adicionar oligo- e polissacáridos ricos em ramnose (RROPs) sobre fibroblastos mostrou-se que estes estimularam a proliferação das células e aumentaram a biossíntese da matriz extracelular, sugerindo que este sítio lectina funciona como um receptor "verdadeiro" ao transmitir mensagens para o interior da célula, regulando negativamente a expressão de vários fatores de crescimento, moléculas de adesão e proteínas de matriz extracelular envolvidas na atividade pró-tumoral e / ou processos fibróticos. (FAURY et al., 2008).

Choi et al. (2016) descobriram que fibroblastos dermais humanos expressam receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) para  $\beta$ --D-glucans, também através do receptor de Lactosilceramida que modula a atividade funcional dessas células. Lactosilceramida e  $\beta$ --D-glucans induzem várias respostas celulares In Vitro, incluindo a produção de citocinas, o "burst" respiratório e a ativação do fator nuclear NFkB. Este PRR pode desempenhar um papel na imunomodulação  $\beta$ --D-glucan induzida e na resposta inata à fungos patogênicos, particularmente em células não imunes como os fibroblastos dermais. (BROWN, 2006).

Hespanhol et al. (2005) relataram a expressão de receptores de manose (MRs) em fibroblastos dermais e o seu envolvimento em resposta à invasão de *Leishmania (L.) amazonensis*. Considerando tal observação, MRs podem representar um dos sítios de ligação para (1→3)-β-D-glucans encontrados tanto em AVFDE como também, em menor concentração, na acemanana que possui preponderantemente ligações do tipo (1→4)-β-D-glucans.

Digno de nota é o fato que até hoje não foi demonstrado que fibroblastos dermais expressam receptores dos tipos CR3 ou Dectina-1 em suas superfícies. Isto sugere que outros receptores tipo Lectina C (CLRs) desencadeiam as vias de sinalização distintas que induzem a expressão de citocinas específicas destas células (IL-6, IL-8, MCP-1 etc.) e que determinam os destinos de polarização das células T e / ou induzem vias de sinalização que ativam diretamente o fator nuclear-kB. (BROWN, 2006).

#### 4.2.9 Expressão da proteína chemerina em sobrenadante de cultura celular primária de hDF após tratamento com diferentes concentrações de Acemannan (ACM)



**Figura 46:** Nível percentual da expressão da proteína chemerina em Fibroblastos dermais humanos (hDF) após 24 horas de incubação e tratamento com Acemannan (ACM) 50ug/ml e 250ug/ml. (ELISA) Resultados obtidos a partir de replicata de três experimentos independentes.  $p < 0.0001$ ; one-way ANOVA.

No gráfico da figura 46 o polissacarídeo acemannan (ACM) inibe a chemerina de modo dose dependente em cerca de 20% em ambas as doses testadas. Este dado sugere que os efeitos inibidores sobre a expressão de chemerina por parte do ACM podem compor uma estratégia terapêutica alternativa e / ou complementar, combinada ou não a outros fármacos, com intuito de coibir etapas iniciais de doenças inflamatórias intermediadas pela chemerina tais como a psoríase.

A expressão da proteína chemerina pode ser observada em vários tipos celulares como as células endoteliais (PAROLINI et al., 2007; GONZALVO-FEO et al., 2014; AKAMATA et al., 2015) queratinócitos epidérmicos In Vivo ou cultivados em Equivalentes de Pele viva ou LSE (Living Skin Equivalents) (NAGPAL et al., 1997; BANAS et al., 2014), fibroblastos dérmicos humanos (ALBANESI et al., 2009; AKAMATA et al., 2015) e murínicos. (YIN et al., 2014).

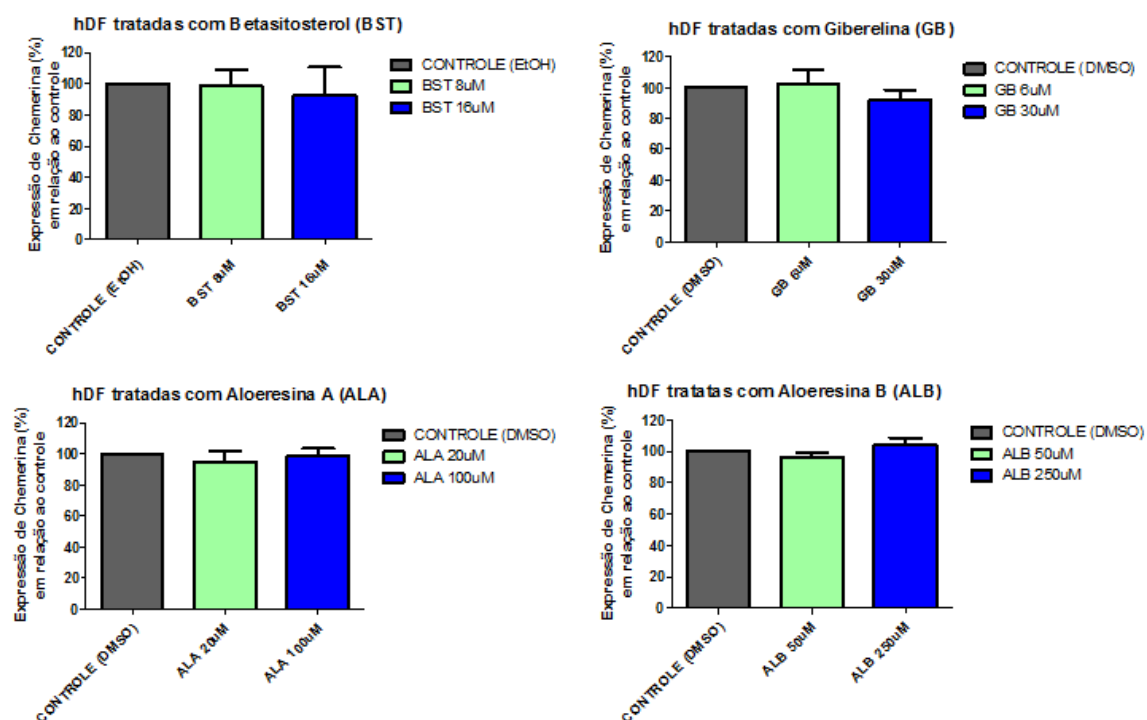
A expressão constitutiva da chemerina em fibroblastos foi documentada por Albanesi et al (2009) ao investigar os mecanismos imunopatológicos das fases iniciais da psoríase. O estudo revelou que a chemerina, primariamente secretada por fibroblastos dermais, atuava de forma a recrutar células dendríticas plasmacitóides, produtoras de IFN tipo alfa, desencadeando outros eventos imunes que elicitavam a psoríase em indivíduos geneticamente pré dispostos. Neste mesmo microambiente, mastócitos e células endoteliais contribuem em menor extensão para produção de chemerina. (ALBANESI e PASTORI, 2010).

A figura 47 a seguir mostra o perfil do efeito dos demais fitocompostos do Aloe vera sobre os níveis de expressão da chemerina.

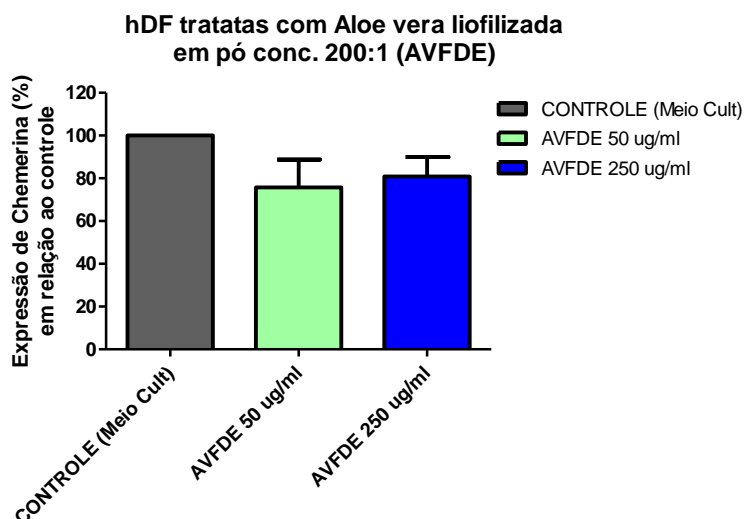
Nenhuma das cromonas, nem os fitohormônios nas condições e concentrações testadas, alteraram de modo estatisticamente significativa a expressão da proteína medidos em sobrenadante de cultura de fibroblastos dermais primários humanos.

No gráfico mostrado na figura 48, onde consta o nível de expressão de chemerina após o tratamento com o extrato concentrado 200:1 de aloe vera (AVFDE), embora sem significado estatístico e elevado desvio padrão, percebe-se uma tendência semelhante ao resultado obtido no gráfico do ACM puro.

Supõe-se que este fato tenha ocorrido devido a presença de ACM e outros polissacarídeos. Ao mesmo tempo, sugere que a presença do ACM é um fator determinante no efeito redutor da expressão da chemerina.



**Figura 47: Nível percentual da expressão da proteína chemerina em Fibroblastos dermais humanos (hDF) após 24 horas de incubação e tratamento com Betasitosterol (BST) 8uM e 16uM; Giberelina (GB) 6uM e 30uM; Aloeresina A (ALA) 20uM e 100uM; Aloeresina B (ALB) 50uM e 250uM. (ELISA) Resultados obtidos a partir de replicata de três experimentos independentes analisados via one-way ANOVA.**



**Figura 48: Nível percentual da expressão da proteína chemerina em Fibroblastos dermais humanos (hDF) após 24 horas de incubação e tratamento com Aloe vera ext.con.c 200:1 em pó liofilizado (AVFDE) 50ug/ml e 250ug/ml. (ELISA) Resultados obtidos a partir de replicata de três experimentos independentes. one-way ANOVA e teste post hoc de Tukey .Prism Graph V.5.01. Fonte: Dados do autor.**



Em termos quantitativos, o gráfico da figura 48 nos induz à suspeita que mesmo o AVFDE à 250ug/ml não contém ACM em concentração comparável aos efeitos redutores do ACM puro à 50ug/ml.

#### 4.2.10 Expressão da proteína chemerina em sobrenadante de cultura celular primária de hDF 24 hr após tratamento com Calcitriol (Vit.D3) 1uM e ácido all trans-retinóico (ATRA) 5uM

Embora os experimentos mostrados a seguir na figura 49 não tenham apresentado nenhum valor significativo, o objetivo foi comprovar, em alguma extensão, os efeitos indutores na expressão de chemerina a partir do uso do calcitriol 1uM e do ácido trans retinóico 5 uM conforme o artigo de referência selecionada . (ALBANESI et al., 2009).

Mesmo que discretos, os resultados também confirmaram um aumento nas concentrações basais da chemerina após indução com o compostos indicados. calcitriol 1uM.

As concentrações basais de chemerina detectadas para os fibroblastos dermais sem tratamento variaram na faixa de 120pg/ml à 315pg/ml enquanto que Albanesi et al (2009) encontrou um valor de  $321 \pm 31$  , um pouco acima da faixa encontrada neste estudo. Isto pode ter ocorrido devido a diferenças no cultivo, número da passagem celular , composição do meio de cultura ou ainda o tipo de kit ELISA utilizado no doseamento.

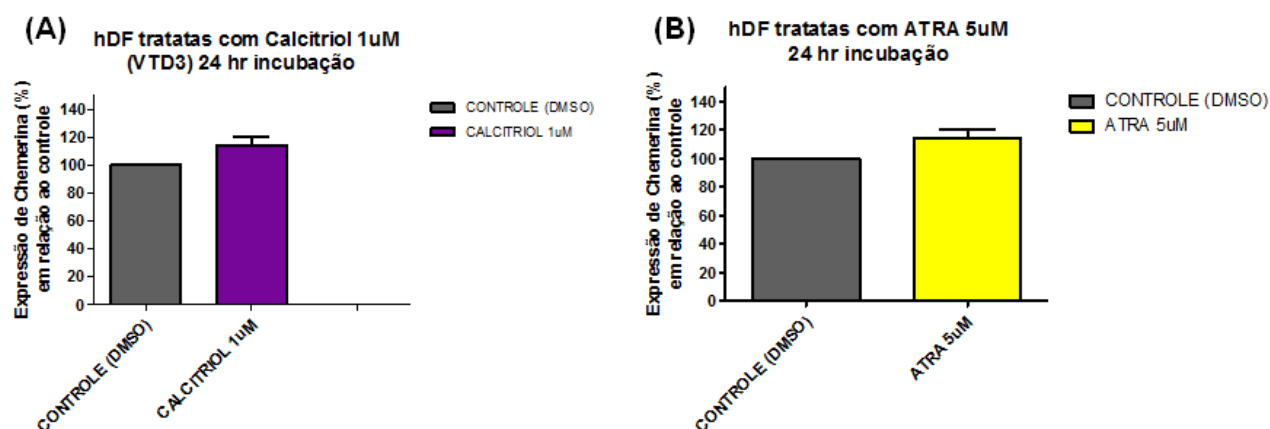
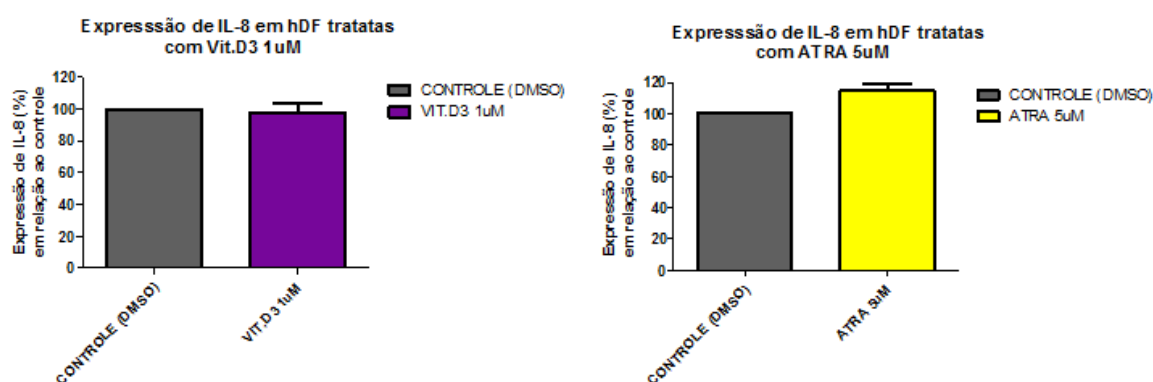


Figura 49: Nível percentual da expressão da proteína chemerina em Fibroblastos dermais humanos (hDF) após 24 horas de incubação (a) Calcitriol 1uM; (b) ATRA 5uM. Resultados obtidos a partir de replicata de três experimentos independentes. (ELISA). Fonte: Dados do autor. Graph Prisma V.5.01

#### 4.2.11 Expressão do perfil de citocinas próinflamatórias do tipo IL-8 em sobrenadante de cultura celular primária de hDF 24 hr após tratamento com Calcitriol (Vit.D3) 1 $\mu$ M e ácido all trans-retinóico (ATRA) 5 $\mu$ M

A figura 50 mostra que os níveis de expressão da citocina IL-8 não apresentaram alteração significativa pelos fibroblastos dermais quando tratados com Calcitriol 1 $\mu$ M e ácido All Trans Retinóico (ATRA) 5 $\mu$ M após 24 horas de incubação. ATRA demonstrou uma tendência ao aumento da expressão da IL-8 embora sem força estatística.



**Figura 50:** Nível percentual da expressão das citocinas pró inflamatórias IL-8 em Fibroblastos dermais humanos (hDF) após 24 horas de incubação Calcitriol 1 $\mu$ M; e ATRA 5 $\mu$ M . Resultados obtidos a partir de replicata de três experimentos independentes. (ELISA) Graph Prisma V.5.01  
Fonte: Dados do autor.

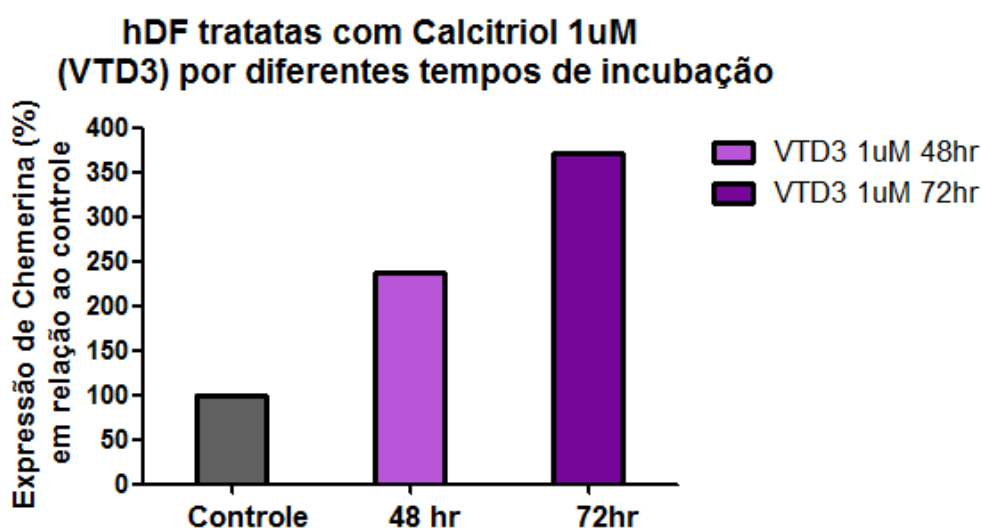
V.5.01. Fonte: Dados do autor.

#### 4.2.12 Expressão da proteína chemerina em sobrenadante de cultura celular primária de hDF após tratamento com Calcitriol (Vit.D3) 1 $\mu$ M por diferentes tempos de incubação

Um dos fatores que levou a baixa expressão da chemerina mostrada na figura 49 foi o fato dos artigos que balizaram a escolha da concentração de uso do calcitriol como indutor da secreção de chemerina, não mencionarem a meia vida do fármaco em meio de cultura. Esta é equivalente à  $\pm 10$ hr (no plasma humano é de  $\pm 7$ hr) e as incubações do estudo prévio eram feitas por 24 horas, sem atentar para o acréscimo de mais uma dose de calcitriol 1 $\mu$ M, no tempo equivalente à 10<sup>a</sup>hr de incubação. (LIPS, 2007; GARCIA et al., 2011). Por este motivo, procedeu-se com um segundo experimento onde as células foram estimuladas a cada 10hr com doses de calcitriol 1 $\mu$ M utilizando diferentes tempos de incubação (48 e 72 horas).

O resultado mostrado na figura 51 foi um aumento expressivo nas concentrações de chemerina em relação aos níveis basais. Embora tenha sido feito somente uma vez, este dado abriu as possibilidades do estudo para uma nova estratégia que seria tratar as células inicialmente por 48 hr, adicionar calcitriol a cada 10 hr para posteriormente tratar as células novamente com os fitoconstituintes do aloe vera e verificar os níveis finais de chemerina para cada tratamento.

Cabe ainda ressaltar que a concentração de 1uM de Calcitriol, Vitamina D3 (VTD3) ou 1,25 (OH)<sub>2</sub>VTD3 utilizada nos experimentos destes estudo é considerada uma dose baixa quando comparada com ensaios In Vitro recentes utilizando fibroblastos dermais. (SLOMINSKI et al., 2016).



**Figura 51:** Nível de expressão da proteína chemerina em Fibroblastos dermais humanos (hDF) após diferentes tempos de incubação: 48hr e 72hr. Calcitriol 1uM. Resultados obtidos a partir de uma única replicata. (ELISA)

Mesmo assim, em indivíduos normais esta concentração dificilmente seria alcançada sem causar uma típica intoxicação por hipervitaminose D elicitando efeitos como a hipercalcemia, hipercalcúria e hipercalcificação dos órgãos.

Os valores considerados para avaliação do status sorológico da Vitamina D3 (VTD3) na população em geral sem considerar grupos especiais de indivíduos (idosos, lactantes, enfermos) ou condições de saúde específicas (estados mórbidos) variam

na faixa de 75-125pM (30-50pg/ml) de 1,25 (OH)<sub>2</sub>VTD<sub>3</sub> medidos pelo seu precursor plasmático imediato o calcidiol 25(OH)VTD<sub>3</sub>. Este último corresponderia à faixa de 30-50nM (16-20ng/ml) para os valores de 1,25 (OH)<sub>2</sub>VTD<sub>3</sub> citados. (LIPS, 2007; MCKENNA; MURRAY, 2013).

Por este motivo foram desenvolvidos e clinicamente aprovados vários análogos da vitamina D<sub>3</sub> (calcipotriol e o tacalcitol) passíveis de agir em doses nanomolares da 1,25 (OH)<sub>2</sub>VTD<sub>3</sub> após sua administração e com reduzidos efeitos adversos, indicados para vários tipos de tratamentos inclusive para a psoríase leve à moderada.

Dentre os análogos destacam - se o calcipotriol e o tacalcitol. (MITRA; ATILLASOY, 2012; LEYSSENS; VERLINDEN e VERSTUYf, 2014). O calcipotriol pode ser usado em doses mais altas que a VTD<sub>3</sub> tradicional mas, ainda assim, seu uso não pode exceder 5 mg / semana. O fármaco é disponibilizado na forma creme e pomada 50ug/g ou solução cutânea de 50 ug/ ml com dose semanal máx. de 50mg para o creme ou 60ml para a solução.(Fonte: LEO Pharmaceutical Products, Dinamarca).

Os resultados alcançados no presente estudo abrem uma possibilidade terapêutica interessante quanto ao uso combinado do Acemannan, como coadjuvante, junto com os análogos da vitamina D<sub>3</sub> (Calcipotriol por exemplo) no tratamento da psoríase leve. Adicionalmente, devido ao efeito fortemente redutor do Acemannan sobre os níveis de expressão da chemerina, o uso combinado possibilitaria a redução das doses e/ ou posologia dos análogos da vitamina D<sub>3</sub>, prevenindo contra os efeitos adversos do fármaco.

## 5 CONCLUSÃO

O modelo murino experimental IMQ – induzido mostrou-se reprodutível quanto a manifestação parcial de uma hiperqueratose, fenotipicamente semelhante à psoríase humana. No entanto, é necessário um número amostral maior para observar de forma mais marcada os sinais fenotípicos da doença além de proporcionar a avaliação de outros parâmetros fenotípicos e imunológicos semelhantes à psoríase como o eritema e o aumento de citocinas inflamatórias no plasma murino (INF – gama, TNF-alfa, IL-6, IL-8).

O modelo mostrou potencial para ser usado no estudo de afecções dérmicas que envolvam alterações da epiderme do tipo hiperqueratose.

Quanto aos efeitos biológicos do Aloe vera extrato concentrado 200:1 em pó liofilizado (AVFDE) e dos fitocompostos investigados neste estudo podemos listar as seguintes observações imunomoduladoras:

- **AVFDE:**

- Os lotes testados nas concentrações de 50ug/ml e 250ug/ml não apresentaram potencial cicatrizante, sobre células queratinocíticas humanas (HaCat) submetidas ao Ensaio *In Vitro* do Arranhão, nas condições adotadas neste estudo;

- O lote testado na concentração de 50ug/ml reduziu significativamente a expressão da quimiocina MCP-1 / CCL2 sobre células fibroblásticas dermais humanas (hDF);

- O lote testado na concentração de 250ug/ml reduziu moderada e significativamente a expressão da citocina IL-8 sobre hDF mas não alterou a expressão da citocina IL-6 e da MCP-1;

- Em ambas as concentrações AVFDE reduziu a expressão da chemerina embora este efeito não tenha demonstrado significado estatístico.

- **Aloeresina A (ALA) 20uM:**

- O lote testado (A00601 / Adipogen) – aumentou significativamente a expressão da citocina IL-6 sobre células fibroblásticas dermais humanas (hDF);

O polissacarídeo Acemannan (ACM) utilizado neste estudo foi o único fitocomposto testado a apresentar um efeito redutor sobre a expressão da proteína chemerina.

- **Acemannan(ACM) 250ug/ml**

: - O lote testado aumentou moderada e significativamente a expressão da citocina IL-6 sobre células fibroblásticas dermais humanas (hDF);

: - O lote testado reduziu de modo altamente significante a expressão da proteína chemerina em sobrenadante de cultura de células fibroblásticas dermais humanas (hDF).

- **- Acemannan(ACM) 50ug/ml:**

- O lote testado reduziu significativamente a expressão da citocina IL-8 sobre células fibroblásticas dermais humanas (hDF);

- O lote testado reduziu de modo altamente significante a expressão da proteína chemerina em sobrenadante de cultura de células fibroblásticas dermais humanas (hDF).

O perfil de expressão da chemerina, constitutivamente expressa pelos hDF, sofre alteração de modo aparentemente dose dependente quando tratadas com acemannan , sugerindo um efeito anti inflamatório do principal polissacarídeo contido nos extratos da planta.

O uso terapêutico com objetivos imunoestimulador e antiinflamatório do polissacarídeo acemannan, combinado ou não a outras terapias, tem potencial para compor o arsenal terapêutico no tratamento das fases iniciais da psoríase desde que padronizada e respeitada as concentrações mínimas dos compostos bioativos como o polissacarídeo Acemannan nas apresentações farmacêuticas disponíveis comercialmente.

## 6 PERSPECTIVAS

- Realizar experimentos dose dependentes e curso temporais para avaliação da viabilidade celular frente aos fitocompostos testados;
- Repetir o ensaio cicatricional com ACM e AVFDE nas concentrações já testadas utilizando queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais humanas primárias e adicionando um inibidor de proliferação (Mitomicina 0,4%; Ciclofosfamida 2% ou Metotrexate 1%) para avaliar o efeito dos fitocompostos sobre a migração celular;
- Repetir os experimentos com os fitocompostos induzindo a super expressão de chemerina com Vit.D3 1uM e análogos da Vitamina D3 (Calcipotriol) utilizando diferentes tempos de incubação (24 e 48 hr) e respeitando a meia vida do fármaco em meio de cultura durante o experimento;
- Avaliar a expressão da citocina TNF-alfa utilizando o extrato concentrado 200:1 em pó liofilizado (AVFDE) e os fitocompostos isoladamente;
- Proceder com experimentos para avaliação do poder anti inflamatório do acemannan nas doses estudadas utilizando modelos murinos In Vivo.

## 7 REFERÊNCIAS

AHLUWALIA, B. et al. Effects of Aloe barbadensis Mill. extract (AVH200s) on human blood T cell activity in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 179, p. 301-309, 17 Feb. 2016,

AHP - releases monograph standards for aloe vera leaf, aloe vera leaf juice, aloe vera inner leaf juice (Aloe vera (L.) Burm f.). In: **Scotts Valley, CA: American Herbal Pharmacopoeia**. 18 Dec. 2012. Press release. Disponível em: <www.herbal-ahp.org/news.htm>. Acesso em: 22 jun 2015.

AKAMATA, K. et al. Increased expression of chemerin in endothelial cells due to Fli1 deficiency may contribute to the development of digital ulcers in systemic sclerosis. **Rheumatology (Oxford)**, v. 54, n. 7, p. 1308-16, jul. 2015.

ALBAN, S. et al. PS3, a semisynthetic beta-1,3-glucan sulfate, diminishes contact hypersensitivity responses through inhibition of L- and P-selectin functions. **J. Invest. Dermatol.**, v.129, n. 5, p. 1192-1202, 2009.

ALBANESI, C.; PITÀ O. de; GIROLOMONI G. Resident skin cells in psoriasis: a special look at the pathogenetic functions of keratinocytes. **Clinics in Dermatology** v. 25, p. 581–588, 2007.

ALBANESI C. et al. Chemerin expression marks early psoriatic skin lesions and correlates with plasmacytoid dendritic cell recruitment. **J Exp Med**. v. 206, p. 249-258, 2009.

ALBANESI C.; PASTORE S. Pathobiology of Chronic Inflammatory Skin Diseases: Interplay Between Keratinocytes and Immune Cells as a Target for Anti-Inflammatory Drugs. **Current Drug Metabolism**, v. 11, p. 210-227, 2010.

ALSHATWI A. A.; SUBASH-BABU P. Aloe-Emodin protects RIN-5F (Pancreatic  $\beta$ -cell) cell from glucotoxicity via regulation of Pro-Inflammatory Cytokine and downregulation of bax and caspase 3. **Biomol Ther (Seoul)**. v. 24, n. 1, p. 49-56, jan 2016. v. 24, n. 1, p. 49-56, jan 2016. Disponível em: <http://doi:10.4062/biomolther.2015.056>. Acesso em?

ALVES, J. C. V. et al. Levantamento do uso das plantas medicinais mais utilizadas para problemas dermatológicos na Comunidade do Sítio Dois Pintos. In: JORNADA DE ENSINO, 9., 2011. Recife: **Pesquisa e Extensão (JEPEX)**, 2011.

AMOR, KT.; RYAN, C.; MENTER, A. The use of cyclosporine in dermatology: part I. **Journal Am Acad Dermatol.**; 63(6):925-46; quiz 947-8. Dec, 2010.

ANDRESSEN, C.; HENSELER T. Inheritance of psoriasis. Analysis of 2035 family histories. **Hautarzt.**, v. 33, n. 4, p. 214-217, Apr. 1982.

APTE, R. N. Mechanisms of cytokine production by fibroblasts-implications for normal connective tissue homeostasis and pathological conditions. **Folia Microbiol.** v. 40, n.4, p. 392-404, 1995.



ARIAS-SANTIAGO, S.; ESPÍÑEIRA-CARMONA, MJ.; ANEIROS-FERNÁNDEZ, J. The Koebner phenomenon: psoriasis in tattoos. **Canadian Medical Association Journal (CMAJ)**, v. 185, n. 7, p.58, 16 Apr. 2013.

ARITA, M. et al. Stereochemical assignment, anti-inflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. **J Exp Med**, v. 201, p.713– 722, 2005.

ARMSTRONG, A. W.; HARSKAMP, C. T.; ARMSTRONG, E. J. The association between psoriasis and obesity: a systematic review and meta-analysis of observational studies. **Nutr Diabetes**, v. 2, p. 54, 2012.

ARRUDA, L.; YPIRANGA, S.; MARTINS, G. A. Systemic treatment of psoriasis - part II: biologic immunomodulator agents. **An Bras Dermatol**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 4, p. 393-408, Jul / Ago. 2004.

ATIBA, A. et al. Aloe vera oral administration accelerates acute radiation-delayed wound healing by stimulating transforming growth factor- and fibroblast growth factor production. **The American Journal of Surgery**, v. 201, p. 809–818, 2011. Disponível em: <doi:10.1016/j.amjsurg.2010.06.017>. Acesso em 5 maio 2015.

AUGUSTIN, M. et al. Co-morbidity and age-related prevalence of psoriasis: analysis of health insurance data in Germany. **Acta Derm Venereol**, v. 90, p. 147–151, 2010.

AWAD, A. B.; FINK, C. S. Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. **J Nutr**, v. 130, p. 2127–30, 2000.

AYALA-FONTÁNEZ, N.; SOLER, D. C.; MCCORMICK, T. S. Current knowledge on psoriasis and autoimmune diseases. Psoriasis: **Targets and Therapy**, v.6, p. 7–32, 2016. Disponível em: <doi.org/10.2147/PTT.S64950>. Acesso em: 5 jul 2014.

BAILEY, E. E. et al. Combinations treatments for psoriasis: a systematic review and meta-analysis. **Arch Dermatol**, v. 148, n. 4, p. 511-22, 2012.

BALATO, A. et al. Pathogenesis of psoriasis: the role of pro-inflammatory cytokines produced by keratinocytes, psoriasis. In: SOUNG, Jennifer (ed.); KOO, Boninie (ed.). **Psoriasis**. Croatia: Intech, 2012. Cap. 2, p. 9-28. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/psoriasis>. Acesso em: 30 abr. 2014.

BANAS, M. et al. Chemerin is an antimicrobial agent in human epidermis. **PLoS One**. v. 8, n. 3, 2013.

BANAS, M. et al. The expression and regulation of chemerin in the epidermis. **PLoS ONE**, v.10, n. 2, 2015. Disponível em: <e0117830.doi:10.1371/journal.pone.0117830>. Acesso em 6 jun. 2013.

BARKER, C. L.; MCHALE, M. T.; GILLIES, A. K. The development and characterization of an in vitro model of psoriasis. **J Invest Dermatol**, v. 123, p. 892-901, 2004.

- BARKER, G. et al. Increased chemerin concentrations in fetuses of obese mothers and correlation with maternal insulin sensitivity. **The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 25, n. 11 p. 2274–2280, 2012.
- BATA-CSÖRGÖ, Z.; SZELL, M. The psoriatic keratinocytes. **Expert Rev. Dermatol.** v. 7, n. 5, p. 473–481, 2012.
- BAUTISTA-PÉREZ, R.; SEGURA-COBOS, D.; VÁZQUEZ-CRUZ, B. In vitro antibradykinin activity of Aloe barbadensis gel. **J Ethnopharmacol**, v. 93, n. 1, p. 89-92, Jul. 2004.
- BECKER, M. et al. Expression of human chemerin induces insulin resistance in the skeletal muscle but does not affect weight, lipid levels, and atherosclerosis in LDL receptor knockout mice on high-fat diet. **Diabetes**, v. 59, p. 2898-2903, 2010.
- BENEKE, C.; VILJOEN, A.; HAMMAN, J. In Vitro drug absorption enhancement effects of Aloe vera and Aloe ferox. **Sci Pharm**, v. 80, n. 2, p. 475-486, Jun. 2012. Disponível em: <doi: 10.3797/scipharm.1202-10>. Acesso em 7 mar. 2013.
- BERG, V. et al. Human articular chondrocytes express ChemR23 and chemerin; ChemR23 promotes inflammatory signalling upon binding the ligand chemerin<sup>21-157</sup>. **Arthritis Res Ther**, v. 12, p. R228.
- BERTH-JONES, JOHN. Common dermatoses: psoriasis. **Medicine**, v. 41, n. 6, 2013.
- BLANPAIN, C.; FUCHS, E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 10, p. 207- 217, 2009.
- BLUMENBERG, M. Skinomics: past, present and future for diagnostic microarray studies in dermatology. **Expert Rev. Mol. Diagn**, v. 13, n. 8, p. 885–894, 2013.
- BOCA, A. N. et al. Pharmacological benefits of herbal gormulations in the management of psoriasis vulgaris. **Not Bot Horti Agrobo**, v. 42, n. 1, p. 1-8, 2014.
- Boehncke, W. H. Etiology and pathogenesis of psoriasis. **Rheum Dis Clin N Am**, v. 41, p.665–675, 2015. Disponível em: < doi: 10.1016/j.rdc.2015.07.013>. Acesso em: 20 abr. 2015.
- BOEHNCKE WOLF-HENNING, SCHÖN MP. Psoriasis. **The Lancet**, v. 386, p.983-94, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61909-7>. Acesso em: 13 mar 2015.
- BONDUE, B.; WITTAMER, V.; PARMENTIER, M. Chemerin and its receptors in leukocyte trafficking, inflammation and metabolism. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 22, p. 331–338, 2011.
- BOONYAGUL, S. Effect of acemannan, an extracted polysaccharide from Aloe vera, on BMSCs proliferation, differentiation, extracellular matrix synthesis, mineralization,

and bone formation in a tooth extraction model. **Odontology**. v. 102, n. 2, p.310-317, Jul. 2014.

BOUKAMP et al. Normal Keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. **The Journal of Cell Biology**, v. 106, p. 761-771, Mar. 1988.

BOWCOCK, A. M.; COOKSON W. O. C. M. The genetics of psoriasis, psoriatic arthritis and atopic dermatitis. **Human Molecular Genetics**, v. 13, review Issue 1, p. R43–R55, 2004.

BOWCOCK, A. M.; KRUEGER, J. G. Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. **Nat. Rev Immunol**, v. 5, p. 699-711, 2005. Erratum, Nat Rev Immunol p. 826

BOXIO, R. Mouse bone marrow contains large numbers of functionally competent neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75, p. 604-611, Apr 2004.

BOYMAN, O. et al. The pathogenic role of tissue-resident immune cells in psoriasis. **Trends Immunol**, v. 28, p. 51–5, 2007.

BOZAOGLU, K. et al. Chemerin, a novel adipokine in the regulation of angiogenesis. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 95, p. 2476 –2485, 2010.

BOZAOGLU, K. et al. Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. **Endocrinology**, v. 148, n. 10, p. 4687-94. 2007.

BOZZI, A. et al. Quality and authenticity of commercial Aloe vera gel powders. **Food Chem**, v. 103, p. 22-30, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos (SCTIE). Portaria nº 971, de 3 de Maio de 2006 (a). Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos (SCTIE) Decreto Nº 5.813, de 22 de junho de 2006(b). Aprova a Política Nacional de Fitoterápicos e plantas Medicinais.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2006(c). 148 p. – (Série B. Textos Básicos de Saúde)

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde.

Departamento de Atenção Básica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2012. 156 p.: il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos) (Cadernos de Atenção Básica ; n. 31)

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais : RENAME 2014 / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – 9. ed. rev. e atual. – Brasília : Ministério da Saúde, 2015. 230 p.

BROMLEY, S. K. et al. IL-23 Induces Atopic dermatitis-like inflammation instead of psoriasis-like inflammation in *ccr2* -deficient mice. **PLoS ONE**, v.8, n. 3. Disponível em: <e581 96. doi:10.1 371/journal.pone. 0058196, 2013>. Acesso em: 20 abr 2014.

BROWN, GORDON D. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. **Nature reviews – Immunology**, v. 6, p. 33-43, Jan. 2006. Disponível em: <doi:10.1038/nri1745>. Acesso em: 20 abr 2014.

BUDAI, M.M. et al. Aloe vera downregulates LPS-induced inflammatory cytokine production and expression of NLRP3 inflammasome in human macrophages. **Molecular Immunology**, ano 4, v. 56, n. 32, p. 471-479, Dec. 2013.

BUNYAPRAPHATSARA, N. Antidiabetic activity of Aloe vera L. juice, II—clinical trial in diabetes mellitus patients in combination with glibenclamide. **Phytomedicine** v. 3, p. 245-8, 1996.

BUTLER, G. et al. Therapeutic effect of hyperbaric oxygen in psoriasis vulgaris: two case reports and a review of the literature. **Journal of Medical Case Reports**, v.3, p. 7023, 2009.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CARLINO, C. et al. Chemerin regulates NK cell accumulation and endothelial cell morphogenesis in the decidua during early pregnancy. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 97, p.3603-12, 2012.

CARNEIRO, SUELI C. S. C. **Psoríase**: mecanismo de doença e implicações terapêuticas. 2007. 199 f. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Departamento de Dermatologia, 2007.

CARRASCOSA, J.M. et al. Methotrexate in moderate to severe psoriasis: review of the literature and expert recommendations. **Actas Dermosifiliogr**, v. 107, n. 3, p. 194-206, Apr. 2016.

CASH, J. L. et al. Synthetic chemerin-derived peptides suppress inflammation through ChemR23. **J Exp Med**, v. 205, p. 767–75, 2008.

CASH, J.L. et al. Chemerin15 inhibits neutrophil-mediated vascular inflammation and myocardial ischemia–reperfusion injury through ChemR23. **EMBO Rep**, v. 14, p. 999–1007, 2013.

CASH, J.L. et al. Resolution mediator chemerin15 reprograms the wound micro-environment to promote repair and reduce scarring. **Curr Biol**, 2014.

CEOVIC, R. et al. Psoriasis: female skin changes in various hormonal stages throughout life-puberty, pregnancy, and menopause review article. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/571912>>. Acesso em 10 abr 2015.

CHAMBERLAND, J.P. Chemerin is expressed mainly in pancreas and liver, is regulated by energy deprivation, and lacks day/night variation in humans. **European Journal of Endocrinology**, v. 169, p. 453-462, 2013.

CHAN, G. C.F.; CHAN, W. K. ; SZE, D. M. Y. The effects of  $\beta$ -glucan on human immune and cancer cells. **Journal of Hematology & Oncology**, v.2, n. 25, 10 Jun. 2009. Disponível em: <[doi:10.1186/1756-8722-2-25](https://doi.org/10.1186/1756-8722-2-25)>. Acesso em 23 jun 2015.

CHAVES, D. S. A. The brazilian medicinal plants are effective in the treatment of systemic lupus erythematosus?. **Revista Fitos**, v. 7, n. 3, Jul / Set. 2012.

CHEN, J. et al. Synthesis of gibberellin derivatives with anti-tumor bioactivities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.19, n. 18, p.5496–5499, Aug. 2009. Disponível em: <[doi: 10.1016/j.bmcl.2009.07.090](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.07.090)>. Acesso em 10 ago 2015.

CHEN, Q. et al. Exploring a novel target treatment on breast cancer: aloe-emodin mediated photodynamic therapy induced cell apoptosis and inhibited cell metastasis. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 16, n. 6, p. 763-70, 2016.

CHIHARA, T. et al. Effects of Aloe-emodin and Emodin on Proliferation of the MKN45 Human Gastric Cancer Cell Line. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 16, n. 9, 3887-91 2015.

CHINCHILLA, N. et al. Aloe barbadensis: how a miraculous plant becomes reality. **Phytochem Rev**, v. 12, n. 4, p.581-602, Dec. 2013. Disponível em: <[DOI 10.1007/s11101-013-9323-3](https://doi.org/10.1007/s11101-013-9323-3)>. Acesso 10 ago 2015.

CHIRICOZZI, A. et al. Role of IL-23 in the pathogenesis of psoriasis: a novel potential therapeutic target? **Expert Opin. Ther. Targets**, v. 18, n. 5, p.513-525, 2014.

CHOI, H. C. et al. Metabolic effects of aloe vera gel complex in obese prediabetes and early non-treated diabetic patients: randomized controlled trial. **Nutrition**, v. 29, n. 9, p. 1110-4, 2 Jun. 2013.

CHOI, J. S. et al. Effect of a  $\beta$ -glucan from *Aureobasidium* on TGF- $\beta$ <sub>1</sub>-modulated *in vitro* dermal wound repair. **Toxicology and Environmental Health Sciences**, ano 1, v. 8, p. 12-18, Mar. 2016.

CHOI S, SON BW, SON YS, et al: The wound-healing effect of a glycoprotein fraction isolated from aloe vera. **Br J Derm**, v. 145, p.535-545, 2001.

CHOI, S. et al. Aloesin inhibits hyperpigmentation induced by UV radiation. **Clin. Exp. Dermatol**, v. 27, p. 513–515. 2002.

CHOONHAKARN, C. A prospective, randomized clinical trial comparing topical Aloe vera with 0.1% triamcinolone acetonide in mild to moderate plaque psoriasis. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 24, p.168-72, 2010.

CHOUDHARY, M.; KOCHHAR, A.; SANGHA, J. Hypoglycemic and hypolipidemic effect of Aloe vera L. in non-insulin dependent diabetics. *J Food Sci Technol*, 2014, v. 51, n. 1, p.90-96, Jan. 2014. Disponível em: <doi: 10.1007/s13197-011-0459-0>. Acesso: 14 mar 2014.

CHRISTOPHER, G. E. M.; BARKER J. N. W. N. Psoriasis 1: pathogenesis and clinical features of psoriasis. **Lancet**, v. 370, p.263–71, 2007.

CHRISTOPHERS, E.; METZLER, G.; RÖCKEN, M. Bimodal immune activation in psoriasis. **British Journal of Dermatology**, v. 170, p. 59–65, 2014.

CHU, C. C.; DI MEGLIO, P.; NESTLE, F.O. Harnessing dendritic cells in inflammatory skin diseases. **Seminars in Immunology**, v. 23, n. 1, p. 28-41, Feb. 2011. Disponível em: <doi: 10.1016/j.smim.2011.01.006>. Acesso em: 15 mar. 2014.

CHUN-CHI, L.; PARK, A.; GUAN, JUN-LIN. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329 – 333, 2007. Disponível em: <doi:10.1038/nprot.2007.30>. Acesso: 30 abr. 2014.

CIMMINO, M. A. Epidemiology of psoriasis and psoriatic arthritis. **Rheumatological Clinic**, Italy, p. 19-24, 2007.

CLEMENTI ME, T. G.; TRIGGIANI, D.; GIARDINA, B. Aloe arborescens extract protects IMR-32 cells against Alzheimer Amyloid Beta Peptide via inhibition of radical peroxide production. *Nat Prod Commun*, v.10, n.11, p.1993-5, Nov. 2015.

COASTS, B. C.; AHOLA R. Aloe vera the silent healer - a modern study of Aloe vera : **Fideli Publishing Inc.**, Martinsville, Indiana.

COBAN, M. et al. Association of Adipokines, insulin resistance, hypertension and dyslipidemia in patients with psoriasis vulgaris. *Ann Dermatol*, v, 28, n. 1, p. 74-9, Feb. 2016. Disponível em: <doi: 10.5021 /ad. 2016. 28.1.74>. Acesso em: 15 mar. 2014.

COMMINS, S. P.; BORISH L.; STEINKE, J. W. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons and chemokines. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, n. 2, p.S53-S72. Disponível em: <doi:10.1016/j.jaci.2009.07.008>. Acesso em: 15 mar. 2014.

CONDE, J. et al. Expanding the adipokine network in cartilage: identification and regulation of novel factors in human and murine chondrocytes. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 70, n. 3, p.551-559, 2011.

CONSENSO BRASILEIRO DE PSORÍASE. **Guias de avaliação e tratamento Sociedade Brasileira de Dermatologia**. Rio de Janeiro, 2009. 116 p.

CONSENSO BRASILEIRO DE PSORÍASE. **Guias de avaliação e tratamento Sociedade Brasileira de Dermatologia**. 2 ed. Rio de Janeiro, 2012, 172 p.

COSMETIC INGREDIENT REVIEW. Final Report on the Safety Assessment of Aloe Andongensis Extract, Aloe Andongensis Leaf Juice, Aloe Arborescens Leaf Extract, Aloe Arborescens Leaf Juice, Aloe Arborescens Leaf Protoplasts, Aloe Barbadensis Flower Extract, Aloe Barbadensis Leaf, Aloe Barbadensis Leaf Extract, Aloe Barbadensis Leaf Juice, Aloe Barbadensis Leaf Polysaccharides, Aloe Barbadensis Leaf Water, Aloe Ferox Leaf Extract, Aloe Ferox Leaf Juice, and Aloe Ferox Leaf Juice Extract. **International Journal of Toxicology**, v. 26, p. 1-50, Mar. 2007. Disponível em: <DOI: 10.1080/10915810701351186>. Acesso em: 15 mar. 2014.

COWSERT, L. M. **Biological activities of acemannan**. p.1-9, 8 Dec. 2010. Disponível em: < <https://www.symmetryglobal.com/pdf/BioActivofAcemannan.pdf> > . Acesso em: 15 mar. 2014.

DABURKAR, M. An in vivo and in vitro investigation of the effect of Aloe vera gel ethanolic extract using animal model with diabetic foot ulcer. **J. of Pharm. Bioallied Sci.**, v. 6, n. 3, p. 205-12, 2014. Disponível em: <DOI 10.4103/0975-7406.135248 jul-sep 2014>. Acesso em: 2015.

DAVIS, RH. et al. "Anti-inflammatory and wound healing activity of a growth substance in Aloe vera," **Journal of the American Podiatric Medical Association**, v. 84, n. 2, p. 77–81, 1994a.

DAVIS, RH. et al. Aloe vera, hydrocortisone, and sterol influence on wound tensile strength and anti-inflammation. **Journal of the American Podiatric Medical Association**, v. 84, n. 2, p. 614-621, 1994b.

DAVIS, RH. et al. Processed Aloe vera administered topically inhibits inflammation. **J Am Pediatr Assoc**, v. 79, p. 395-397, 1989.

DE PALMA, G. et al. The possible role of ChemR23/Chemerin axis in the recruitment of dendritic cells in lupus nephritis. **Kidney Int.**, v. 79, p. 1228-35, 2011.

DEL PRETE, A. CCRL2, a fringe member of the a typical chemoattractant receptor family. **Eur. J. Immunol. Cells in Motion Viewpoints**, v. 43, p. 1404-1440, 2013.

DELEURAN, M. et al. Localization of monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1) in psoriasis. **Journal of dermatological science**, v. 13, p. 228–236, 1996.

DESHMANE, S.L. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 29, n. 6, 2009. Disponível em: <DOI: 10.1089/jir.2008.0027>. Acesso em: 15 mar. 2015.

DEVARAJ, A.; KARPAGAM, T. Evaluation of anti-inflammatory activity and analgesic effect of *Aloe vera* leaf extract in rats. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 2, n. 3, p.103-110, mar. 2011.

DEVARAJ, S. *et al.* Effects of *Aloe vera* supplementation in subjects with prediabetes/metabolic syndrome. **Metab Syndr Relat Disord**, v. 11, n. 1, p.35–40, 4 Oct 2012.

DEVAUX, S. *et al.* Adherence to topical treatment in psoriasis: a systematic literature review. **J Eur Acad Derm Venereol**, v. 26, n. 3, p. 61– 67, 2012.

DI MEGLIO, P.; PERERA, G.K.; NESTLE, F.O. The multitasking organ: recent insights into skin immune function. **Immunity Review**, v. 35, p. 857-869, Dec. 2011,

DIAMANTINO, F.; FERREIRA, A. Perspectivas futuras no tratamento da psoríase. Novidades em Terapêutica Biológica. **Acta Med Port**, v. 24, p. 997-1004, 2011.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, p. 303-336, 2012. Disponível em: <doi:10.3390/metabo2020303>. Acesso em: 14 mar. 2015.

DISTLER, J. H. W. *et al.* Monocyte chemoattractant protein 1 released from glycosaminoglycans mediates its profibrotic effects in systemic sclerosis via the release of interleukin-4 from t cells. **Arthritis & Rheumatism**, v. 54, n. 1, p. 214-225, Jan. 2006. Disponível em: <DOI 10.1002/art.21497>. Acesso em: 14 mar. 2015.

DO, G. K. K.; DO, J. Q. D. R. Drug-provoked psoriasis: is it drug induced or drug aggravated? understanding pathophysiology and clinical relevance. **J Clin Aesthetic Dermatol**, v. 3, n. 1, p. 32-38, 2010.

DOGRA, S.; MAHAJAN, R. Systemic methotrexate therapy for psoriasis: past, present and future. **Clin Exp Dermatol**, v. 38, n. 6, p.573-88, Aug. 2013. Disponível em: <doi:10.1016/j.fshw.2014.11.003>. Acesso em: 15 mar. 2015.

DOSTERT, C.; MEYLAN, E.; TSCHOPP, J. Intracellular pattern-recognition receptors. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 830–840, 2008.

DOWLATSHAHI, EA. *et al.* Markers of systemic inflammation in psoriasis: a systematic review and meta-analysis. **Br J Dermatol**, v. 169, p.266-82, 2013.

DHINGRA, D. *et al.* Antihyperlipidemic activity of *Aloe succotrina* in rats: possibly mediated by inhibition of HMG-CoA reductase. **ISRN Pharmacol.**, v. 2014, p.243-575, 2014.

DU, X. Y. *et al.* Regulation of chemerin bioactivity by plasma carboxypeptidase N, carboxypeptidase B (activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor), and platelets. **J Biol Chem**, v. 284, p.751–8, 2009.

DU, X. Y.; LEUNG, L. L. Proteolytic regulatory mechanism of chemerin bioactivity. **Acta Biochim Biophys Sin**, Shanghai, v. 41, p.973-9, 2009.



DUANSACK, D.; SOMBOONWONG, J.; PATUMRAJ, S. Effects of Aloe vera on leukocyte adhesion and TNF-alpha and IL-6 levels in burn wounded rats. **Clin Hemorheol Microcirc.**, v. 29, n. 3-4, p. 239-46, 2003.

DUARTE, GV. et AL. Psoríase e obesidade : revisão de literatura e recomendações no manejo. **An Bras Dermatol**, v. 85, n. 3, 355-60. 2010.

DUARTE, IDA; BUENSE, ROBERTA AND KOBATA, CLARICE. Fototerapia. **An. Bras. Dermatol**, v. 81, n. 1, p.74-82, 2006. Disponível em: <Doi.org/10.1590/S0365-2006>.

ELDER, J. T. et al. The genetics of psoriasis 2001. **Arch Dermatol**, v. 137, p. 1447-54, 2001.

EGESIE, UG.; CHIMA, KE.; GALAM, NZ. Anti-inflammatory and Analgesic Effects of Aqueous Extract of Aloe vera (Aloe barbadensis) in Rats. **African journal of Biomedical Research**, v. 14, n. 3, 2011.

EISINGER, K. et al. Chemerin induces CCL2 and TLR4 in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Exp Mol Pathol**, v.92, p.90–6, 2012.

ELIAS, K. M. et al. Retinoic acid inhibits Th17 polarization and enhances FoxP3 expression through a Stat-3/Stat-5 independent signaling pathway. **Blood**, v. 111, p. 1013, 2008.

ERNST, M. C.; SINAL, C. J. Chemerin: at the crossroads of inflammation and obesity. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 21, n 1, November 2010. Disponível em: <doi: 10.1016/j.tem.2010.08.001>. Acesso em: 15 mar. 2015.

ESUA, M. F.; RAUWALD, J.W. Novel bioactive maloyl glucans from aloe vera gel: isolation, structure elucidation and in vitro bioassays. **Carbohydr. Res**, v. 341, p. 355–364, 2006.

FAURY, G. et al. The alpha-L-Rhamnose recognizing lectin site of human dermal fibroblasts functions as a signal transducer: modulation of Ca<sup>2+</sup> fluxes and gene expression. **Biochim Biophys Acta**. v. 1780, n. 12, p. 1388- 94, Dec. 2008. Disponível em: <doi: 10.1016/j.bbagen.2008.07.008>. Acesso: 15 mar. 2015.

FEMENIA, A. et al. Effects of heat treatment and dehydration on bioactive polysaccharide acemannan and cell wall polymers from Aloe barbadensis Miller. **Carbohydrate Polymers**, v. 51, p. 397-405, 2003.

FEMENIA, A. et al. Compositional features of polysaccharides from Aloe vera (Aloe barbadensis Miller) plant tissues. **Carbohydrate Polymers**, v. 39, p. 109-117, 1999.

FENG B-J, SUN L-D, SOLTANI-ARABSHAHI R, BOWCOCK AM, NAIR RP, et al. (2009) Multiple Loci within the Major Histocompatibility Complex Confer Risk of

Psoriasis. **PLoS Genet**, v. 5, n. 8, 14 Aug. 2009. Disponível em: <doi:10.1371/journal.pgen.1000606>. Acesso em: 15 mar. 2015.

FLEMING, C. et al. Calcipotriol plus betamethasone dipropionate gel compared with its active components in the same vehicle and the vehicle alone in the treatment of psoriasis vulgaris: a randomised, parallel group, double-blind, exploratory study. **Eur J Dermatol**, v. 20, p. 465-471, 2010.

FUTOSI, K.; FODOR, S.; MÓCSAI, A. Reprint of Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. **International Immunopharmacology**, v. 17, p. 1185-1197, 2013.

GAO, X. et al. Association of chemerin mRNA expression in human epicardial adipose tissue with coronary atherosclerosis. **Cardiovasc Diabetol**, v. 10, n. 87, 2011.

GARCIA LA, KING KK, FERRINI MG, NORRIS KC, ARTAZA JN 1,25(OH)<sub>2</sub>vitamin D<sub>3</sub> stimulates myogenic differentiation by inhibiting cell proliferation and modulating the expression of promyogenic growth factors and myostatin in C2C12 skeletal muscle cells. **Endocrinology**, v. 152, n. 8, p. 2976-86, Aug. 2011.

GILLITZER, R. et al. MCP-1 mRNA expression in basal keratinocytes of psoriatic lesions. **The Journal of investigative dermatology**, v. 101, p. 127–131, 1993.

GISONDI, P. et al. Serum chemerin is increased in patients with chronic plaque psoriasis and normalizes following treatment with infliximab. **Br J Dermatol**, v. 168, 749–55, 2013.

GLADMAN, D. et al. Psoriatic arthritis: epidemiology, clinical features, course, and outcome. **Ann Rheum Dis**, v. 64, n. 2, p. ii14–ii17, Mar. 2005. Disponível em: <doi:10.1136/ard.2004.032482>. Acesso em: 15 mar. 2015.

GNIADOCKI, R. Stimulation versus inhibition of keratinocyte growth by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: dependence on cell culture conditions. **J Invest Dermatol**, v.106, p.510-6, 1996.

GOLLNICK, H. P. M.; DÜMMLER, U. Retinoids. **Clinical Dermatology**, v. 15, p. 799-810, 1997.

GONÇALVES, VANESSA Z. **Estudo de viabilidade técnica, econômica e financeira da extração e comercialização de um insumo farmacêutico a base de polissacarídeos de aloe barbadensis miller**. 2008, 115 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. Florianópolis, 2008.

GONZALVO-FEO, S. et al. Endothelial cell-derived chemerin promotes dendritic cell transmigration. **J Immunol**, v. 192, p. 2366-2373, 2014.

GORALSKI, K.B. et al., Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. **J Biol Chem**, v. 282, n. 38, p. 28175-88, 2007.

GOTTLIEB, A. B.; DANN, F. Comorbidities in patients with psoriasis. **The American Journal of Medicine**, v. 122, n. 12, Dec. 2009.

GRAHAM, GJ.; LOCATI, M. Regulation of the immune and inflammatory responses by the "atypical" chemokine receptor D6. **J Pathol.**, v. 229, n. 2, p. 168-75, Jan. 2013.

GROZDEV, I.; KORMAN, N.; TSANKOV, N. Psoriasis as a systemic disease. **Clinics in Dermatology**, v. 32, p. 343–350, 2014. Disponível em: <doi.org/10.1016/j.clindermatol.2013.11.001>. Acesso em: 15 mar. 2015.

GUDJONSSON, J. E. et al. Psoriasis patients who are homozygous for the HLA-Cw\*0602 allele have a 2Æ 5-fold increased risk of developing psoriasis compared with Cw6 heterozygotes. **British Journal of Dermatology**, v. 148, p. 233–235, 2003.

GUDJONSSON, J. E.; ELDER, J. T. Psoriasis: epidemiology. **Clinics in Dermatology**, v. 25, p. 535–546, 2007.

GUDJONSSON, JOHANN E. , KRUEGER, JG. Role for Epigenetics in psoriasis: methylated cytosine–guanine sites differentiate lesional from nonlesional skin and from normal skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, p.506–508, 2012. Disponível em: <doi:10.1038/jid.2011.364>. Acesso em: 15 mar. 2015.

GUÉRARD, S.; POULIOT, R. The role of angiogenesis in the pathogenesis of psoriasis: mechanisms and clinical implications. **J Clin Exp Dermatol Res**, 2012. Disponível em: <doi:10.4172/2155-9554.S4-002>. Acesso em: 14 maio 2015.

GULLÓN, B. et al. In vitro assessment of the prebiotic potential of Aloe veramucilage and its impact on the human microbiota. **Food Funct**, v. 6, p. 525–531, 2015. Disponível em: <doi: 10.1039/c4fo00857j , 2015>. Acesso em 15 maio 2015.

GUO, J. et. al. Suppression of C-myc expression associates with anti-proliferation of aloe-emodin on gastric cancer cells. **Cancer Invest**, v.26, p. 369–74, 2008.

GUPTA, R.; CHAKRABARTY, S. K. Gibberellic acid in plant still a mystery unresolved. **Plant Signaling & Behavior**, v. 8, n. 9, Sep. 2013.

GUPTA, S. et al. Dermal vasculature in psoriasis and psoriasiform dermatitis: a morphometric study. **Indian Journal of Dermatology**, v. 56, n. 6, p. 647-649. Disponível em: <doi:10.4103/0019-5154.91820>. Acesso em: 2011.

GUPTA, V. K.; MALHOTRA, S. Pharmacological attribute of Aloe vera: revalidation through experimental and clinical studies. **AYU**, v. 33, n. 2, Apr. / Jun. 2012.

GUTTERMAN, Y.; CHAUSER-VOLFSON, E. The distribution of the phenolic metabolites barbaloin, aloeresin and aloenin as a peripheral defense strategy in the succulent leaf parts of Aloe arborescens. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, p. 825-838, 2000.

GUZEL, S. Chemerin and calprotectin levels correlate with disease activity and inflammation markers in psoriasis vulgaris. **Dermatologica Sinica**, v. 33, p. 1-4, 2015.

HAAS R., CUCCHI D., SMITH J., PUCINO V., MACDOUGALL C.E. and MAURO C. Intermediates of Metabolism\_From Bystanders to Signalling Molecules. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 5, May 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2016.02.003>>. Acesso em: 13 maio 2015.

HAMMAN, JOSIAS H. Composition and Applications of Aloe vera Leaf Gel. **Molecules**, v. 13, p. 1599-1616, 2008.

HARRISON, L.I et al. Pharmacokinetics and safety of imiquimod 5% cream in the treatment of actinic keratoses of the face, scalp, or hands and arms. **Arch Dermatol Res**, v. 296, p. 6–11, 2004. Disponível em: <DOI 10.1007/s00403-004-0465-4>. Acesso em: 15 mar. 2014.

HEGYI Z, Z. S. et al., “Vitamin D analog calcipotriol suppresses the Th17 cytokine-induced proinflammatory S100 alarmins psoriasin (S100A7) and koebnerisin (S100A15) in psoriasis,” **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 5, p. 1416–1424, 2012.

HEIDENREICH, R.; RÖCKEN, M.; GHORESCHI, K. Angiogenesis drives psoriasis pathogenesis. **Int. J. Exp. Path.**, v. 90, p. 232–248, 2009. Disponível em: <doi:10.1111/j.1365-2613.2009.00669.x>. Acesso em: 11 ago. 2015.

HENGGE, U.R. et al. Adverse effects of topical glucocorticosteroids. **Journal of American Academy of Dermatology**, p.1-15, 2005. Disponível em: <doi:10.1016/j.jaad.2005.01.010>. Acesso em: 12 mar. 2015.

HESPANHOL, R.C. et al. The expression of mannose receptors in skin fibroblast and their involvement in Leishmania (L.) amazonensis invasion. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 53, n. 1, p. 35–44, 2005.

HEYINCK K., DE VALCK D., BERGHE W.V., CRIEKINGE W.V. et al. The Zinc Finger Protein A20 Inhibits TNF-induced NF-κB-dependent Gene Expression by Interfering with an RIP- or TRAF2-mediated Transactivation Signal and Directly Binds to a Novel NF-κB-inhibiting Protein ABIN. **The Journal of Cell Biology**, v. 145, n. 7, p. 1471–1482, 28 Jun. 1999.

HOLICK, M. F. The Vitamin D deficiency pandemic and consequences for nonskeletal health: mechanisms of action. **Mol Aspects Med.**, v.29, n. 6, p. 361-368. Disponível em: <doi:10.1016/j.mam.2008.08.008>. Acesso em: 12 mar. 2015.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. Princípios ativos de plantas superiores. São Carlos: EDUFSCAR, 2003. 152 p. v. 4.

HOUGEIR, F. G. et al. Critical considerations on optimizing topical corticosteroid therapy. **Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, v. 8, n. 5, 2015.

HOUIMEL, M. ; MAZZUCHELLI, L. Identification of biologically active peptides that inhibit binding of human CXCL8 to its receptors from a random phage-epitope library. **J. Leukoc. Biol.** v.85, p. 728-738, 2009.

HUANG J. et al. Cloning of porcine chemerin, ChemR23 and GPR1 and their involvement in regulation of lipogenesis. **BMB Rep**, v. 43, p. 491–8, 2010.

HUANG, P. H. et al. Emodin and Aloe-emodin suppress breast cancer cell proliferation through ER a inhibition. **Evid Based Complement Alternat Med.** 2013; 12p.

IKEDA, U. et al. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 and all-trans retinoic acid synergistically inhibit the differentiation and expansion of Th17 cells. **Im-munol Lett** v. 134, n. 7, 2010.

IM, S. A. et al. Identification of optimal molecular size of modified Aloe polysaccharides with maximum immunomodulatory activity. **Int Immunopharmacol**, v. 5, p. 271-279, 2005.

BAEK , J. O.; BYAMBA, D. Assessment of an imiquimod-induced psoriatic mouse model in relation to oxidative stress. **Arch Dermatol Res**, v. 304, p.699–706.

JACOBI, A. et al. Prevalence of obesity in patients with psoriasis: results of the national study pshealth3. **Dermatology**, v. 231, p.231-238, 2015. Disponível em: <DOI: 10.1159/000433528>. Acesso em: 11 mar. 2015.

JEAN, J.; POULIOT, R. In Vivo and In Vitro Models of Psoriasis. In: EBERLI, Daniel (ed.). **Tissue Engineering**. Croatia: InTech, 2010. Cap. 18, p. 359-383. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/tissue-engineering/in-vivo-and-in-vitro-models-of-psoriasis>>. Acesso em: 15 jul 2015.

JEAN, J.; SOUCY, J.; POULIOT, R. Effects of retinoic acid on keratinocyte proliferation and differentiation in a psoriatic skin model. **Tissue Eng.** v. 17, n. 13-14, part. A, 2011.

JESUS, A. A. et al. Molecular Mechanisms in Genetically Defined Autoinflammatory Diseases: Disorders of Amplified Danger Signaling. **Annu. Rev. Immunol**, v. 33, p. 823–74, 2015.

JETTANACHEAWCHANKIT, S. et al. Acemannan stimulates gingival fibroblast proliferation; expressions of keratinocyte growth factor-1, vascular endothelial growth factor, and type I collagen; and wound healing. **J Pharmacol Sci.**, v. 109, n. 4, Apr. 2009.

JI-QING CHEN, J-Q.; SZODORAY, P.; ZEHER, M. Toll-like receptor pathways in autoimmune diseases. **Clinic Rev Allerg Immunol**, v. 50, p.1–17, 2016. Disponível em: <DOI 10.1007/s12016-015-8473-z>. Acesso em: 11 mar. 2015.

JIA, Y.; ZHAO, G.; JIA, J. Preliminary evaluation: the effects of *Aloe ferox miller* and *Aloe arborescens miller* on wound healing. **J Ethnopharmacol**, v.120, p.181-189, 2008.

JITTAPIROMSAK, N. et al. Acemannan, an extracted product from *Aloe vera*, stimulates dental pulp cell proliferation, differentiation, mineralization, and dentin formation. **Tissue Eng.**, v. 16, n. 6, p. 1997-2006, Jun. 2008.

WOLK, K. et al. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. **Eur. J. Immunol**, v.36, p. 1309–1323, 2006.

HÄNEL, K. et al. Cytokines and the skin barrier. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 14, p. 6720-6745, 2013. Disponível em: <doi:10.3390/ijms14046720>. Acesso em: 1 jun. 2015.

KASAMATSU, A. et al. Gibberellic acid induces  $\alpha$ -amylase expression in adipose-derived stem cells. **International Journal of Molecular Medicine.**, v. 30, p. 243-247, 2012.

KAUR, J. et al. Identification of chemerin receptor (ChemR23) in human endothelial cells: chemerin-induced endothelial angiogenesis. **Biochem Biophys Res Commun** v. 391, p. 1762–1768, 2010.

KELLY, M. A. Cyclosporine: an overview. **Curr Probl Dermatol**, p. 269 -268, Nov. / Dec. 2000.

KESEROGLU, H. O.; GÖNÜL, M. Traditional topical herbal therapies in psoriasis. **Tang Humanitas Medicine**, v. 4, n. 4, p. 23.1-23.8, 2014. Disponível em: <doi.org/10.5667/tang.2014.0027>. Acesso em 15 jun. 2015.

KIM, J. E. et al. Expression of the corticotrophin releasing hormone-proopiomelanocortin axis in the various clinical types of psoriasis. **Exp Dermatol.**, v.16, n. 2, p.104–109, 2007.

KIM, K. et al. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of processed *Aloe vera* gel in a mouse model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Phytomedicine**, v. 16, p.856-63, 2009

KLECZKOWSKI, K.; SCHELL, J.; BANDUR, R. P. Conjugates: nature and function. **Critical Reviews in Plant Sciences.**, v.14, n. 4, p. 283-298, 1995. Disponível em: <DOI: 10.1080/07352689509382361>. Acesso em 24 jun. 2015.

KOMINE, M. et al. Early inflammatory changes in the “perilesional skin” of psoriatic plaques: is there interaction between dendritic cells and keratinocytes?. **Journal of Investigative Dermatology.**, v. 127, p. 1915–1922, 2007. Disponível em: <doi:10.1038/sj.jid.5700799>. Acesso em: 24 jun. 2016.

KONING, H. et al. A comprehensive analysis of pattern recognition receptors in normal and inflamed human epidermis: upregulation of dectin-1 in psoriasis. **Journal of Investigative Dermatology.**, vol. 130, 2010.

KOPEL, E. et al. Effect of the dead sea climatotherapy for psoriasis on quality of life. **Isr Med Assoc J.**, v. 15, n. 2, p.99-102, Feb. 2013.

KOUGIAS, P. et al. Normal human fibroblasts express pattern recognition receptors for fungal (133)-b-D-Glucans. **Infection and Immunity.**, v. 69, n.6, p. 3933–3938, Jun. 2001. Disponível em: <DOI: 10.1128/IAI.69.6.3933–3938.2001>. Acesso em: 10 maio 2015.

KRALISCH, S. et al. Interleukin-1beta induces the novel adipokine chemerin in adipocytes in vitro. **Regul Pept.**, v. 154, p. 102–106.

KRUEGER, G.G. et al. Two considerations for patients with psoriasis and their clinicians: What defines mild, moderate, and severe psoriasis? What constitutes a clinically significant improvement when treating psoriasis? **J Am Acad Dermatol.**, v. 43, p. 281-5, 2000.

KRUEGER, G. G.; ELLIS, C. Psoriasis – recent advances in understanding its pathogenesis and treatment. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 53, p. 94-100, 2005.

KULIG, P. et al. Regulation of chemerin chemoattractant and antibacterial activity by human cysteine cathepsins. **J Immunol.**, v. 187, p. 1403–10, 2011.

KULIG, P. et al. Staphylococcus aureus-derived staphopain B, a potent cysteine protease activator of plasma chemerin. **J. Immunol.**, v. 178, p. 3713–3720, 2007.

KUMAR, A.; DHAWAN, S.; AGGARWAL, B. B. Emodin (3-methyl-1,6,8- trihydroxy anthraquinone) inhibits TNF-induced NF-kappaB activation, IkappaB degradation, and expression of cell surface adhesion proteins in human vascular endothelial cells. **Oncogene.** , v.17, p.913–8, 1998.

KUMAR M, RAKESH S, NAGPAL R, et al. Probiotic Lactobacillus rhamnosus GG and Aloe vera gel improve lipid profiles in hypercholesterolemic rats. **Nutrition.** , v.29, p. 574 e 579, 2013.

KUPETSKY, E. A.; KELLER, M. Psoriasis vulgaris: an evidence-based guide for primary care. **J Am Board Fam Med.**, v. 26, n. 6, p.787-801, Nov. / Dec. 2013. Disponível em: <doi: 10.3122/jabfm.2013.06.130055>. Acesso em: 21 maio 2015.

KUSTER, R.M. et al. Identification of maloyl glucans from Euphorbia tirucalli by ESI-( )-FT-ICR MS analyses. **Phytochemistry Letters**, v. 12, p. 209-214, 2015. Disponível em: <doi.org/10.1016/j.phytol.2015.04.008>. Acesso em: 20 abr. 2015.

LAN R.Y. et al. Regulatory T cells: development, function and role in autoimmunity. **Autoimmunity Reviews**, v, 4, p. 351-363, 2005.

LADEMANN, U. ; KALLUNKI, T.; JÄÄTTELÄÄ, M. A20 zinc finger protein inhibits TNF-induced apoptosis and stress response early in the signaling cascades and

independently of binding to TRAF2 or 14-3-3 proteins. **Cell Death and Differentiation**, v. 8, p. 265-272, 2001.

LANDIS, E.T.; et al. Complementary and alternative medicine use in dermatology in the United States. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 20, n. 5, p. 392-398, 2014. Disponível em: <DOI: 10.1089/acm.2013.0327>. Acesso em: 1 ago 2015.

LANGMEAD, L. MAKINS, R. J; RAMPTON, D. S. Anti-inflammatory effects of aloe vera gel in human colorectal mucosa in vitro. **Aliment Pharmacol Ther**, v.19, p. 521-527, 2004. Disponível em: <doi: 10.1111/j.1365-2036.2004.01874.x>. Acesso em: 1 ago. 2015.

LARSEN, C.G. Production of interleukin-8 by human dermal fibroblasts and keratinocytes in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor. **Immunology**, v. 68, n. 1, p. 31–36, Sep. 1989.

LASSUS, A.; FORSTRÖM, S. A double-blind study comparing oleum horwathiensis with placebo in the treatment of psoriasis. **J Int Med Res.** , v.19, p. 137-46, 1991.

LAU, D. et al. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b and CD18 integrins. **PNAS**, v. 102, n. 2, p. 431– 436, Jan. 2005.

LEE, K.Y. et al. Aloesin up-regulates cyclin E/CDK2 kinase activity via inducing The protein levels of cyclin e, CDK2, and CDC25a in SK-HEP-1 cells. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 41, n. 2, p. 285-292. Feb. 1997.

LEE, J. K et al: Acemannan purified from Aloe vera induces phenotypic and functional maturation of immature dendritic cells. **Int. Immunopharmacol**, v.1, p.1275-1284, 2001

LEI LI, C. et al. Chemerin-Derived Peptide C-20 Suppressed Gonadal Steroidogenesis. **Am J Reprod Immunol.** v. 71, n. 3, p. 265–277, Mar. 2014.

LEMBO, S. et al. MCP-1 in psoriatic patients: effect of biological therapy. **Journal of Dermatological Treatment**, p.1-4, 2013. Disponível em: <Doi: 10.3109/09546634.2013.782091>. Acesso em: 2 jul. 2015.

LEWIS, J. E. et al. The effect of an aloe polymannose multinutrient complex on cognitive and immune functioning in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* v. 33, n. 2, p. 393-406. Disponível em: <doi: 10.3233/JAD-2012-121381>. Acesso em: 2 jul 2015..

LEYSSENS C.,VERLINDEN L. and VERSTUYF A. The future of vitamin D analogs. **Front Physiol.** 2014; 5: 122. doi: 10.3389/fphys.2014.00122

LICHTENSTEIN, A.; DECKELBAUM, R. J. Stanol/sterol Ester–containing foods and blood cholesterol levels. **Circulation.** 2001;103:1177-1179.



LIN, J.G, et al. Aloe-emodin induces apoptosis in T24 human bladder cancer cells through the p53 dependent apoptotic pathway. **Journal of Urology**, v. 175, p.343–7. 2006.

LIN, M.L. et al. Destabilization of CARP mRNAs by aloe emodin contributes to caspase-8-mediated p53-independent apoptosis of human carcinoma cells. **J Cell Biochem**, v.112, p.1176 e 1191, 2011.

LIN, W. et al. Reduced expression of chemerin is associated with a poor prognosis and a lowed infiltration of both dendritic cells and natural killer cells in human hepatocellular carcinoma. **Clin Lab**, p.57, p.879–85.

LIN, Y. et al. Chemerin aggravates DSS-induced colitis by suppressing M2 macrophage polarization. **Cell Mol Immunol**, 2014. Disponível em: <doi:10.1038/cmi.2014.15.>. Acesso em: 1 ago. 2015.

LINDNER, D. et al. Differential expression of matrix metalloproteases in human fibroblasts with different origins. **Biochem Res Int**, p.742-875, 2012.

LINDSEY, K.L.; JÄGER, A.K.; VILJOEN, A.M. Cyclooxygenase inhibitory activity of Aloe species. **South African Journal of Botany**, v. 68, n. 1, p. 47-50, Feb. 2002.

LIPS, P. Relative value of 25(OH)D and 1,25(OH)<sub>2</sub>D measurements. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 22, n. 11, 2007. Disponível em: <doi:10.1359/JBMR.070716>. Acesso em: 1 mar. 2015.

LITT, J. Z. Drug eruption. **Reference Manual**, 12. ed. London, New York: Taylor and Francis, 2006. p. 643-5.

LIU, C. Macrophage activation by polysaccharide biological response modifier isolated from Aloe vera L. var. chinensis (Haw.) Berg. **Int Immunopharmacol**, v. 6, n. 11, p.1634-41. Nov. 2006.

LOIZOU, S. et al.  $\beta$ -Sitosterol exhibits anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. **Mol. Nutr. Food Res**. v. 54, p. 551–558, 2010. Disponível em: <DOI 10.1002/mnfr.200900012>. Acesso em: 12 maio 2015.

LOPES, M. A. et al. Estudo das plantas medicinais, utilizadas pelos pacientes atendidos no programa: “estratégia saúde da família” em Maringá/PR/Brasil. **Rev. Bras. Pi. Med.**, Campinas, v.17, n.4, p.702-706, 2015. Supl. I.

LÓPEZ, A. Phenolic constituents, antioxidant and preliminary antimycoplasmic activities of leaf skin and flowers of Aloe vera (L.) Burm. f. (syn. A. barbadensis Mill.) from the Canary Islands (Spain). **Molecules**, v.18, n. 5, p. 4942-54. Disponível em: <doi: 10.3390/molecules18054942.>. Acesso em: 2 abr 2015.

LORA, V. et al. Autoantibody induction and adipokine levels in patients with psoriasis treated with infliximab. **Immun Res**, v.56, p. 382 e 9, 2013.

LOWES, M. A.; SUÁREZ-FARIÑAS, M. ; KRUEGER, J.G. Immunology of Psoriasis. **Annu Rev Immunol**, v.32, p.227-255. <doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120225.>. Acesso em: 10 ago. 2015.

LUANGSAY, S. et al. Mouse ChemR23 is expressed in dendritic cell subsets and macrophages, and mediates an anti-inflammatory activity of chemerin in a lung disease model. **J Immunol**, v.183, p.6489–99, 2009.

LUCINI, L. et al. Phytochemical constituents and in vitro radical scavenging activity of different Aloe species. **Food Chemistry**, v. 170, p. 501–507, 2015.

LIANG, L.V. et al. BACE1 ( $\beta$ -Secretase) Inhibitory Chromone Glycosides from Aloe vera and Aloe nobilis. **Planta Med**, v. 74, p. 540-545, 2008.

LYNCH, B.; SIMON, R.; ROBERTS, A. Subchronic toxicity evaluation of aloesin. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 61, p.161-71, 2011.

LYNDE, C.W. Interleukin 17A: Toward a new understanding of psoriasis pathogenesis. **J.Am.Acad.Dermatology**, v.71, n. 1, 2014.

KAGEN, M.H.; MCCORMICK, T.S.; COOPER, K.D. Regulatory T Cells in Psoriasis. **Cytokines as Potential Therapeutic Targets for Inflammatory Skin Diseases**, v. 56, p.193-209, 2005.

MABUCHI, T. Chemokine receptors in the pathogenesis and therapy of psoriasis. **Journal of Dermatological Science**, v. 65, p. 4-11, 2012. Disponível em: <doi: 10.1016/j.jdermsci.2011.11.007>. Acesso em: 12 maio 2015.

MCMILLEN, T. et al. Expression of human myeloperoxidase by macrophages promotes atherosclerosis in Mice. **Circulation**, v. 111, p. 2798-2804, 2005.

MAHESHWARI A, K. et al. Epithelial cells in fetal intestine produce chemerin to recruit macrophages. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 297, v. 1, p. G1-G10, 2009. Disponível em: <doi:10.1152/ajpgi.90730.2008>. Acesso em 23 ago. 2015.

MAHIL, S.K.; CAPON, F.; BARKER, J. N. Update on psoriasis immunopathogenesis and targeted immunotherapy. **Semin Immunopathol**, v. 38, p. 11–27, 2016.

MAK, R. K. H.; HUNDHAUSEN, C.; NESTLE, F. O. Progress in Understanding the Immunopathogenesis of Psoriasis. **Actas Dermosifiliogr.**, v. 100, n. 2, 2009.

MANN, E.R. et al. Review: Skin and the Immune System. **J Clin Exp Dermatol Res**, 2012.

BIANCHI, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, Jan. 2007.

MARIANI, F. ; RONCUCCI, L. Chemerin/chemR23 axis in inflammation onset and resolution. **Inflamm. Res.** , v.64, p.85–95, 2015.

MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The Inflammasomes: Guardians of the Body. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 27, p. 229–65, 2009.

MASALDAN, S.; IYER, V. V. Exploration of effects of emodin in selected cancer cell lines: enhanced growth inhibition by ascorbic acid and regulation of LRP1 and AR under hypoxia-like conditions. **J Appl Toxicol.**, v. 34, p. 95-104, 2014.

MASON, A.R. et al. Topical treatments for chronic plaque psoriasis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 3, 2013. Disponível em: <DOI: 10.1002/14651858.CD005028.pub3>. Acesso em: 12 abr. 2015.

MATTERN, A.; ZELLMANN, T. ; BECK-SICKINGER, A. G. Processing, Signaling, and Physiological Function of Chemerin. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 66, n. 1, p. 19–26, Jan. 2014.

MAZZATENTA, C. et al. Psoriasis in Italy: how many patients have severe cutaneous psoriasis? **Journal of European Academy of Dermatology and Venereology**, p.94-95, 2009.

MCFADDEN J.P. et al. Psoriasis and extra domain A fibronectin loops. **British Journal of Dermatology**, v.163, p5–11, 2010.

MCFADDEN, J.P. et al. Psoriasis and streptococci: the natural selection of psoriasis revisited. **Br J Dermatol**, v.160, p. 929-37, 2009.

MCKENNA, M. J.; MURRAY, B. F. Vitamin D dose response is underestimated by Endocrine Society's Clinical Practice Guideline. **Endocrine Connections**, v. 2, p.87–95, 2013.

MEDER, W. et al. Characterization of human circulating TIG2 as a ligand for the orphan receptor ChemR23. **FEBS Lett**, v. 555, p. 495-499, 2003.

MENTER, A.; GRIFFITHS, C. E. M. Psoriasis: The Future. **Dermatol Clin.**, v. 33 p. 161–166, 2015.

MERAD, M.; GINHOUX, F.; COLLIN, M. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. **Nat. Rev. Immunol.** v. 8, p.935–47, 2008.

MESTAS, J.; HUGHES, C. C. W.. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. **J Immunol**, v. 172, p. 2731-2738, 2004.

MICALLEF, L. et al. Effects of extracellular calcium on the growth-differentiation switch in immortalized keratinocyte HaCaT cells compared with normal human keratinocytes. **Experimental Dermatology** 2009; v. 18, p. 143–151.

MICHALAK-STOMA, A. et al. Serum Levels of Selected Th17 and Th22 Cytokines in Psoriatic Patients. **Disease Markers**. v. 35, n. 6, p. 625– 631, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/856056>>. Acesso em: 1 abr 2015.

MIHELLER, P. et al. Methotrexate: Should we start using it in clinical practice? **Current Drug Targets**, v.14, p. 1480-1489, 2013.

MITRA, A. ; ATILLASOY, E. Topical therapies for psoriasis, psoriasis. In: SOUND, Jennifer (ed.). **Psoriasis**. Croatia: InTech, 2012. Cap. 15, p. 309.329. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/psoriasis/topical-therapies-for-psoriasis> >. Acesso em: 1 abr. 2015.

MOGHBEL, A. et al. Wound healing and toxicity evaluation of Aloe vera cream. **Toxicol Lett**, v. 172S, p.S1-S240, 2007.

MONNIER, J. Expression, regulation, and function of atypical chemerin receptor CCRL2 on endothelial cells. **J Immunol.**, v. 189, p. 956–967, 2012.

MOON, E. J. et al. A novel angiogenic factor derived from Aloe vera gel: beta-sitosterol, a plant sterol. **Angiogenesis**, v. 3, p. 117-23, 1999.

MORELLI, V.; CALMET, E.; JHINGADE, V. Alternative therapies for common dermatologic disorders, part 2. **Prim Care Clin Office Pract.**, v. 37, p. 285–296.

MOSTAFA, W. Z. ; HEGAZY, R. A. Vitamin D and the skin: focus on a complex relationship: a review. **Journal of Advanced Research**, v. 6 , n. 6, p. 793–804, Nov. 2015. Disponível em: <[doi.org/10.1016/j.jare.2014.01.011](https://doi.org/10.1016/j.jare.2014.01.011)>. Acesso em: 30 mar. 2015.

MUCIDA, D. et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. **Science**, v. 317, n. 256, 2007.

NAGPAL, S. et al. Tazarotene-induced gene 2 (TIG2), a novel retinoid-responsive gene in skin. **J. Invest. Dermatol.**, v. 109, p. 91–95, 1997.

NAKAJIMA, H. *et al.* Circulating level of chemerin is upregulated in psoriasis. **J Dermatol Sci.**, v. 60, p. 45–47, 2010.

NAST, A. et al. European S3-Guidelines on the systemic treatment of psoriasis vulgaris - update 2015 – short version– EDF in cooperation with EADV and IPC. **JEADV**, v. 29, p. 2277-2294, 2015.

NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CARE EXCELLENCE (NICE) . Psoriasis evidence A summary of selected new evidence relevant to NICE clinical guideline 153 'The assessment and management of psoriasis ' 2012. Nov. 2014.

NAYLOR, A. J.; FILER, A; BUCKLEY, C. D. The role of stromal cells in the persistence of chronic inflammation. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 171, p. 30-35, 2012.

NEDOSZYTKO B. et al. Chemokines and cytokines network in the pathogenesis of the inflammatory skin diseases: atopic dermatitis, psoriasis and skin mastocytosis. **Postępy Dermatologii i Alergologii**, v. 2, Apr. 2014.

NEIMANN, A. L.; PORTER, S. B.; GELFAND, J. M. The Epidemiology of Psoriasis. **Expert Rev. Dermatol.**, v.1, p. 63-75, 2006.

NEMA, J.; SHRIVASTAVA, S. K.; MITRA, N. G. Physicochemical study of acemannan polysaccharide in Aloe species under the influence of soil reaction (pH) and moisture application. **African Journal of Pure and Applied Chemistry**, v. 6, n. 9, p. 132-136, 15 May 2012.

NESTLE, F. O. et al. Plasmacytoid dendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. **J Exp Med.** v. 202, n. 1, p. 135 – 43, 2005.

NESTLE, F.O.; NICKOLOFF, B. J. **Classical mouse models of psoriasis: spontaneous xenograft model featuring use of agr mice.** 2005. Cap.11, p. 204-210.

NESTLE, F. O.; NICKOLOFF, B. J. Animal models of psoriasis: a brief update. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 20, n. 2, p. 24-27, 2006.

NESTLE, F.O. **Clinical and basic immunodermatology psoriasis**, Cap.11, p. 207-216, 2008.

NESTLE, F.O. et al. Skin immune sentinels in health and disease. **Nat Rev Immunol.**, p. 9, n. 10, p. 679–691, Oct. 2009. Disponível em: <doi:10.1038/nri2622>, Acesso em: 20 mar. 2015.

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

NEWMAN, N.; et al. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **J.Nat.Prod.**, v. 79, n. 3, p. 629-66, 2006.

NI Y, T. D. ; YATES, K. M.; TIZARD, I. Isolation and characterization of structural components of Aloe vera L. leaf pulp. **Int Immunopharm.** v. 4, p. 1745-55, 2004.

NICKOLOFF, B. J.; NESTLE, F.O. Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. **J Clin Invest.**, v. 113, p. 1664-75, 2004.

NITSCHKE-SCHMITZ, D. P.; ROHDE, M.; CHATWAL, G.S. Invasion mechanisms of Gram-positive pathogenic cocci. **Thromb Haemost.**, v.98, p. 488–96, 2007.

NOLTING J. et al. Retinoic acid can enhance conversion of naive into regulatory T cells independently of secreted cytokines. **J. Exp. Med.**, v. 206, n. 10, p. 2131-2139, 2009. Disponível em: <doi/10.1084/jem.20090639>. Acesso em: 20 mar 2015.

NOVAK, M.; VETVICKA, V.  *$\beta$ -Glucans, History, and the present: immunomodulatory aspects and mechanisms of action.* **Journal of Immunotoxicology**, v.5, p.47–57, 2008.

NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Guide for the care and use of laboratory animals**. 8th ed. Washington, EUA, 2011.

O`RIELLY, D. D.; RAHMAN, P. Genetic, Epigenetic and Pharmacogenetic Aspects of Psoriasis and Psoriatic Arthritis. **Rheum Dis Clin N Am.**, v.41, p.623–642, 2015.

OH, Y.J. et al. Serum Leptin and Adiponectin Levels in Korean Patients with Psoriasis. **J Korean Med Sci.**, v. 29, p. 729-734, 2014.

OHIRA, T. et al. Serhan CN. Resolvin E1 receptor activation signals phosphorylation and phagocytosis. **J Biol Chem.** , v.285, p.3451–61, 2010.

OKYAR, A. et al. Effect of Aloe vera leaves on blood glucose level in type I and type II diabetic rat models. **Phytother Res.**, v. 15, n. 2, p. 157-61, Mar. 2001.

OLATUNYA, O. S. et al. Pre-liminary trial of Aloe vera gruel on HIV infection. **J Altern Complement Med.**, v.18, p.850-e853.

OLIVEIRA, M. J. R.; SIMÕES, M. J. S.; SASSI, C. R. R. Fitoterapia no Sistema de Saúde Pública (SUS) no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.8, n.2, p.39-41, 2006.

ORYAN, A. et al. Topical Application of Aloe vera accelerated wound healing, modeling, and remodeling: an experimental study with significant clinical value. **Ann Plast Surg.**, 4 Jul. 2014.

OUWEHAND, K. et al. Epidermis-to-dermis migration of immature Langerhans cells upon topical irritant exposure is dependent on CCL2 and CCL5. **Eur. J. Immunol.**, v.40, p. 2026–2034, 2010.

PACHYNSKI ET, A.L. The chemoattractant chemerin suppresses melanoma by recruiting natural killer cell antitumor defences. **J. Exp. Med.** v. 209, n. 8, p. 1427-1435, 2012.

PAL, S.; SAHRAWAT, A.; PRAKASH, D. Aloe vera: composition, processing and medicinal properties. **Current Discovery**, v. 2, n. 2, p. 106-122, 2013.

PALM, N. W.; MEDZHITOV, R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. **Immunological Reviews.**, v. 227, n.1, p. 221–233, Jan. 2009.

PAN, Q. et al. Inhibition of the angiogenesis and growth of aloin in human colorectal cancer in vitro and in vivo. **Cancer Cell Int.**, v.13, p. 69, 2013.

PARIHAR, M. S. et al. Susceptibility of hippocampus and cerebral cortex to oxidative damage in streptozotocin treated mice: prevention by extracts of *Withania somnifera* and *Aloe vera*. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 11, n. 4, p. 397-402, May 2004.

PARISI R. et al. Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, p. 377–385, 2013.

- PARK, C. et al. "Polymer fraction of Aloe vera exhibits a protective activity on ethanol-induced gastric lesions". **International Journal of Molecular Medicine**, v. 27, n.4, p. 511-518, 2011.
- PAROLINI, S. et al. 2007. The role of chemerin in the colocalization of NK and dendritic cell subsets into inflamed tissues. **Blood**, v.109, p. 3625–3632, 2011.
- PARSONAGE, G. et al. Global gene expression profiles in fibroblasts from synovial, skin and lymphoid tissue reveals distinct cytokine and chemokine expression patterns. **Thromb Haemost**, v. 90, p. 688-97, 2003.
- PASPARAKIS, M.; HAASE, I; NESTLE, F. O. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation . **Nature Reviews - Immunology**., v 14, p.289-301, 2014.
- PATHIRANA, D. et al. European S3-Guidelines on the systemic treatment of psoriasis vulgaris. **JEADV**, v. 23, n. 2, p. 5–70, 2009.
- PELLE, E. et al. Keratinocytes act as a source of reactive oxygen species by transfer-ring hydrogen peroxide to melanocytes. **J. Invest. Dermatol.** v. 124, p. 793-797, 2005.
- PENG, L. et al. The Chemerin receptor CMKLR1 is a functional receptor for amyloid-beta peptide. **J Alzheimers Disease**, v. 43, n. 1, p.227-242, 2015.
- PEREIRA, C. O. et al. Abordagem etnobotânica de plantas medicinais utilizadas em dermatologia na cidade de João Pessoa-Paraíba, Brasil. **Rev.Bras.PI.Med.**, Botucatu, v.7, n.3, p.9-17, 2005.
- PERERA, G. K.; DI MEGLIO, P.; NESTLE, F. O. Psoriasis. **Annual Rev. Pathol.**, v. 7, p. 385–422, 2012.
- PIOTROWSKA, A.; WIERZBICKA, J. ; ŻMIJEWSKI, M. A. Vitamin D in the skin physiology and pathology. **Acta Biochimica Polonica**., v. 63, n. 1, p.17–29, 2016.
- PIVARCSI, A.; NAGY, I.; KEMENY, L. Innate immunity in the skin: how keratinocytes fight against pathogens. **Current Immunology Reviews**, v. 29, v. 1, p. 29-42, 2005.
- PORTO FERREIRA C. et al. Psoriasis affects individuals of african descent and white brazilians similarly. **Actas Dermosifiliogr.**, v. 101, n. 3, p. 230 -234, 2010.
- POUWELS, S.D. et al. DAMPs activating innate and adaptive immune responses in COPD. **Mucosal Immunology**, v. 7, n. 2, Mar. 2014.
- POWIS, S. J. A.; WATERWORTH, T. A.; ARKELL, D. G. Preoperative skin preparation: clinical evaluation of depilatory cream. **British Medical Journal**, v. 2, p. 1166-1168, 1976.

PRABJONE, R. et al. Anti-inflammatory effects of Aloe vera on leukocyte-endothelium interaction in the gastric microcirculation of Helicobacter pylori-infected rats. *Clin Hemorheol Microcirc.*, v. 35, n. 3, p. 359-66, 2006.

PRIYANKA SINGH et al. Diverse therapeutic applications of Aloe vera. *Journal of Advanced Scientific Research*, v. 2, n. 4, 2011.

PUGH, N. et al. Characterization of Aloeride, a new high-molecular-weight polysaccharide from Aloe vera with potent immunostimulatory activity. *J Agric Food Chem*, v. 49, p. 1030-1034, 2001.

PULSE, T. L. ; UHLIG, E. A significant improvement in a clinical pilot study utilizing nutritional supplements, essential fatty acids and stabilized Aloe vera juice in 29 HIV seropositive, ARC and AIDS patients. *Journal of Advancement in Medicine*, v. 3, n. 4, 1990.

QIU, Z. et al. Modified Aloe barbadensis polysaccharide with immunoregulatory activity. *Planta Med*, v. 66, p.152-156, 2000.

RABEONY, H. et al. Inhibition of Keratinocyte Differentiation by the Synergistic Effect of IL-17A, IL-22, IL-1a, TNFa and Oncostatin M. *PLoS ONE*, v. 9, n. 7, 2014.

RADHA, M.H.; LAXMIPRIYA, N.P. Evaluation of biological properties and clinical effectiveness of Aloe vera: a systematic review. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, v. 5, p. 21-26, 2015.

RAHMAN, M. et al. Omega – 3 Fatty Acids as pharmacotherapeutics in psoriasis: current status and scope of nanomedicine in its effective delivery. *Current Drug Targets*, v. 14, p. 708-722, 2013.

RAMBERG, J. E; NELSON, E. D.; SINNOTT, R. A. Immunomodulatory dietary polysaccharides: a systematic review of the Literature. *Nutrition Journal*, v. 9, p. 54, 2010.

RAMESH, G.; MACLEAN, A. G. and PHILIPP, M. T. Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain. *Mediators of Inflammation*, v. 2013, 2013.

RANADE, A.N. ; RANPISE, N.S.; RAMESH C. Exploring the potential of gastro retentive dosage form in delivery of ellagic acid and aloe vera gel powder for treatment of gastric ulcers. *Curr Drug Deliv.*, v.11, n. 2, n. 287-97, 2014.

RAPOSO, A. A. et al. Nosological profile in a dermatology referral center in the State of Amazonas – Brazil. *An Bras Dermatol.*, v. 86, v. 3, p. 463-8, 2011.

RATHOR, N. Acute effect of Aloe vera gel extract on experimental models of pain. *Inflammation*, v. 35, n. 6, p. 1900-3, Dec. 2012.

REICH, K.; DAUDEN, E. Treatment adherence: a hurdle for real-life effectiveness in psoriasis? *JEADV*, v. 28, n. 2, p. 1–3, 2014.



- REIHILL, J. A. et al. Induction of the inflammatory regulator A20 by gibberellic acid in airway epithelial cells. **British Journal of Pharmacology**, 2015.
- REN, R. Z. et al. Chronic ethanol consumption increases the levels of chemerin in the serum and adipose tissue of humans and rats. **Acta Pharmacol Sin.**, v. 33, p. 652–659, 2012.
- REUTER, J. Investigation of the anti-inflammatory potential of Aloe vera gel (97.5%) in the ultraviolet erythema test. **Skin Pharmacol Physiol.**, v. 21, p. 106–110, 2008.
- REVERCHON, M. Adipokines and the female reproductive tract. **Int J Endocrinol.**, p. 232-454, 2014.
- RODRIGUES, A. P.; TEIXEIRA, R. M. Revealing the psoriasis. **RBAC**, v. 41, n. 4, p. 303-309, 2009.
- ROMACHO, T. et al. Adipose tissue and its role in organ crosstalk. **Acta Physiol.** 210, p. 733-753, 2014.
- ROMITI R, MARAGNO L, ARNONE M, TAKAHASHI MDF. Psoríase na infância e na adolescência. **An Bras Dermatol.**, v. 84, n. 1, p.9-22, 2009.
- ROURKE, J.L.; DRANSE, H.J. ; SINAL. C. J. Towards an integrative approach to understanding the role of chemerin in human health and disease. **Obesity reviews** v. 14, p. 245–262, 2013.
- RUTKOWSKI, P. et al. Decrease of serum chemerin concentration in patients with end stage renal disease after successful kidney transplantation. **Regulatory Peptides**, v. 173, p. 55–59, 2012.
- RYAN, C et al. Research gaps in psoriasis: opportunities for future studies. **J Am Acad Dermatol.**, v.70, n. 1, p. 146-67, Jan. 2014.
- RYAN, C.; AMOR, K. T.; MENTER, A. The use of cyclosporine in der matology: part II. **J.Am.Acad. Dermatology.**, v. 63, n. 6, Dec. 2010.
- SAALBACH, A. et al. Dermal fibroblasts promote the migration of dendritic cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 130, p. 444–454, 2010.
- SABAT R, P. S. et al. Immunopathogenesis of psoriasis. **Experimental Dermatology**, v. 16, p. 779–798, 2007.
- SACCÙ, D. ; BO.GONI, P.; PROCIDA, G. Aloe exudate: characterization by reversed phase HPLC and headspace GC-MS. **J Agric Food Chem**, v. 49, n. 10, p. 4526–30, 2001.
- SAEIDNIA, S. et al. The story of beta-sitosterol: a review. **European Journal of Medicinal Plants**, v.4, n.5, p. 590-609, 2014.
- SAMSON, M. et al. ChemR23, a putative chemoattractant receptor, is expressed in

dendritic cells and is a co receptor for SIV and some HIV-1 strains. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, p. 1689–1700, 1998.

SANCHEZ, A. P. G. Imunopatogénese da psoríase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 5, p. 747-749, 2010.

SANJAY K RATHI and PASCHAL D'SOUZA Rational and Ethical Use of Topical corticosteroids Based on Safety and Efficacy **Indian J.Dermatology**, v. 57, n. 4, 2012.

SANTOS et al. Clinical and epidemiological profile of psoriasis patients. Ambulatório de Dermatologia da Univ.Estadual do Pará (UEPA), 2009.

SANJAY, K. R. ; D'SOUZA, P. Rational and Ethical Use of Topical corticosteroids Based on Safety and Efficacy **Indian J.Dermatology**, v. 57, n. 4, 2012.

SANTOS et al. **Clinical and epidemiological profile of psoriasis patients.** Ambulatório de Dermatologia da Univ.Estadual do Pará (UEPA), 2009.

SCHÖN M.P.and SCHÖN M. Imiquimod: mode of action. **British Journal of Dermatology**, v. 157, n. 2, p.8-13, 2007. Disponível em: <doi: 10.1111/j.1365-2133.2007.08265.x>. Acesso em: 20 abr. 2015.

SCHWARZ, T. Mechanisms of UV-induced immunosuppression. **Keio J Med**, v. 54, n. 4, p. 165-171, 2005.

SEHGAL, I. et al. Toxicologic assessment of a commercial decolorized whole leaf aloe vera juice, lily of the desert filtered whole leaf juice with aloesorb. **J Toxicol**, v. 2013, 11 Mar. 2013. Disponível em:<doi:10.1155/2013/802453> Acesso 18 fev. 2015.

SHARRIF, M.; SANDEEP, K.V. Aloe vera their chemicals composition and applications: A review **Int J Biol Med Res.**, v. 2, n. 1, p. 466-471, 2011.

SHAHZAD, M. N.; AHMED, N. Effectiveness of Aloe Vera Gel compared with 1% silver sulphadiazine cream as burn wound dressing in second degree burns. **JPMA**, v. 63, n. 2, p. 225-230, 2013.

SHIMAMURA, K. et al. Identification of a stable chemerin analog with potent activity toward ChemR23. **Peptides**, v. 30, p. 1529–1538, 2009. Disponível em:<doi: 10.1016/j. Peptides.2009.05.030> Acesso 30 jan. 2015.

SIDDIQUI, A.A. et al. Role of Natural Products in Drug Discovery Process **Int. J. Drug Dev. & Res.**, v. 6, n. 2, 2014.

SILVA, KS.; SILVA, EAT. Psoríase e sua relação com aspectos psicológicos, stress e eventos da vida. **Estud. Psicol.**, v. 24, n. 2, p. 257-66, 2007.

SILVA, SS. et al. Bioinspired Aloe vera sponges for biomedical applications. **Carbohydr Polym.**, v. 112, p. 264-70, 4 nov. 2014. Disponível em:< doi: 10.1016/j.carbpol.2014.05.042> Acesso 12jun.2015.

SINGAB, AN.B. et al. A Systemic Review on Aloe arborescens Pharmacological Profile: Biological Activities and Pilot Clinical Trials. **Phytother. Res.**, v. 29, p.1858-1867, 2015.

SINGH, TP.; HOON, L. C.; FARBER, JM .Chemokine receptors in psoriasis. **Expert Opin. Ther. Targets**, v. 17, n. 12, p. 1405-1422, 2013.

SLOMINSKI, AT. et al. Cutaneous expression of CRH and CRH-R. Is there a “skin stress response system?”.**Ann N Y Acad Sci.**, v. 885, p. 287–311, 1999.

SLOMINSKI, A.T. et al. Classical and non-classical metabolic transformation of vitamin D in dermal fibroblasts. **Experimental Dermatology**, v. 25, p. 229–244, 2016. Disponível em:<doi 10.1111/exd.12872> Acesso 9 out. 2015.

SMITH, N. et al. Complementary and alternative medicine for psoriasis: A qualitative review of the clinical trial literature. **J Am Acad Dermatol**, v. 61, p. 841-56, 2009.

SOLIMAN, HAE.; MANTAWY, MM.; HASSAN, HM. Biochemical and Molecular Profiles of Gibberellic Acid Exposed Albino Rats. **Journal of American Science**, v. 6, n.11), p. 18 -23, 2010.

SOMBOONWONG, J. et al. Therapeutic effects of Aloe vera on cutaneous microcirculation and wound healing in second degree burn model in rats. **J Med Assoc Thai.**, v. 83, n. 4, p. 417-25, 2000.

SONG, PI.et al. Human keratinocytes express functional CD14 and toll-like receptor 4. **J Invest Dermatol**, v. 119, n. 2, p. 424-32, 2002.

SORRELL, J.M.; CAPLAN, A.I. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. **Journal of Cell Science**, v. 117, p. 667-675, 2004. Disponível em: <doi:10.1242/jcs.0100> Acesso 8 fev. 2015.

SPARVERO, L.J. et al. RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts), RAGE Ligands, and their role in Cancer and Inflammation. **Journal of Translational Medicine**, v. 7, n. 17, 2009. Disponível em:<doi:10.1186/1479-5876-7-17> Acesso 22 set. 2015.

SPERANZA, G. et al. Aloeresin I, an anti-inflammatory 5-methylchromone from Cape Aloe. **Planta Med**, v. 71, p. 79-81, 2005.

SPÖRRI, B. et al. Soluble IL-6 receptor induces calcium flux and selectively modulates chemokine expression in human dermal fibroblasts. **Int. Immunol.**, v. 11, n. 7, p. 1053-1058, 1999. Disponível em:<doi: 10.1093/intimm/11.7.1053.> Acesso 20 jun. 2015.

STRANGE, AMY. et al. Genome-wide association study identifies new psoriasis susceptibility loci and an interaction between HLA-C and ERAP1. **Nat Genet.**, v. 42, n. 11, p. 985–990, 2010. Disponível em:<doi:10.1038/ng.694.> Acesso 10 jul. 2015.

SUBOJ, P. et al. Aloeemodin inhibits colon cancer cell migration/angiogenesis by downregulating MMP-2/9, RhoB and VEGF via reduced DNA binding activity of NF- $\kappa$ B. **Eur J Pharm Sci.**, v. 45, p. 581-591, 2012.

SUGIYAMA, H. et al. Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25high regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. **J Immunol**, v. 174, p. 164-73, 2005.

SUMIDA, H. et al. Interplay between CXCR2 and BLT1 Facilitates Neutrophil Infiltration and Resultant Keratinocyte Activation in a Murine Model of Imiquimod-Induced Psoriasis. **Journal of Immunol**, v. 192, p. 4361-4369, 2014. Disponível em:<doi: 10.4049/jimmunol.1302959> Acesso 15 mai.2015.

SUN-A, IM. et al. In Vivo Evidence of the Immunomodulatory Activity of Orally Administered Aloe vera Gel. **Arch Pharm Res.**, v. 33, n. 3, p. 451-456, 2010. Disponível em:<doi 10.1007/s12272-010-0315-1> Acesso 6 Apr. 2015.

SYEDA,. et al. New roles of the multidimensional adipokine: Chemerin. Khan. **Peptides**, v. 62 p. 15–20, 2014.

SZÉLL, M. et al. Proliferating keratinocytes are putative sources of the psoriasis susceptibility-related EDA+ (extra domain A of fibronectin) oncofetal fibronectin. **J. Invest. Dermatol**, v. 123, n. 3, p. 537–546, 2004.

TABANDEH, M.R.; ORYAN, A.; MOHAMMADALIPOUR, A. Polysaccharides of Aloe vera induce MMP-3 and TIMP-2 gene expression. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 65, p. 424-430, April 2014.

TABOLACCI, C. et al. Aloe-emodin exerts a potent anticancer and immunomodulatory activity on BRAF-mutated human melanoma cells. **Eur J Pharmacol**, v. 762, p. 283-92, 5 Sep.2015. Disponível em:<doi: 10.1016/j.ejphar.2015.05.057> Acesso 3 jun. 2015.

TAKAHASHI, H. et al. Plasma adiponectin and leptin levels in Japanese patients with psoriasis. **Br J Dermatol**, v. 159, p. 1207–1208, 2008.

TANAKA, M. et al. Effects of plant sterols derived from Aloe vera gel on human dermal fibroblasts in vitro and on skin condition in Japanese women. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 8, p. 95–104, 2015.

TIZARD, I.R. et al. The effect of acemannan on wound healing in young and old rats. **Wound**, v. 6, p. 201-209, 1994.

TOLIOPOULOS, I. et al. NK cell stimulation by administration of vitamin C and Aloe vera juice in vitro and in vivo: A pilot study. **Journal of Herbal Medicine**, v. 2, n. 2, p. 29-33, Jun. 2012.

TÖNJES, A. et al. Genome Wide Meta-analysis Highlights the Role of Genetic Variation in RARRES2 in the Regulation of Circulating Serum Chemerin. **PLoS Genet**, v. 10, n. 12, 2014. Disponível em:< doi:10.1371/journal.pgen.1004854> Acesso 7 mai. 2015.

TOSTI, A. et al. Evaluation of the efficacy of acitretin therapy for nail psoriasis. **Arch Dermatol**, v. 125, n. 3, p. 269-271, 2009.

TREMBATH, C. et al. Identification of a major susceptibility locus on chromosome 6p and evidence for further disease loci revealed by a two stage genome-wide search in psoriasis. **Human Molecular Genetics**, v. 6, n. 5, p. 813–820, 1997.

TROWBRIDGE, M.; PITTELKOW, R. Epigenetics in the Pathogenesis and Pathophysiology of Psoriasis Vulgaris. **J Drugs Dermatol**, v. 13, n. 2, p. 111-118, 2014.

TSANKOV, N.; ANGELOVA, I.; KAZANDJIEVA, J. Drug-induced psoriasis. Recognition and management. **Am J Clin Dermatol**, v. 1, p. 159–165, 2000.

UVA, L. Mechanisms of Action of Topical Corticosteroids in Psoriasis Review Article. **International Journal of Endocrinology**, v. 2012, 5 Nov. 2012. Disponível em:<doi:10.1155/2012/561018> Acesso 26 fev.2015.

VAKIRLIS, E. KASTANIS, A. IOANNIDES, D. Calcipotriol/betamethasone dipropionate in the treatment of psoriasis vulgaris. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 4, n. 1, p. 141–148, 2008.

VALERIO, M.S.; AWAD, A.B. Betasitosterol down-regulates some pro-inflammatory signal transduction pathways by increasing the activity of tyrosine phosphatase SHP-1 in J774A.1 murine macrophages, **Int. Immunopharmacol**, v. 11, n. 8, p. 1012–1017, 2011.

VALERIO, M.S. et al. b-Sitosterol modulates TLR4 receptor expression and intracellular MyD88-dependent pathway activation in J774A.1 murine macrophages. **Cellular Immunology**, v. 285, p. 76–83, 2013. Disponível em:<doi.org/10.1016/j.cellimm.2013.08.007> Acesso 14 out. 2015.

VAN DE KERKHOF. et al. Psoriasis: consensus on topical therapies. **JEADV**, v. 22, p. 859 – 870, 2008. Disponível em:< doi:10.1111/j.1468-3083.2007.02534.x> Acesso 25 abr. 2015.

VAN DE KERKHOF, P. et al. Physician perspectives in the management of psoriasis and psoriatic arthritis: results from the population-based Multinational Assessment of Psoriasis and Psoriatic Arthritis survey. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, 2015.

VAN DER FITS. et al. Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice Is Mediated via the IL-23/IL-17 Axis. **The Journal of Immunology**, v. 182, p. 5836-5845, 2009.

VAN POPPEL, M.N.M. et al. .Cord blood chemerin: differential effects of gestational diabetes mellitus and maternal obesity. **Clinical Endocrinology**, v. 80, p. 65–72, 2014.

VASQUEZ, B. et al. Antiinflammatory activity of extracts from Aloe vera gel. **J. Ethnopharmacol**, v. 55, p. 69-75, 1996.

VERMI W. et al. Role of ChemR23 in directing the migration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to lymphoid organs and inflamed skin. **JEM**, v. 201, n. 4, p. 509–515, 21 Feb.2005.

VERMI, W. et al . Cutaneous distribution of plasmacytoid dendritic cells in lupus erythematosus. Selective tropism at the site of epithelial apoptotic damage. **Immunobiology**, v. 214, p. 877–886, 2009.

VESTERGAARD, C. et al. Expression of CCR2 on Monocytes and Macrophages in Chronically Inflamed Skin in Atopic Dermatitis and Psoriasis. **Acta Derm Venereol**, v. 84, p. 353–358, 2004.

VIJAYALAKSHMI, D. et al. In vitro anti inflammatory activity of Aloe vera by down regulation of MMP-9 in peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Ethnopharmacology**,v. 141, n. 1, p. 542-546, 7 May. 2012.

VILLANOVA, F.; DI MEGLIO, P.; NESTLE, F.O. Biomarkers in psoriasis and psoriatic arthritis. **Ann Rheum Dis.**, v. 72, p. 104–110. 2013. Disponível em:< doi:10.1136/annrheumdis -2012-203037> Acesso 18 fev. 2015.

VOGEL, et al. Macrophages migrate in an activation-dependent manner to chemokines involved in neuroinflammation. **Journal of Neuroinflammation**, v. 11, n. 23, 2014.

VOORHEES, A.V et al. The Psoriasis and Psoriatic Arthritis Pocket Guide: Treatment algorithms and management options. **The National Psoriasis Foundation**, 2009.

WAGNER, F. et al. Psoriasis: what we have learned from mouse models. **Nat. Rev. Rheumatol**, v. 6, p. 704–714, 2010.

WALUGA, M. et al. Serum adipokines in inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 22, p. 14 Jun. 2014. p. 6912-6917 Disponível em :<doi:10.3748/wjg.v20.i22.6912> Aesso 14 jun. 2014.

WANG B, et al. Streptococcal modulation of cellular invasion via TGF-beta1 signaling. **Proc Natl Acad Sci**, USA v. 103, p. 2380–2385. 2006.

WANG, B. et al. Induction of TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 1–dependent predominant Th17 differentiation by group a streptococcal infection. **PNAS**, v. 107, n. 13, p. 5937–5942, 30 March. 2010.

WANG, Q. et al. Chemerin, a novel regulator of follicular steroidogenesis and its potential involvement in polycystic ovarian syndrome. **Endocrinology**, v. 153, p. 5600–11, 2012.

WARREN, B.; GRIFFITHS, C.E.M. Future Therapeutic Directions for the Treatment of Psoriasis. **Actas Dermosifiliogr.**, v. 100, n. 2, p. 28-31, 2009.

WATT, FM. Mammalian skin cell biology: At the interface between laboratory and clinic. **Science**, v. 346, n. 937, 2014.

WEI, D. et al. Glucan stimulates human dermal fibroblast collagen biosynthesis through a nuclear factor-1 dependent mechanism. **Wound Repair Regen**, v. 10, n. 3, p.161-8, May-Jun. 2002.

WEIGERT, J. et al. Circulating levels of chemerin and adiponectin are higher in ulcerative colitis and chemerin is elevated in Crohn's disease. **Inflamm Bowel Dis.**, v. 16, n. 4, p. 630-7, Apr. 2010.

WEIGL, BA. The significance of stress hormones (glucocorticoids, catecholamines) for eruptions and spontaneous remission phases in psoriasis. **Int J Dermatol**, v. 39 n. 9, p. 678–688, 2000.

WEINDL, G. et al. Epithelial cells and innate antifungal defense. **Journal of Dent Res**, v. 89, n. 7, p. 666-75, 2010.

WEN, GING, LI. et al. Smoking and Risk of Incident Psoriasis Among Women and Men in the United States: A Combined Analysis **American Journal of Epidemiology** Advance Access published. 12 January 2012.

WERNER, BETINA. **Avaliação histológica e imuno-histoquímica comparativa de biópsias de pele de pacientes com psoríase Antes e após tratamento com acitretin**. 2006. 82 f. Tese (Doutorado em Ciências), Ciências de Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2006.

WHO. **Traditional medicine strategy**. Geneva, 2002. p. 2002–2005.

WHO. **Traditional medicine strategy**. 2013. p. 2014-2023. World Health Organization. 2013.

WHO. **World Health Organisation**. Geneva, 1999. v.1.

WILLIAMS, K. **The role of the adipokine chemerin in prostate cancer**. Thesis (PHD of Medicine). University of Warwick, Department of Medicine, v. 159, 2014. Disponível em: <<http://go.warwick.ac.uk/wrap/63889>>. Acesso 21 nov. 2014..

WITTAMER, V. et al. Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. **J Exp Med**, v. 198, n. 7, p. 977-85, 2003.

WITTAMER, V. et al. The C-terminal nonapeptide of mature chemerin activates the chemerin receptor with low nanomolar potency. **J Biol Chem**, v. 279, n. 11, p. 9956–9962, 2004.

WITTAMER, V. et al. Neutrophil-Mediated Maturation of Chemerin: A Link between Innate and Adaptive Immunity. **The Journal of Immunology**, v. 175, p. 487–493, 2005. Disponível em: <doi: 10.4049/jimmunol.175.1.487> Acesso 5 fev. 2015.

WOJAS-PELC, A. et al. Cytokine network in psoriasis. Cross-talk between keratinocytes and cells of the skin immune system. **Centr Eur J Immunol**, v. 31 n. 3-4. p. 111-116, 2006.

XAVIER, AC.; MORAES, ML.; FERREIRA, M. Immobilization of aloin encapsulated into liposomes in layer-by-layer films for transdermal drug delivery. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.**, v. 33, n. 3, p. 1193-6. 1 Apr. 2013. Disponível em :<doi: 10.1016/j.msec.>. Acesso. 21 dez. 2012.

XING, W. et al. Acemannan accelerates cell proliferation and skin wound healing through AKT/mTOR signaling pathway. **Journal of Dermatological Science**, v. 79 p. 101–109, 2015. Disponível em: <doi.org /10.1016/ j.jdermsci>. Acesso 16 marc. 2015.

YADAV, A.; SAINI, V.; ARORA, S. MCP-1: Chemoattractant with a role beyond immunity: A review. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, p. 1570–579, 2010.

YAGI, A. et al. Antibradykinin active material in Aloe saponaria. **J Pharm Sci.**, v. 71, n. 10, p. 1172-4, Oct. 1982.

YAGI, A. et al. Antioxidant, free radical scavenging and anti-inflammatory effects of aloesin derivatives in Aloe vera. **Planta Med.**, v. 68, n. 11, p. 957-60, Nov. 2002.

YAGI, A. Possible hypoglycemic effect of Aloe vera L. high molecular weight fractions on type 2 diabetic patients. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 17, n. 3, p. 209-215, July. 2009.

YAMAGUCHI Y. Proteolytic Cleavage of Chemerin Protein Is Necessary for Activation to the Active Form, Chem157S, Which Functions as a Signaling Molecule in Glioblastoma. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 286, n. 45, p. 39510 – 39519, 11 Nov. 2011.

YAMAWAKI, H. et al. A novel adipocytokine, chemerin exerts anti-inflammatory roles in human vascular endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 423, p. 152–7, 2012.

YAN, Q. et al . The association of serum chemerin level with risk of coronary artery disease in Chinese adults. **Endocrine**, v. 41, p. 281–288, 2012.

YAO, C., et al. Toll-like receptor family members in skin fibroblasts are functional and have a higher expression compared to skin keratinocytes. **Int.Journal of Mol Medicine**, v. 35, p. 1443-1450, 2015.



YIN, Z. et al.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. **Food Science and Human Wellness**, v. 3, p. 136–174, 2014.

YONEHARA, A. Aloe vera Extract Suppresses Proliferation of Neuroblastoma Cells In Vitro. **Anticancer Res.**, v. 35, n. 8, p. 4479-85, Aug. 2015.

YONGCHAIYUDHA, S. et al. Antidiabetic activity of Aloe vera L. juice. I. Clinical trial in new cases of diabetes mellitus. **Phytomedicine**, v. 3, p. 3:241-3, 1996.

YOSHIMURA, T.; OPPENHEIM, J. J. Chemokine-like receptor 1 (CMKLR1) and chemokine (C–C motif) receptor-like 2 (CCRL2); Two multifunctional receptors with unusual properties. **Experimental Cell Research**, v. 317, p. 674–684, 2011.

YOSIPOVITCH, G.; DEVORE, A.; DAWN, A. Obesity and the skin: Skin physiology and skin manifestations of obesity. **J Am Acad Dermatol**, v. 56, n.6, 2007.

YOUNG, HS. et al. Single nucleotide polymorphisms of vascular endothelial growth factor (VEGF) in psoriasis of early onset. **J Invest Dermatol**, v. 122, p. 209–15, 2004.

YOUNG, K.; JEON-SOO, S.; MOON, H. NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases. **Yonsei Med J**, v. 57, n. 15-14, Jan. 2016.

YU, ZH. et al. Effect of Aloe vera polysaccharides on immunity and antioxidant activities in oral ulcer animal models. **Carbohydr Polym**, v. 75, p. 307-11, 2009.

ZABEL, BA.; SILVERIO, AM.; BUTCHER, EC. Chemokine-like receptor 1 expression and chemerin-directed chemotaxis distinguish plasmacytoid from myeloid dendritic cells in human blood, **J. Immunol**, v. 174, p. 244–251, 2005a.

ZABEL, BA. et al. Chemerin activation by serine proteases of the coagulation, fibrinolytic, and inflammatory cascades. **J Biol Chem**, v. 280, p. 34661–6, Aug. 2005b.

ZABEL, BA. et al. Chemokine-like receptor 1 expression by macrophages in vivo: Regulation by TGF- $\beta$  and TLR ligands. **Experimental Hematology**, v. 34, p. 1106–1114, 2006.

ZABEL, BA. et al. Chemoattractants, extracellular proteases, and the integrated host defense response. **Exp Hematol**, v. 34, p. 1021 – 1032, 2006.

ZABEL, BA. et al. Mast cell-expressed orphan receptor CCRL2 binds chemerin and is required for optimal induction of IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis. **J Exp Med**, v. 205, p. 2207–2220, 2008.

ZABEL, BA. et al. Chemerin regulation and role in host defense. Review article, **Am J Clin Exp Immunol**, v. 3, n. 1, p. 1-19, 2014.

ZABEL, BA.; ROTT, A.; BUTCHER, E.C. Leukocyte Chemoattractant Receptors in Human Disease Pathogenesis. **Annu. Rev. Pathol Mech. Dis**, v. 10, p. 51–81, 2015.

ZAIYOU, M.; NIZET V.; GALLO RL. Antimicrobial and protease inhibitory functions of the human cathelicidin (hCAP18/LL-37) prosequence. **J Invest Dermatol**, v. 120, p. 810–816, 2003.

ZANGENEH, F. Z.; SHOOSHTARY F.S. Psoriasis: types, causes and medication. In: LIMA, Hermenio (ed). **Types, causes and medication**. Croatia: Intech, 2013. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/psoriasis-types-causes-and-medication/psoriasis-types-causes-and-medication>> Acesso em: 20 abr. 2015.

ZHANG, H.; GU, J. Progress of experimental study on treatment of psoriasis by Chinese medicinal monomer and single or compound recipe in Chinese material medica. **Chin J IntegrMed**, v. 13, n. 4, p. 312–316, 2007.

ZHANG, L.; TIZARD. Activation of a mouse macrophage cell line by acemannan: The major carbohydrate fraction from Aloe vera gel. **Immunopharmacology**, v. 35, p. 19-128, 1996.

ZHANG, W. et al. The Pro-Inflammatory Cytokine IL-22 Up-Regulates Keratin 17 Expression in Keratinocytes via STAT3 and ERK1/2. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, 2012. Disponível em: <[doi:10.1371/journal.pone.0040797](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040797)>. Acesso 12 fev. 2015.

ZHANG, Y. et al. Antitumor and antiangiogenic effects of GA-13315, a gibberellin derivative. **Invest New Drugs**, v. 30, p. 8 –16, 2012. Disponível em: <[DOI 10.1007/s10637-010-9501-8](https://doi.org/10.1007/s10637-010-9501-8)>. Acesso: 2 abr. 2015

ZHAO, L. et al. Chemerin158K Protein Is the Dominant Chemerin Isoform in Synovial and Cerebrospinal Fluids but Not in Plasma (2011) **J. Biol.Chem**, v. 286, p. 39520–3952.

ZHAO, S. et al. Expression of chemerin correlates with a favorable prognosis in patients with non-small cell lung cancer. **Lab Medicine**, v. 42, p. 553–557, 2011.

ZHOU JUN-XIAN et al. Chemerin C9 peptide induces receptor internalization through a clathrin-independent pathway. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 35, p. 653–663, 2014.

ZOLLNER et al. Animal models of T-cell-mediated skin diseases. **BioEssays**, v.26, p. 693 – 696, 2004.

ZSCHOCKEI et al. Non-adherence and measures to improve adherence in the topical treatment of psoriasis. **JEADV**, v. 28, n. 2, p. 4–9, 2014.

**Apêndice** - Características dos principais agentes biológicos aprovados para uso em psoríase no Brasil. Fonte : Parthirana D., Ormerod AD. et al, 2009; Diamantino F., Ferreira A., 2011; Lin K. e Mahadevan, L, 2014; Savage LJ et al , 2015)

Aspectos terapêuticos	Fármaco			
	Etanercepte	Infliximabe	Adalimumabe	Ustekinumabe
Aprovação para uso em psoríase (Ano / Orgão)	Set. 2004 (EMA)	Set. 2005 (EMA)	Dez. 2007 (EMA) e Dez. 2008 (FDA) em três estudos CTIII de grande escala	EMA (2009) e FDA (2013) para PsA
Dose inicial recomendada	2 x 25 mg ou 2 x 50 mg por semana (0-12 semanas)	5 mg / kg de peso corporal	80 mg por via subcutânea	45 mg adm inicialmente às semanas 0 e 4
Dose recomendada de manutenção	2 x 25 mg ou 2 x 50 mg por semana	5 mg / kg de peso do corpo a cada 2, 6, e, em seguida, a cada 8 semanas.	40 mg por via subcutânea a cada duas semanas.	45 mg ou 90mg adm a cada 12 semanas
Tempo de resposta clínica significativa esperada	Após 6 - 8 semanas	Após 1-2 semanas	Após 4 semanas	12ª semana de tratamento
Índice PASI de resposta ao tratamento	PASI 75 em 33% ou 49% após 12 semanas (2 x 25mg ou 2 x 50 mg por semana, respectivamente)	PASI 75 em aproximadamente 80% dos pacientes após 10 semanas.	PASI 75 em 53-80%	PASI 75 de ± 67%
Contra indicações absolutas e específicas do fármaco ou efeitos colaterais importantes	Gravidez / amamentação e a doença desmielinizante	hipersensibilidade ao infliximabe, proteínas murinas ou a qualquer componente da formulação e eventos autoimunes (SLE).	reações no local de injeção; infecções (trato aéreo e genito urinário); raramente LES induzido por drogas e linfoma	Baixa frequência de efeitos adversos graves (cardíacos infecções ou malignidades)
Interações medicamentosas importantes	Anakinra® - antagonista do receptor de rh IL-1 utilizado como um anti-inflamatório para o tratamento de artrite reumatóide	Recomenda-se um ajuste nas doses de MTX e CsA (imunossupressores em geral) ao serem adm. juntos	Anakinra® e Abatacept, Este último um modulador seletivo das TCs bloqueando a ativação das mesmas ao interromper sua interação CD28 ↔ CD80/86 na APC.	nd
Considerações especiais	Considerar o ganho de peso para os pacientes	contracepção efetiva de até 6 meses após o fim do tratamento em mulheres em idade fértil por segurança	Semelhante ao infliximabe apresenta mais risco de linfoma, mesmo que raro, do que o etanercepte	rapidez dos primeiros resultados com PASI 50 na 2ª semana de tratamento

**Legenda:** (FDA) Food Drug Administration; (EMA) European (MTX) metotrexate; (CaS) Ciclosporina A; (APCs) células apresentadoras de antígeno