**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**

ANA CAROLINA MIGUEL ALVARENGA

Efeitos do óleo da semente do maracujá na psoríase experimental

RIBEIRÃO PRETO

2018

ANA CAROLINA MIGUEL ALVARENGA

Efeitos do óleo da semente do maracujá na psoríase experimental

“Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)”

Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Patologia.

Opção: Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia

RIBEIRÃO PRETO

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Alvarenga, Ana Carolina Miguel

Efeitos do óleo da semente do maracujá na psoríase experimental. /
Ana Carolina Miguel Alvarenga; Orientador, Sérgio Britto Garcia - 2018.
78p.: il.; 30 cm

Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Saúde da
Criança e Adolescente, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto,
Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

1. Psoríase. 2. Interleucina - 6. 3. *Passiflora edulis*. 4. Modelo
Animal

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluno: Ana Carolina Miguel Alvarenga

Título: Efeitos do óleo da semente do maracujá na psoríase experimental

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a
obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento _____

*À minha família, especialmente aos meus pais,
Silvio e Rita, por serem minha base e sustentação,
por me amarem incondicionalmente e ser meu norte,
dedico.*

AGRADECIMENTOS

Ao Meu Grandioso Deus por ser minha inspiração, a luz da minha vida, razão de todo meu existir, por dar sentido às coisas e ser minha missão maior. À minha amada família, meus pais, Silvio e Rita, pelo amor incondicional, por todo apoio e colaboração, por todas as orações e por sempre acreditarem em mim, e à minha querida irmã, Luiza. Obrigada por tanto, vocês são tudo para mim. À minha grande família, avós, tios e primos, pelas orações, pelo amor, pelo carinho. Ao meu namorado Geraldo, pelo seu amor, carinho, atenção, por completar minha vida e me fazer ainda mais feliz. Aos meus amigos, pelo carinho, motivação e amizade sincera, que foram essenciais durante esses dois anos e será sempre. Aos muitos amigos que fiz no Departamento, Andrea, Isabela, Raffaella, João Pedro, Carolina, Letícia, e os amigos de universidade, em especial Stefânia, Jessica e Carolinne pela amizade, pela ajuda de sempre. Aos funcionários da Patologia e do CEMEL, em especial, ao Henrique, do Biotério, que foi incrível e atencioso, ao Felipe, da informática, que sempre me socorreu e por toda gentileza, à Camila, Rodrigo e Rosangela da secretaria do departamento por serem sempre tão pacientes e amigos e à Célia, por toda dedicação e amizade. Às meninas do laboratório, que mais do que técnicas, foram amigas, Rose e Érica, obrigada por tudo. À Maria Cecília Onofre, por tanta presteza e gentileza. À Exma. Profa. Dra. Patrícia da FCFRP-USP e suas alunas, pelo apoio e colaboração. Ao Exmo. Prof. Dr. Norberto da FCFRP-USP e seus técnicos, pelo apoio e colaboração. À CAPES, pelo apoio financeiro, que proporcionou a realização desse trabalho.

Ao meu orientador Exmo. Prof. Dr. Sérgio B. Garcia, pela confiança, oportunidade de crescimento pessoal e acadêmico, pela participação neste trabalho realizado com tanta dedicação e por tanta gentileza. Poucas vezes tive a oportunidade de conviver com ser tão íntegro, justo, honesto, sábio e gentil suficiente para dividir e compartilhar seus conhecimentos e experiências adquiridos ao longo da sua vida. Foi e sempre será um prazer ser orientada pelo Sr.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

“A maravilhosa disposição e harmonia do universo só pode ter tido origem segundo o plano de um Ser que tudo sabe e tudo pode.”

Isaac Newton

ALVARENGA, A. C. M. **Efeitos do óleo de semente de maracujá na psoríase experimental, 2018.** Dissertação. Departamento de Patologia e Medicina Legal – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2018.

RESUMO

A psoríase é uma doença de pele inflamatória crônica, que afeta cerca de 2-4% da população mundial. Se desenvolve ao longo do tempo, principalmente no final da adolescência ou início da idade adulta e depende de uma complexa interação entre fatores genéticos e ambientais. Dados experimentais demonstram que a dermatite induzida por imiquimode (IMQ) em camundongos assemelha-se estreitamente às lesões de psoríase humana, tanto nas características fenotípicas e histológicas como no desenvolvimento das lesões na epiderme. O estudo avaliou os efeitos anti-inflamatórios do óleo de semente de maracujá (*Passiflora edulis*) no tratamento da psoríase, utilizando a análise histológica e imunológica da epiderme. O experimento foi realizado com 36 camundongos Balb/c, os quais foram submetidos à indução da psoríase por imiquimode, por 10 dias consecutivos. O tratamento foi realizado com óleo de semente de maracujá *in natura* 100%, pomada LECIGEL® 2%, pomada associação de óleo de semente de maracujá 20% e LECIGEL® 2%, por 15 dias. Tanto o óleo da semente do maracujá quanto a associação do mesmo ao LECIGEL® diminuíram o quadro inflamatório induzido por imiquimode nas orelhas tratadas. Através das análises imuno-histoquímicas realizadas na epiderme (PCNA, IL-6, VEGF, CD34), observou-se um aumento na formação de corpos apoptóticos, diminuição a hiperplasia epitelial e redução do infiltrado inflamatório. Os resultados deste experimento demonstraram que o óleo da semente do maracujá desempenha um efeito anti-inflamatório no tratamento da psoríase induzida por imiquimode.

Palavras-chave: Psoríase, Interleucina-6, *Passiflora edulis*, modelo animal.

ALVARENGA, A. C. M. **Effects of passion fruit seed oil on experimental psoriasis, 2018.** Dissertation. Department of Pathology and Legal Medicine - Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2018.

ABSTRACT

Psoriasis is a chronic inflammatory skin disease that affects about 2-4% of the world's population. It develops over time, especially in late adolescence or early adulthood and depends on a complex interaction between genetic and environmental factors. Experimental data show that imiquimode-induced dermatitis (IMQ) in mice closely resembles human psoriasis lesions, both in phenotypic and histological characteristics and in the development of lesions in the epidermis. The study evaluated the anti-inflammatory effects of passion fruit (*Passiflora edulis*) oil in the treatment of psoriasis, using the histological and immunological analysis of the epidermis. The experiment was performed with 36 Balb / c mice, which were submitted to psoriasis induction by imiquimode, for 10 consecutive days. The treatment was carried out with 100% fresh passion fruit seed oil, LECIGEL ® 2% ointment, 20% passion fruit seed oil ointment and LECIGEL ® 2% for 15 days. Both passionflower seed oil and its association with LECIGEL ® decreased the imiquimod-induced inflammation in the treated ears. Through the immunohistochemical analyzes performed on the epidermis (PCNA, IL-6, VEGF, CD34), an increase in the formation of apoptotic bodies, decrease in epithelial hyperplasia and reduction of inflammatory infiltrate was observed. The results of this experiment suggest that passion fruit seed oil has an anti-inflammatory effect in the treatment of imiquimode-induced psoriasis.

Keywords: Psoriasis, Interleukin-6, *Passiflora edulis*, animal model.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<i>Figura 1:</i> Células envolvidas no mecanismo de ativação da Psoríase.....	19
<i>Figura 2:</i> Diagrama ilustrando as funções da IL-6 na diferenciação de células T e funções efetoras.	24
<i>Figura 3:</i> Delineamento experimental	35
<i>Figura 4:</i> Macroscopia grupo 2 G2 controle.....	41
<i>Figura 5:</i> Macroscopia grupo 3 G3 controle.....	42
<i>Figura 6:</i> Macroscopia grupo 4 G4 controle.....	42
<i>Figura 7:</i> Macroscopia grupo G5/G6 Imiquimode	43
<i>Figura 8:</i> Macroscopia grupo G5/G7 Imiquimode	44
<i>Figura 9:</i> Macroscopia grupo G8 Imiquimode	45
<i>Figura 10:</i> Análise histológica H&E grupos controle.....	46
<i>Figura 11:</i> Análise histológica H&E grupos tratamento	47
<i>Figura 12:</i> Marcador PCNA grupos controle	48
<i>Figura 13:</i> Marcador PCNA grupos tratamento	49
<i>Figura 14:</i> Gráfico PCNA 1.0	50
<i>Figura 15:</i> Marcador IL-6 grupos controle	51
<i>Figura 16:</i> Marcador IL-6 grupos tratamento	52
<i>Figura 17:</i> Gráfico IL-6 1.0	53
<i>Figura 18:</i> Marcador CD34+ grupos controle e tratamento.....	55
<i>Figura 19:</i> Gráfico CD34+ 1.0	56
<i>Figura 20:</i> Marcador VEGF grupos controle e tratamento	58
<i>Figura 21:</i> Gráfico VEGF 1.0	59
<i>Figura 22:</i> Gráfico Espessura grupos controle e tratamento	61

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1:</i> Composição química (% média) do óleo das sementes de <i>P. edulis</i> , <i>P. alata</i> e <i>P. nítida</i>	31
Tabela 2: Tabela P.A.S.I.	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IMQ –	Imiquimode
OSM –	Óleo de semente de maracujá
H&E –	Hematoxilina-Eosina
PCNA –	Proliferating Cell Nuclear
CD -	Cluster of Differentiation
CD34+ –	Cluster of Differentiation 34
PSORS1-7 –	susceptibilidade a psoríase 1-7
PSORS9 –	susceptibilidade a psoríase 1-9
HLA - Cw6 –	Human leukocyte antigen – Cw6
MHC –	Major Histocompatibility Complex
PV –	Psoríase Vulgar
LT –	Linfócitos T
TNF-alfa -	Fator de necrose tumoral – alfa
ICAM-1 -	Molécula de adesão intercelular-1
IL-1 β -	Interleucina 1 β
IL-1 -	Interleucina 1
IL-2 -	Interleucina 2
IL-6 -	Interleucina 6
IL-8 -	Interleucina 8
IL-10 -	Interleucina 10
IL-17 -	Interleucina 17
IL-22 -	Interleucina 22
IL-23 -	Interleucina 23
IL-33 -	Interleucina 33
CL -	Célula de Langerhans
CLA -	Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen
LFA-1 -	Lymphocyte function-associated antigen 1
C.D. -	Células dendríticas
CD11c+ -	Célula dendrítica 11c+
CDi -	Células dendríticas mielóides do tipo inflamatório
Th1 -	Linfócitos T auxiliares tipo 1
Th 2-	Linfócitos T auxiliares tipo 2

Th17 -	Linfócitos T auxiliares tipo 17
Q -	Queratinócitos
iNOS -	Óxido nítrico
FC -	Fator de Crescimento
PASI -	Índice de Gravidade da Área de Psoríase
PGA -	Avaliação Global de Psoríase
LS-PGA -	Avaliação Global do Médico do Sistema de Estrutura
U.S. FDA -	Food and Drug Administration U.S.
UV -	Luz ultravioleta
EUA –	Estados Unidos da América
TGF β -	Fator de crescimento transformante beta
IFN- γ -	Interferon gama
VDR -	Vitamina D receptor
IL-6R α -	Sinalização trans de IL-6
sIL-6R α -	Forma solúvel de IL-6
IL-6R (CD126) -	subunidade alfa não sinalizadora de IL-6
CD130 -	subunidade beta gp130
JAK1 / JAK2 -	Janus Kinase 1/2
TYK2 -	Tyrosine kinase 2
STAT1 / STAT3 -	Signal transducers and activators of transcription 1/3
SHP2 -	Tyrosine phosphatase 2
MAPK -	Mitogen-activated protein kinase
MCP-1 -	Monocyte chemoattractant protein-1
Treg -	Células T reguladoras
VEGFB -	Vascular endothelial growth factor B
VEGFC -	Vascular endothelial growth factor C
VEGFD -	Vascular endothelial growth factor D
PlGF -	Fator de crescimento placentário
VEGF -	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VEGFR1 - (também chamado Flt1)	Vascular endothelial growth factor receptor 1
VEGFR2 - (também chamado de Flk1 ou KDR)	Vascular endothelial growth factor receptor 2
BMSCs -	Células estromadas da medula óssea
BMMSCs -	Células estaminais mesenquimais da medula óssea

HSCs -	Células estaminais hematopoiéticas
MSC -	Células de estroma mesenquimatosas
DNA -	Ácido desoxirribonucleico
TLR7 -	Toll like receptor 7
TLR8 -	Toll like receptor 8
IFN- α -	Interferon - α

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Psoríase.....	16
1.2 Imunologia.....	23
1.2.1 Interleucina 6 (IL-6)	23
1.2.2 Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)	25
1.2.3 Cluster of Differentiation (CD 34+)	26
1.2.4 Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA)	27
1.3 Modelo experimental de Psoríase por Imiquimode.....	28
1.4 <i>Passiflora edulis</i>	29
1.4.1 Óleo da Semente do Maracujá (<i>Passiflora edulis</i>)	30
1.5 Justificativa	32
2. OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo Geral	33
2.2 Objetivos Específicos	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 Animais e procedimentos	34
3.1.1 Material	34
3.2 Design experimental e aplicação do Imiquimode	35
3.2.1 Delineamento experimental.....	35
3.2.2 Aplicação de Imiquimode	36
3.2.3 Marcação da gravidade da inflamação da pele	36
3.2.4 Eutanásia dos animais	36
3.3 Processamento do material	36
3.4 Quantificação das lesões na epiderme	37
3.5 Análises imuno-histoquímicas.....	38
3.6 Análise estatística	39
4. RESULTADOS	40
4.1 Análise macroscópica, ambiental e mortalidade	40
4.1.1 Animais controle absoluto	41
4.2 Análise de lesões na epiderme.....	43
4.3 Análises imuno-histoquímicas.....	48
5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÕES	66
7. REFERÊNCIAS	78
8. ANEXOS.....	74

1. INTRODUÇÃO

1.1 Psoríase

A psoríase é uma doença de pele inflamatória crônica, que afeta cerca de 2-4% da população mundial. Se desenvolve ao longo do tempo, principalmente no final da adolescência ou início da idade adulta e depende de uma complexa interação entre diferentes fatores genéticos e ambientais (KLEBOW, et al, 2016). Existe uma variação geográfica considerável na prevalência da psoríase; no Reino Unido, verificou-se em cerca de 1,4 - 1,6% da população, sendo menos comum, por exemplo, na China e Japão; na Noruega e no Ártico (5-12%) observa-se uma prevalência maior; intermediária no norte da Europa e moderadamente prevalente na Europa Central (1,5%); menos prevalente na população asiática e entre os índios norte-americanos e ocidentais africanos (0-0,3%) (RAUT, et al, 2013); nos Estados Unidos (EUA), onde o pico se aproxima de 3% da população, a menor prevalência da doença observada entre os negros americanos (0,45-0,7%) em relação ao restante da população dos EUA (1,4 - 4,6%), demonstrando ainda mais a influência de fatores étnicos (JULLIEN; BARKER, 2006; GELFAND, et al 2005); o Brasil não possui dados estatísticos em relação à psoríase, enquadrando-se nos dados mundiais; homens e mulheres são igualmente afetados (BERTH-JONES, 2013). Em relação aos fatores genéticos, estudos populacionais indicam claramente que a incidência de psoríase é maior entre os familiares de primeiro e segundo grau do que entre a população geral (FARBER; NALL, 1974), sendo que entre gêmeos idênticos há uma taxa de concordância de 56 a 70% em diferentes estudos, indicando que ambos fatores, genéticos e ambientais, têm um papel importante no desenvolvimento da doença. Outra evidência para uma base genética vem da forte associação da doença com gene HLA - Cw6. Ambas associações, HLA e um histórico familiar de psoríase, são mais comuns em pacientes que desenvolvem a doença antes dos 40 anos (BERTH-JONES, 2013). Foram identificados 19 loci putativos diferentes para

susceptibilidade genética à doença, localizados em cromossomos diferentes e são designados como PSORS1-7 (susceptibilidade a psoríase 1-7) e PSORS9 (SAGOO, et al, 2004) e a identificação absoluta do gene causador da psoríase neste locus tem sido desafiadora devido ao desequilíbrio de ligação extensa (isto é, genes em um cromossomo são herdados em conjunto e não são facilmente separáveis por eventos de recombinação) observados no MHC (major histocompatibility complex) (NESTLE, et al 2009). Dentre os fatores ambientais, os pacientes com psoríase são mais propensos a fumar e têm uma ingestão de álcool mais elevada do que a população em geral e muitos pacientes afirmam que o estresse provoca erupções na atividade da doença (BERTH-JONES, 2013).

Na epiderme de lesões psoriásicas, os queratinócitos proliferam anormalmente, o que leva à formação de placas escamosas (LOWES et al, 2007) porém, cerca de 70-80% dos pacientes apresentam psoríase leve, que pode ser controlada usando apenas terapias tópicas (BOEHNCKE; SCHÖN, 2015). Foram relatados cinco tipos de psoríase: psoríase em placas (também conhecida como psoríase vulgar); psoríase gutata ou eruptiva, que é caracterizada por manchas em forma de lágrima escamosa; psoríase inversa, também chamada de psoríase intertriginosa ou flexionada, geralmente encontrada nas dobras da pele; psoríase pustulosa, que pode assumir a forma de pustulose palmoplantar (psoríase pustular das palmas e solas), ou psoríase pustular generalizada (uma forma rara e grave de psoríase); e psoríase eritrodérmica, que é uma complicação rara, mas muito grave, da psoríase (BOEHNCKE; SCHÖN, 2015). Os locais mais acometidos são o couro cabeludo, cotovelos, joelhos, umbigo, órgãos genitais e panturrilhas. As placas podem variar em tamanho desde alguns milímetros para uma grande parte do tronco ou membros. É caracterizada pela presença de queratinócitos hiperproliferativos e infiltração massiva de leucócitos (SUN, et al, 2013). A apresentação clínica mais comum da psoríase é a psoríase vulgar (PV), definida por múltiplas placas eritemato-escamosas, caracterizadas histologicamente por (1) acantose da epiderme,

hiperqueratoses e paraqueratose; (2) rede de capilares dilatados na derme papilar; (3) um infiltrado inflamatório misto, incluindo células polimorfonucleares assim como aglomerados intraepidérmicos de neutrófilos (SAGGINI, et al, 2014; BERTH-JONES, 2013). Seu desenvolvimento depende de fatores genéticos predisponentes, estímulos externos e também mudanças no sistema imunológico, com ativação de linfócitos T. Essas células estimulam a liberação de citocinas pró-inflamatórias, especialmente o fator de necrose tumoral - alfa (TNF-alfa) (BRESSAN, et al., 2018) e após a estimulação devido à citocinas inflamatórias, os queratinócitos epidérmicos expressam a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1, CD54) (XIONG, et al, 2015). Uma característica fundamental da psoríase é o aumento dos níveis séricos e expressão de citocinas pró-inflamatórias, especialmente interleucina (IL) -1 β , (NICKOLOFF, et al; 2007), IL-6, (HUNTER; JONES, 2015), IL-17 (KIRKHAM et al, 2014), IL-22, IL-23 (COIMBRA, et al, 2012) e IL-33, (THEOHARIDES, et al, 2010) pela pele, bem como mediadores angiogênicos, incluindo o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) (MALECIC; YOUNG, 2016). Tanto a proliferação epidérmica rápida como infiltração inflamatória dérmica são acompanhadas por uma nova formação de vasos sanguíneos, que se inicia nas primeiras alterações da psoríase e desaparece após a depuração da lesão da pele (NESTLE, et al 2009; SCHON; BOEHNCKE, 2005), no entanto, os desencadeantes para a secreção desses mediadores permanecem indescritíveis (PATEL, et al, 2018). O infiltrado inflamatório cutâneo foi considerado um evento secundário e mais tarde, as células T foram identificadas como importantes intervensores na iniciação e manutenção da psoríase (GOTTLIEB, et al, 1995). O infiltrado de leucócitos na psoríase consiste predominantemente em células T, e sua infiltração parece preceder à hiperplasia epidérmica (COIMBRA, et al, 2012). O trauma mecânico, por exemplo, pode ativar os queratinócitos, visto que passam a liberar citocinas (IL-1 e o TNF- α) e proteínas de choque térmico. Estas substâncias ativam as C.D. (células dendriticas) (CL - célula de Langerhans e C.D. residentes)

na epiderme e derme (SANCHEZ, 2010). A ligação de antígenos de agentes infecciosos aos receptores toll like, nas C.D. e queratinócitos, também pode levar à ativação dessas células. As C.D. e os queratinócitos ativados produzem inúmeras quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento (LOWES, et al 2007) e uma vez ativada, a C.D. processa um antígeno (ambiental ou endógeno, ainda não definido), migrando para o linfonodo regional onde o apresenta aos linfócitos T (LT). Os LT ativados migram para a pele através da ligação de moléculas de adesão expressas na sua membrana plasmática CLA (Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen) e LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen 1) às moléculas de adesão presentes na membrana da célula endotelial cutânea ativada (E-selectina e ICAM-1), aumentando a produção de queratinócitos na epiderme. (NICKOLOFF; NESTLE, 2004)

Figura 1: Principais proteínas produzidas pelas células dendríticas (C.D.) e células dendríticas mielóides do tipo inflamatório (CDi), linfócitos T auxiliares tipo 1 (Th1), linfócitos T auxiliares tipo 17 (Th17) e queratinócitos (Q) na Psoríase. Fatores de crescimento (FC) e Síntese indutora de óxido nítrico (iNOS) envolvidos no desenvolvimento da Psoríase. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/abd/v85n5/v85n05a28.pdf>

A gravidade da psoríase pode ser avaliada por medidas comumente usadas, como o Índice de Gravidade da Área de Psoríase (PASI), a Avaliação Global de Psoríase (PGA) e a Avaliação Global do Médico do Sistema de Estrutura (LS-PGA). As escalas para medir a gravidade da psoríase geralmente são baseadas nos seguintes fatores: a proporção de área de superfície corporal afetada, a atividade da doença (grau de vermelhidão da placa, espessura e escala), resposta a terapias anteriores e o impacto da doença na pessoa. Dependendo do PASI, a psoríase geralmente é classificada como leve (afetando <3% do corpo), moderada (afetando 3-10% do corpo) ou grave (afetando uma porção importante do corpo) (LANGLEY; ELLIS, 2004). Esses parâmetros de classificação de gravidade são particularmente importantes na escolha de uma estratégia de tratamento terapêutico (RAUT, et al, 2013).

A psoríase está repleta de tratamentos que receberam uma breve notoriedade em períodos de tempo específicos ou dentro de certas regiões geográficas, caindo em desuso com o tempo. Consequentemente, o tratamento tópico tem sido considerado a opção mais segura e vem sendo amplamente utilizado para a psoríase leve, seguida de terapias sistêmicas e

fototerapias, que são utilizadas para a psoríase moderada a grave (LEBWOHL, 2005). Dentre os tratamentos tópicos usuais, os emolientes atuam hidratando a camada externa da epiderme permitindo o desprendimento de escamas, no entanto, tem eficácia limitada e, às vezes, pode causar sensibilização (ASHCROFT, et al, 2000); os agentes queratolíticos incluem ácido salicílico, ureia, propilenoglicol e ácidos glicólicos (CLARK, 2000); o ácido salicílico causa o afrouxamento da camada externa da pele, aplicado como creme, em soluções para o couro cabeludo sem receita médica e em xampus, e pode causar irritação ou toxicidade em alta concentração; a ureia demonstrou reduzir a hiperproliferação epidérmica e induzir a diferenciação celular (LEBWOHL, 1999); o ditranol atua aumentando o potencial apoptótico dos queratinócitos psoriáticos (WARGON; PAVER, 1982) e uma pomada de 1 a 10% de antralina pode ser aplicada uma ou duas vezes ao dia (RAUT, et al, 2013). Os corticosteroides foram os primeiros imunomoduladores disponíveis em formulações tópicas e seus efeitos imunossupressores são mediados pela regulação de genes de resposta a corticosteroides; a nível celular, os corticosteroides se ligam aos receptores citoplasmáticos de corticosteroides (ou glicocorticoides) para formar um complexo receptor esteroide, que então se transloca para o núcleo, onde se liga ao elemento de resposta ao glicocorticoide em genes alvo a corticosteroides para estimular ou inibir a transcrição e assim a síntese proteica. Os corticosteroides inibem a transcrição de vários genes de citocinas pró-inflamatórias, incluindo aqueles para interleucina IL-1, IL-2, IL-6, interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (ARZT, et al 2000; PAYNE; ADCOCK, 2001). Outro tratamento tópico, O 1, 25-dihidroxitamina D3 (calcitriol) é a forma hormonalmente ativa da vitamina D que atua no receptor da vitamina D (VDR) nos queratinócitos ligando-se e ativando a transcrição de genes que influenciam o crescimento, a diferenciação e a inflamação nos queratinócitos. O calcitriol também demonstrou ter efeitos imunomoduladores em monócitos, macrófagos, células T e células dendríticas. Acredita-se que, por meio desses mecanismos, a vitamina D trata

ativamente as lesões da pele psoriásica topicamente (NISHII; OKANO, 2001; VERSTUYF, et al, 2005). No tratamento sistêmico, a gama de medicamentos usados está se expandindo rapidamente e a lista dos aprovados pela U.S. FDA (Food and Drug Administration U.S.) incluem metotrexato, retinoides e ciclosporina, entre outros como micofenolato mofetil, hidroxiureia, 6-tioguanina e sulfasalazina (ASHCROFT, et al, 2000; LEBWOHL; ALI, 2001). Em relação à fototerapia, a irradiação com luz ultravioleta (UV) na banda de ondas B tem sido reconhecida por induzir a supressão de respostas imunes selecionadas a antígenos encontrados logo após a exposição (NEILL, et al, 1998). Os comprimentos de onda dentro do espectro de ação para a psoríase que produzem a melhor resposta terapêutica em doses de luz ultravioleta ocorrem entre 310 e 315 nm. (MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004). O Centro de Avaliação e Pesquisa Biológica da FDA define produtos biológicos como aqueles “derivados de material vivo - humano, vegetal, animal ou microrganismo - e usados para o tratamento, prevenção ou cura de doenças em humanos.” Os modificadores da resposta biológica incluem citocinas e linfocinas, como interleucinas, interferons, fatores estimuladores de colônias, fator de necrose tumoral (TNF) e outros agentes biológicos antiproliferativos (WEINSTEIN, et al 2003). Porém, a potencial toxicidade dos órgãos associada à drogas sistêmicas e biológicas cronicamente utilizadas, seus efeitos imunossupressores com o aumento do risco de infecções e malignidades, e os altos custos de alguns deles justificam uma nova avaliação de alvos terapêuticos e modalidades em pacientes com psoríase (ANTIGA, et al, 2015). Estima-se que 80% dos indivíduos nos países em desenvolvimento dependam principalmente de produtos naturais para atender às suas necessidades de saúde, (FLEISCHER, et al, 1996) e a terapia fitoterápica constitui a maior proporção de medicamentos complementares e alternativos usados nos Estados Unidos da América, representando mais de 15 milhões de consumidores (KESSLER, et al, 1998; PAULA, et al, 2013). No que diz respeito à psoríase, 51% dos pacientes usam terapias complementares e de medicina alternativa para tratar sua pele, apesar

de dados científicos limitados ou inexistentes sobre a segurança e a eficácia desses tratamentos (NEWMAN; CRAGG, 2007). Esses aumentos no seu uso exigem que sua segurança e eficácia sejam avaliadas de forma mais ampla, empregando critérios científicos aceitos para esse fim (PAULA, et al, 2013), como análises histológica e imunohistoquímicas complementares.

1.2 Imunologia

1.2.1 IL- 6

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina inflamatória multifuncional produzida por monócitos e queratinócitos após estimulação (NEUNER, et al., 1991). É uma citocina pleiotrópica que ocorre em duas formas diferentes: sinalização clássica e sinalização trans, com a forma solúvel da IL-6R α (sIL-6R α) (KLEBOW, et al., 2016). Exerce sua atividade através da interação com complexo receptor, composto por uma subunidade alfa não sinalizadora IL-6R (CD126) e uma subunidade beta gp130 (CD130), resultando em ativação imediata de cinases associadas ao receptor (JAK1 / JAK2 e TYK2) e subsequente regulação das vias de sinalização STAT1 / STAT3 e SHP2-MAPK (NEURATH; FINOTTO, 2011; JONES, et al., 2011; MIYOSHI, et al., 2011). A subunidade IL-6R funciona *in vivo* como receptor convencional ligado a membrana, expresso na superfície de hepatócitos e certas células inflamatórias, e uma forma solúvel (sIL-6R) que forma complexos IL-6 / sIL-6R ativos (IL -6 trans sinalização) (ATAIE-KACHOIE, et al., 2013; RINCON, 2012). Esta propriedade é exclusiva da IL-6 entre citocinas atualmente conhecidas (NEURATH; FINOTTO, 2011; JONES, et al., 2011).

Além de ser um grande estímulo para a síntese de proteínas de fase aguda, a IL-6 promove a diferenciação das células B em células plasmáticas maduras, bem como a diferenciação de células T e sua ativação (RINCON, 2012). Além disso, a secreção de IL-6

resulta em produção secundária de quimiocinas, como IL-8 e MCP-1, por células mononucleares/macrófagos, bem como a expressão de ICAM-1 e outras moléculas de adesão em células endoteliais, levando a uma maior migração de neutrófilos. (ISHIHARA; HIRANO, 2002).

Figura 2. Diagrama ilustrando as funções da IL-6 na diferenciação de células T e funções efetoras. Enquanto IL-6 favorece a geração de células Th2 e Th17, ela exerce efeitos supressivos marcados na geração de células T reguladoras (Treg). As citocinas efetoras produzidas por cada linhagem de células Th são indicadas. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359610111000050?via%3Dihub>

Dados recentes sugerem que a IL-6 desempenha um papel importante na patogênese da psoríase. No modelo de psoríase induzida por IMQ como doença da pele, a IL-6 é importante para o recrutamento de neutrófilos (FIELDING et al., 2008).

1.2.2 VEGF

O VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular) é uma glicoproteína homodimérica de ligação à heparina que pertence a uma família de fatores de crescimento, que também inclui VEGFB, VEGFC, VEGFD e Fator de crescimento placentário (PlGF) (FERRARA, et al., 2003). Exerce sua ação através da interação com dois receptores de tirosina quinase altamente relacionados, VEGFR1 (também chamado Flt1) e VEGFR2 (também chamado de Flk1 ou KDR), que são predominantemente expressos em células endoteliais, bem como em uma ampla gama de células não endoteliais e em células derivadas de diferentes tipos de tumores, incluindo câncer de pulmão. Além disso, também desempenha um papel importante na modulação da resposta imune (FREZZETTI, et al., 2017). O VEGF coopera com interleucina 10 (IL-10) e prostaglandina E2 para induzir a regulação positiva do Fas ligante em células endoteliais, o que adquire a capacidade de matar as células T efectoras, mas não as células T reguladoras (Treg) e também atua diretamente nas células imunes de forma inibitória, induzindo a proliferação de Tregs e células supressoras derivadas mieloides (MDSCs) (GABRILOVICH, et al., 1996). O VEGF foi inicialmente identificado em células endoteliais como fator de crescimento específico de células endoteliais, essencial para sua diferenciação (vasculogênese), para surgimento de novos capilares derivados de vasos existentes (angiogênese) e permeabilidade vascular (FERRARA, et al., 2003). Experimentos subsequentes mostraram que o VEGF também é expresso em uma variedade de tumores e neoplasias hematológicas. O VEGF não é apenas essencial para a angiogênese fisiológica durante a embriogênese ou crescimento esquelético ou funções reprodutivas femininas, mas também um regulador crítico da angiogênese patológica de tumores, doenças isquêmicas e inflamatórias, distúrbios neovasculares intraoculares e outras condições (FERRARA, et al., 2003). Uma vez que o VEGF se mostrou expresso na epiderme, os pesquisadores voltaram seus interesses para o papel do mesmo em doenças inflamatórias comuns de pele, como a

psoríase, caracterizada por epiderme hiperplástica e hiper-angiogênese. O VEGF foi significativamente aumentado nas lesões cutâneas psoriásicas em comparação com os controles normais (DETMAR, et al., 1998). Além disso, o nível sérico de VEGF foi significativamente aumentado nos pacientes em comparação com os controles e o nível de VEGF foi altamente correlacionado com a gravidade clínica da psoríase (BHUSHAN, et al., 1999). Em contraste com a microvasculatura da pele normal, a microvasculatura psoriática é caracterizada por vasos sanguíneos tortuosos e com vazamento que facilitam a migração de leucócitos para a pele inflamada. (NESTLE, et al., 2009).

1.2.3 CD34+

Numerosos estudos sugeriram que as células da medula óssea estão envolvidas na patogênese da psoríase (ZHANG; LI, 2004; NIU, et al., 2006; YIN, et al., 2006). A diferenciação das células hematopoiéticas é um processo controlado pelo seu microambiente, constituído por células hematopoiéticas e células progenitoras, em contato próximo à uma rede de tecido conjuntivo de células estromadas da medula óssea (BMSCs), das quais as citocinas secretadas regulamentam a proliferação e diferenciação de células estaminais hematopoiéticas. As células estaminais mesenquimais da medula óssea (BMMSCs) são células estaminais hematopoiéticas, que atuam como microambiente para sua proliferação e diferenciação (JIANG, et al., 2002; BONNET, 2003; GROVE, et al., 2004) e tem CD34+ (Cluster of Differentiation 34) como marcador. (LIU, et al., 2015). O CD34+ foi originalmente considerado como um marcador de células estaminais hematopoiéticas (HSCs) e células progenitoras hematopoiéticas (PARK, et al., 2015). No entanto, CD34+ agora também é estabelecido como um marcador de muitos outros tipos de células não-hematopoiéticas, incluindo progenitores endoteliais vasculares e fibroblastos embrionários (VIZIO, et al., 2013). Evidências demonstram a expressão de CD34+ em vários outros tipos

de células, incluindo células de estroma mesenquimatosas (MSC) multipotentes, células dendríticas intersticiais e progenitores epiteliais (BLANPAIN, et al., 2004), mas o papel de células CD34+ fora de cada especialidade permanece limitado (SIDNEY, et al., 2014). No diagnóstico, prognóstico e tratamentos de tumores, o papel do CD34+ tem sido cada vez mais discutido, como no câncer de fígado, câncer de mama, câncer de pâncreas e câncer urotelial (WANG, et al., 2013), e tem sido amplamente utilizado como um marcador para auxiliar na identificação e isolamento de células estaminais hematopoiéticas (HSCs) e progenitores em preparação para o transplante de medula óssea (NAKAYAMA, et al., 2000). Recentemente, tem sido empregado como um marcador para ajudar a identificar outras células estaminais específicas de tecido, incluindo células musculares e precursores epidérmicos (NIELSEN; McNAGNY, 2008). Estudos comparativos anteriores revelaram diferenças significativas nas características biológicas das BMMSCs (ZHANG, et al., 2004; ZHANG, et al., 2010), bem como a resposta imunológica e funções de apresentação de antígenos entre pacientes com psoríase e indivíduos normais (LIU, et al., 2015).

1.2.4 PCNA

O antígeno nuclear proliferativo (PCNA) é um marcador de proliferação celular (YU, et al., 1991), expresso nos núcleos de células durante a fase de síntese de DNA do ciclo celular. É uma proteína nuclear de 36 kD, sintetizada por células em proliferação (CELIS; CELIS, 1985), caracterizando uma molécula homotrimérica em forma de anel que circunda o DNA e atua como uma plataforma de ligação para as polimerases de DNA replicativas, bem como componentes de outras vias envolvidas no reparo do DNA, dinâmica da cromatina e regulação do ciclo celular (KELMAN, 1997). Mesmo na sua forma não modificada, o PCNA interage com dezenas de proteínas (MOLDOVAN, et al., 2007). Pode ser usado para classificação de diferentes neoplasias e lesões benignas com comportamento proliferativo

(WEIGE, et al., 2012), pois está intimamente relacionado com o reparo e proliferação celular, podendo detectar o conteúdo de PCNA nas células (XIA, et al 2014). É um marcador de proliferação específico validado resistente à fixação, portanto, é possível a coloração de tecido em parafina sem restrições (THEILE; MUELLER, 1996). Também conhecido por mostrar expressão aumentada em hiperplasias endometriais e carcinomas (AMALINEI, et al., 2011), o antígeno nuclear de células proliferativas (PCNA) foi indicado como um alvo para a marcação da atividade proliferativa em cortes de tecido (MALMSTROM, et al., 1992). Para avaliação do envolvimento destas moléculas no desenvolvimento da psoríase experimental, foi escolhido indução por Imiquimode (IMQ), um modelo de psoríase comumente utilizado em ratos (HIGASHI, et al., 2018).

1.3 Modelo de indução de psoríase por Imiquimode:

Imiquimode (IMQ), um ligante TLR7/TLR8 e potente ativador imune, é usado para tratamento tópico de verrugas genitais e perianais causadas pelo vírus do papiloma humano (VAN DER FITS, et al., 2009) e tem capacidade *in vivo* de desencadear uma resposta imune local. O efeito agonista do imiquimode no receptor Toll-like faz com que as células dendríticas dérmicas expressem citocinas como o interferon α (IFN- α), o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e as interleucinas IL-1, 6 e 8. Esta resposta imune inata pode levar a eventos adversos como vermelhidão, edema e uma sensação de queimação (WITTE, et al., 2015). O Imiquimode também tem um efeito no sistema imune adaptativo, fazendo com que as células de Langerhans amadureçam e migrem para os gânglios linfáticos (SCHON; SCHON, 2007). As lesões induzidas pelo IMQ mostraram aumento da proliferação epidérmica, diferenciação anormal, acúmulo epidérmico de neutrófilos em micro abscessos, neoangiogênese, infiltração por células T CD4+, células CD11c+ dendríticas e células dendríticas plasmocitóides (HIGASHI, et al., 2018). Em geral, a pele do camundongo começa

a se assemelhar a psoríase humana em três dias a seguir à aplicação Imiquimode (BAI, et al., 2016) e para tratar essas lesões desenvolvidas pelo modelo experimental, tratamentos tópicos de baixo custo e à base de produtos naturais como o óleo extraído da semente do maracujá, vem ganhando notoriedade no campo da pesquisa.

1.4 *Passiflora edulis*

A família *Passifloraceae* é composta por um grande número de gêneros (18 a 23), com mais de 530 a 700 espécies distintas, que são amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais da América do Norte, América do Sul, Ásia e África. O principal gênero, *Passiflora*, é constituído por cerca de 400 espécies conhecidas, das quais cerca de 70 são considerados como tendo frutos comestíveis chamados maracujá (DE SANTANA, et al., 2015). As espécies do gênero *Passiflora* (*Passifloraceae*), amplamente distribuídas em toda a América Latina, estão presentes como drogas oficiais em farmacopeias de vários países. Espécies de *Passiflora* são muito populares, não apenas por causa de seus frutos (maracujá), mas também porque o chá de suas folhas tem sido largamente utilizado em países americanos e europeus (na medicina popular) como um sedativo, diurético, tônico e também no tratamento de hipertensão e doenças de pele (DHAWAN, et al., 2004). Apesar de toda variabilidade, somente duas espécies têm expressão comercial no Brasil, a *Passiflora edulis*, (maracujá-azedo) e *Passiflora alata* (maracujá-doce). O maracujá-azedo é o mais conhecido, cultivado e comercializado devido à qualidade de seus frutos e ao seu maior rendimento industrial (FALEIRO, et al., 2005). A maior importância econômica do maracujá está na forma de concentrados de sumo (FERRARI, et al., 2004); no entanto, para a industrialização, a casca e as sementes do maracujá são normalmente descartados, representando mais de 60% do fruto e são quase sempre tratados como resíduos orgânicos (SILVA, et al., 2015).

1.4.1 Óleo da semente do maracujá (*Passiflora edulis*)

As sementes de maracujá contêm grandes quantidades de óleo e fibras e geralmente são removidos após serem prensados (SILVA, et al., 2015). Esses resíduos implicam custos operacionais para a indústria e podem se tornar um problema ambiental (SILVA, et al., 2015), assim, a extração de óleo de sementes de maracujá pode agregar valor a este resíduo agroindustrial (MALACRIDA; JORGE, 2012). O óleo de semente de maracujá (OSM) tem sabor agradável e odor suave e compara-se com o óleo de semente de algodão em valor nutricional e digestibilidade (FERRARI, et al., 2004). Tem características físico-químicas semelhantes a alguns óleos comestíveis comuns, podendo ser uma nova fonte para o consumo humano (KOBORI; JORGE, 2005). Além disso, os óleos vegetais contêm substâncias com propriedades antioxidantes, que previnem a deterioração oxidativa dos próprios lipídios e atuam como um benefício para a saúde, prevenindo doenças relacionadas ao envelhecimento, como câncer e doenças cardíacas (MALACRIDA; JORGE, 2012). O óleo de semente de maracujá amarelo (*Passiflora edulis*) particularmente, tem sido utilizado na indústria de cosméticos como matéria-prima para produzir cremes hidratantes para aumentar a suavidade da pele e o resíduo resultante da extração de óleo é utilizado em produtos esfoliantes (DE SANTANA, et al., 2015). O óleo da semente do maracujá contém uma grande quantidade de ácidos graxos insaturados, tais como ácido oleico (C18 : 1) e ácido linoleico (C18 : 2) (LIU, et al, 2008), além de compostos bioativos, tais como tocoferóis, fitosteróis, carotenóides e compostos fenólicos (DE SANTANA, et al., 2015).

Tabela 1: Composição química (% média) do óleo das sementes de *P. edulis*, *P. alata* e *P. nítida*.

ÁCIDOS GRAXOS	Estrutura	<i>Passiflora edulis</i>	<i>Passiflora alata</i>	<i>Passiflora nítida</i>
SATURADOS				
ácido mirístico	(C14:0)	0,07	0,48	0,26
ácido palmítico	(C16:0)	15,30	18,75	28,97
ácido esteárico	(C18:0)	1,98	1,66	4,20
MONOINSATURADOS				
ácido palmitoleico	(C16:1)	0,09	1,69	0,51
ácido oléico	(C18:1)	14,54	15,02	28,35
POLIINSATURADOS				
ácido linoléico	(C18:2)	67,99	63,16	35,53
ácido linolênico	(C18:3)	tr	tr	nd

nd = não detectado ; tr = porcentagem $\geq 0,05$

Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452004000100027

1.5 JUSTIFICATIVA

A psoríase atualmente possui tratamentos sistêmicos e biológicos eficazes, porém de custo elevado e apresentam efeitos colaterais na maioria da população. Em relação aos tratamentos tópicos disponíveis, há uma necessidade de explorar mais recursos de baixo custo, visando tratamentos tópicos eficazes, com menores efeitos colaterais (característica de tratamentos sistêmicos e biológicos) e maior acessibilidade ao tratamento para os pacientes. As lesões foram desenvolvidas pelo modelo experimental de indução à psoríase por Imiquimode e o efeito antiinflamatório do óleo da semente do maracujá foi avaliado por análise histológica e imunológica por marcadores IL-6, PCNA, CD34+ e VEGF.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do óleo da semente do maracujá (*Passiflora edulis*) no tratamento da psoríase, devido suas características anti-inflamatórias, em modelo experimental, utilizando a análise histológica e imunológica das lesões da epiderme do animal desenvolvidos pelo uso da pomada de imiquimode.

2.2 Objetivos Específicos

Analisar através de coloração H&E (Hematoxilina e Eosina) formação de lesões características da psoríase através da presença de hiperplasia seguida de acantose na epiderme e paraceratose nas células da superfície da epiderme após indução de psoríase por Imiquimode; Observar a redução da proliferação celular através da imuno-histoquímica com marcador PCNA após tratamento com o óleo; avaliar através da marcação de VEGF a redução de angiogênese na região de indução da psoríase após tratamento; avaliar o potencial da IL- 6 na modulação da formação de lesões características da psoríase, através de modelo experimental com camundongos submetidos à Imiquimode e a eficácia do tratamento proposto com a redução da marcação desta citocina, caracterizando o efeito anti-inflamatório do óleo; analisar a proliferação de células hematopoiéticas com o marcador CD34+ para confirmar seu envolvimento na psoríase e sua redução nos animais tratados com o óleo para confirmar sua eficácia.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e procedimentos

Foram utilizados 36 camundongos da linhagem Balb/c, machos, de aproximadamente 25g. Os animais foram provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), e mantidos no Biotério do Departamento de Patologia da FMRP-SP. Todos os procedimentos realizados no biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, onde ficaram em gaiolas com número máximo de seis animais cada, mantidos em condições de temperatura constante $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, ciclo noite-dia 12:12-horas, e umidade relativa do ar de 60-70%. Os animais foram alimentados com ração padrão para roedores e água *ad libitum*, que assim como a maravalha das caixas dos animais, eram autoclavadas e armazenadas no próprio biotério. Todos os animais passaram por um período de aclimação de 2 semanas, ou até que atingissem um peso médio adequado, prévio ao início dos experimentos.

3.1.1 Material

- Pomada Imiquimode 50mg/g (Aldara; BAYER; Brasil);
- Óleo de semente de maracujá (*passiflora edulis*), *in natura*, prensado a frio, 100%;
- Creme LECIGEL® 2%; (Composição da Formulação – ANEXO II)
- Formulação creme de óleo de semente de maracujá 20% + LECIGEL® 2%,
(Composição da Formulação – ANEXO III).

3.2 Delineamentos experimental e aplicação da pomada Imiquimode

3.2.1 Delineamento Experimental

Após período de adaptação de uma semana, os animais foram aleatoriamente divididos em oito grupos G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7 e G8. Foram colocados em gaiolas individuais, sendo três animais (6 orelhas, n=6) por grupo do G1 ao G4, seis animais no grupo G5 ao G8 (12 orelhas, n=12). No primeiro grupo G1 não houve aplicação, caracterizando o grupo com Controle Absoluto; G2 recebeu óleo de semente de maracujá (OSM) *in natura* (100%) controle; grupo G3 recebeu LECIGEL® (LE) controle; G4 recebeu óleo de semente de maracujá associado ao LECIGEL® (OSM + LE) controle por 15 dias consecutivos.

Do quarto grupo G5 ao G8, todos os animais receberam Imiquimode (IMQ) nas duas orelhas por dez dias consecutivos, e após este período, G5 não recebeu tratamento, caracterizando grupo IMQ controle; G6 foi tratado com óleo de semente de maracujá *in natura* (100%), o grupo G7 recebeu tratamento de LECIGEL® e o grupo G8 recebeu por tratamento o óleo de semente de maracujá + LECIGEL®.

Figura 3: Delineamento experimental do dia 1 ao dia 25, com especificação de tratamento por grupo.

	Dia 1	Dia 10	Dia 25 (eutanásia)
G1	Controle absoluto -----	Ø -----	X
G2	OSM controle -----		X
G3	LE controle -----		X
G4	OSM + LE controle -----		X
G5	IMQ -----	Ø -----	X
G6	IMQ -----	OSM -----	X
G7	IMQ -----	LE -----	X
G8	IMQ -----	OSM + LE -----	X

3.2.2 Aplicação da pomada imiquimode

Os camundongos receberam a pomada Imiquimode tópica na epiderme (parte interna da orelha) por 10 dias consecutivos. A pomada Imiquimode foi escolhida por ter ação direta, uma vez que pode ser aplicado diretamente na epiderme do animal. Em geral, a pele do camundongo começa a se assemelhar a psoríase humana em três dias a seguir à aplicação Imiquimode (KLEBOW, et al., 2016).

3.2.3 Marcação da gravidade da inflamação da pele

Para marcar a gravidade da inflamação da pele da orelha, um sistema de pontuação objetivo foi desenvolvido com base na área clínica Psoríase e Índice de Severidade (PASI). Eritema, descamação, e espessamento foram marcados independentemente de 0 a 4 como se segue: 0 nenhum; 1 ligeira; 2 moderado; 3 marcado; 4 muito marcada. O nível de eritema foi marcado usando uma tabela de pontuação com as impurezas vermelhas. A pontuação cumulativa (eritema além de escalonamento mais espessamento) serviu para indicar a gravidade da inflamação no modelo experimental (SUN, et al., 2013).

3.2.4 Eutanásia dos Animais

Todos os animais foram submetidos à eutanásia com 25 dias após o início do tratamento, período suficiente para o aparecimento de lesões inflamatórias, tão como escamas, nos animais tratados com Imiquimode (BAI, et al., 2016).

3.3 Processamento do material

Os segmentos destinados às análises histológicas e imuno-histoquímicas foram cuidadosamente estendidos e colocados entre papéis de filtro dentro de cassetes previamente identificados, que foram imediatamente imersos em formalina 10% para fixação, por um

período de 24 a 48 horas. Após fixação, o material foi submetido a etapas de desidratação, pela submersão em álcoois de concentrações crescentes (80%, 95% e 100% (I, II e III)), por um período total de aproximadamente 3 horas e 45 minutos. Para o processo de clarificação ou diafanização das amostras, o material foi submerso em banhos subsequentes de xilol (100%) por aproximadamente 40 minutos. Posteriormente, foi feita a infiltração em parafina, com dois banhos subsequentes de 2 horas cada a uma temperatura de 60°C, para a remoção total do xilol. Para a inclusão em blocos de parafina, cada amostra foi clivada em fragmentos, para a obtenção de cortes transversais. Para confecção das lâminas, foram obtidos cortes em micrótomo rotativo com espessura de 4 µm (micrometro) coletados em lâminas de polyisina e levados à estufa aquecida a 60°C para adesão. As lâminas passaram por etapas de desparafinização e hidratação previamente a coloração ou imunohistoquímica. A recuperação antigênica foi feita por método físico-químico por aquecimento em solução tampão citrato pH 6,0.

3.4 Quantificação de lesões na epiderme

Cortes transversais apresentando a superfície da epiderme das orelhas foram usados para a determinação da presença de características histológicas semelhantes à psoríase humana. As lâminas foram coradas pelo método de Hematoxilina-Eosina (H&E) através de banho de imersão em Hematoxilina de Harris por 3 minutos e contra coradas com a solução de Eosina Floxina alcoólica por 30 segundos. A análise histológica dos cortes foi feita em microscópio óptico usando objetiva de 400x, a fim de identificação e qualificação das alterações histológicas. Dentro das características avaliadas nas epidermes consideradas displásicas, observou-se principalmente acantose da epiderme, hiperqueratoses e paraqueratose; rede de capilares dilatados na derme papilar; um infiltrado inflamatório misto, incluindo células polimorfonucleares assim como coleções intraepidérmicas de neutrófilos.

3.5 Análises imuno-histoquímicas

As lâminas foram incubadas por 12 horas (*overnight*) em câmara úmida com anticorpo primário para PCNA (Novocastra[®], clone PC10) na diluição de 1:200, VEGF (Santa Cruz Biotechnology[®], clone A-20) na diluição de 1:100, CD34 (Novocastra[®], clone QBEnd/10) na diluição de 1:100 e IL-6 (Santa Cruz Biotechnology[®], clone M-19) na diluição de 1:100. Em seguida o sistema de amplificação utilizado foi o Kit PicTureTM MAX Polymer (ZYMED[®] 24 Laboratories). Após lavagem, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário biotinilado por 30 minutos, e após nova lavagem, com polímero conjugado também por 30 minutos. Em seguida, as lâminas receberam solução reagente contendo DAB (3,3'-diaminobenzidina), por cerca de 1 a 3 minutos, este é reduzido pela reação formando um precipitado marrom, visualizado ao microscópio; todos os reagentes são disponibilizados com PicTureTM Max Polymer Detection Kit (Invitrogen). As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris diluída por cerca de 1 minuto. Novamente foram desidratadas, pela submersão em álcoois a concentrações crescentes, e clarificadas, pela passagem em xilol. Finalmente, montadas e seladas com Entelan.

Para as quantificações de células marcadas positivamente para PCNA, VEGF, IL-6 e CD34+, os valores relativos ou índice de marcação foram determinados pela relação entre o número total de células e o número de células fortemente marcadas na área de lesão da epiderme, estas apresentando precipitado citoplasmático marrom. O índice de marcação foi determinado pela relação entre o número total de células e o número total de células marcadas da epiderme, que apresentassem precipitado nuclear marrom. A contagem foi feita manualmente com uso de microscópio óptico em objetiva de aumento de 400x, e considerou-se toda a extensão de cada corte.

3.6 Análise estatística

Os resultados foram submetidos a uma análise estatística descritiva utilizando-se o software Graph Pad Prism 5.0 (San Diego, Califórnia). A variabilidade dos dados foi avaliada pelo teste ANOVA, teste não paramétrico utilizado na comparação de três ou mais amostras independentes. Adotou-se um nível de significância de 0,05; média é dada $\pm$ desvio padrão. Tendo a hipótese nula rejeitada ($p < 0,05$), apontando diferença entre pelo menos dois grupos, foi aplicado o pós-teste de Tukey ($p < 0,001$).

4. RESULTADOS

4.1 Análise macroscópica, ambiental e mortalidade

Durante o experimento, foi possível observar alterações macroscópicas nas lesões formadas por Imiquimode na epiderme das orelhas dos animais; foi notado um comportamento normal/dócil dos animais devido a mínima mobilização necessária para aplicação do IMQ (cauda), não gerando nenhum tipo de estresse ao animal. Após aplicação do tratamento proposto, foi possível observar macroscopicamente a regressão das lesões causadas por IMQ na epiderme das orelhas dos animais, classificando o tratamento tópico como padrão ouro para lesões em epiderme. Não foi observada alteração de peso significativo durante o experimento. Não houve perda de animais.

4.1.1 Animais controle absoluto

Os animais do grupo **G1** Controle Absoluto não receberam nenhum tipo de aplicação durante o experimento.

Na **Figura 4 (G2)** os três animais (6 orelhas, n=6) receberam óleo de semente de maracujá na orelha esquerda, enquanto a orelha direita foi preservada sem nenhuma aplicação para obter um grupo controle; não foi observado alteração significativa de inflamação (vermelhidão) ou descamação.

Figura 4: Destaque da orelha esquerda com óleo de semente de maracujá

Na **Figura 5 (G3)** os três animais (6 orelhas, n=6) receberam LECIGEL® na orelha esquerda, enquanto a orelha direita foi preservada sem nenhuma aplicação para obter um grupo controle; não foi observado alteração significativa de inflamação (vermelhidão) ou descamação.

Figura 5: Destaque da orelha esquerda com LECIGEL®

Na **Figura 6 (G4)** os três animais (6 orelhas, n=6) receberam óleo de semente de maracujá + LECIGEL® na orelha esquerda, enquanto a orelha direita foi preservada sem nenhuma aplicação para obter um grupo controle; não foi observada alteração significativa de inflamação (vermelhidão) ou descamação (os animais deste grupo foram marcados com 3 traços na cauda).

Figura 6: Destaque da orelha esquerda com óleo de semente de maracujá associado ao LECIGEL®

4.1.2 Animais imiquimode + tratamento

Todos os animais do G5 ao G8, receberam Imiquimode nas duas orelhas por 10 dias consecutivos, com intuito de desenvolver sintomas semelhantes ao da psoríase, e após este período, os grupos receberam o seguinte tratamento:

Na **Figura 7 G5/G6 (IMQ 1/ 2)**, os seis animais deste grupo (12 orelhas, n=12) receberam tratamento na orelha esquerda com óleo de semente de maracujá 100% **G6 (IMQ 2)**, enquanto as orelhas direitas foram preservadas para obter um grupo controle de Imiquimode **G5 (IMQ 1)**; foi observado uma melhora do quadro de inflamação da orelha esquerda tratada comparado à orelha direita que apenas recebeu imiquimode.

Figura 7: **A** - Destaque da orelha esquerda tratada com óleo de semente de maracujá 100% **G6**; nota-se uma melhora no quadro de inflamação (vermelhidão). **B** : Destaque da orelha direita que apenas recebeu Imiquimode **G5**, sem tratamento; nota-se a permanência do quadro inflamatório (vermelhidão).

Na **Figura 8 G5/G7 (IMQ 1/3)**, os seis animais deste grupo (12 orelhas, n=12) receberam tratamento na orelha esquerda com LECIGEL® **G7(IMQ 3)**, enquanto as orelhas direitas foram preservadas para obter um grupo controle de Imiquimode **G5 (IMQ 1)**;

Figura 8: **A-** Destaque da orelha esquerda tratada com LECIGEL® **G7**; nota-se uma pequena melhora no quadro de inflamação (vermelhidão). **B** - Destaque da orelha direita que apenas recebeu Imiquimode **G5**, sem tratamento; nota-se a permanência do quadro inflamatório (vermelhidão).

Na **Figura 9 G8 (IMQ 4)**, os seis animais deste grupo (12 orelhas, n=12) receberam tratamento com óleo de semente de maracujá + LECIGEL® nas duas orelhas;

Figura 9: **A-** Destaque da orelha esquerda tratada com óleo de semente de maracujá associado ao LECIGEL®; nota-se uma melhora significativa no quadro de inflamação (vermelhidão). **B** - Destaque da orelha direita tratada com óleo de semente de maracujá associado ao LECIGEL®; nota-se uma melhora significativa no quadro de inflamação (vermelhidão).

4.2 Análise de lesões na epiderme

A morfologia da epiderme dos animais sem aplicação de Imiquimode, bem como as alterações morfológicas desenvolvidas na epiderme do animal com Imiquimode e a morfologia da epiderme da orelha dos animais após a indução da psoríase foi avaliada após 2 semanas de tratamento com coloração Hematoxilina e Eosina.

A figura 10 destaca a epiderme sem tratamento **A**, nenhuma alteração significativa após aplicação de óleo de semente de maracujá sem IMQ **B**, nenhuma alteração após aplicação de LECIGEL® sem IMQ **C**, e nenhuma alteração na associação do óleo do maracujá mais LECIGEL® sem IMQ **D**.

Figura 10: Análise histológica Hematoxilina e Eosina (400x, H&E) da epiderme da orelha do animal sem nenhuma aplicação **A**, epiderme com óleo de semente de maracujá sem alteração morfológica **B**, epiderme com LECIGEL® sem alteração morfológica **C**, epiderme com associação de óleo de semente de maracujá mais LECIGEL® sem alteração morfológica **D**.

A **Figura 11** destaca a epiderme com aplicação de IMQ sem tratamento **A**, epiderme tratada com óleo de semente de maracujá puro após aplicação de IMQ **B**, epiderme tratada com LECIGEL® após aplicação de IMQ **C**, epiderme tratada com associação de óleo de semente de maracujá mais LECIGEL® após aplicação de IMQ **D**.

Figura 11: Coloração Hematoxilina e Eosina (400x, H&E) destacando hiperplasia seguida de acantose (*) na epiderme, paraceratose nas células da superfície da epiderme (#) após 10 dias de aplicação de Imiquimode **A**; ausência de hiperplasia, presença de corpos apoptóticos na região da derme, paraceratose moderada nas células de superfície da epiderme após tratamento com óleo de semente de maracujá **B**; ausência de hiperplasia, presença de paraceratose nas células da superfície da epiderme após tratamento com LECIGEL® **C**; ausência de hiperplasia, ausência de paraceratose nas células da superfície da epiderme e presença de corpos apoptóticos na região da derme após tratamento com associação de óleo de semente de maracujá mais LECIGEL® **D**.

4.3 Análises imuno-histoquímicas

A **Figura 12** destaca Imunomarcacão de PCNA (Antígeno Nuclear da Proliferação Celular) demonstrando proliferação celular de padrões semelhantes em orelha sem tratamento **A**; orelha com óleo de semente de maracujá **B**; orelha com LECIGEL® **C**; orelha com associação de LECIGEL® mais óleo de semente de maracujá **D**.

Figura 12: Imunoistoquímica para Antígeno Nuclear da Proliferação Celular (400x, PCNA) demonstrando proliferação celular padrão semelhante em orelha sem tratamento **A**; orelha com óleo de semente de maracujá **B**; orelha com LECIGEL® **C**; orelha com associação de LECIGEL® mais óleo de semente de maracujá **D**.

A **Figura 13** destaca Imunomarcacão por PCNA (Antígeno Nuclear da Proliferação Celular) demonstrando uma proliferação celular exacerbada na epiderme da orelha que recebeu imiquimode por 10 dias **A**; considerável diminuição da Imunomarcacão celular devido o tratamento com óleo de semente de maracujá **B**; leve diminuição de Imunomarcacão celular devido tratamento com LECIGEL® **C**; expressiva diminuição na Imunomarcacão celular devido tratamento com óleo de semente de maracujá mais LECIGEL® **D**.

- **Figura 13:** Imunoistoquimica para Antígeno Nuclear da Proliferação Celular (400x, PCNA) demonstrando uma proliferação celular exacerbada na epiderme da orelha que recebeu imiquimode por 10 dias **A**; considerável diminuição da proliferação celular devido o tratamento com óleo de semente de maracujá **B**; leve diminuição de proliferação celular devido tratamento com LECIGEL® **C**; expressiva diminuição na proliferação celular devido tratamento com óleo de semente de maracujá mais LECIGEL® **D**.

Figura 14: Expressão imunoistoquímica de PCNA (Antígeno Nuclear da Proliferação Celular) em epiderme: Porcentagem de células positivas marcadas. Análise por one-way ANOVA e pós teste Tukey. Podemos observar aumento estatístico na expressão de PCNA nos grupos IMQG1 e IMQG3 em comparação aos grupos controles ($P<0,0001$) e aos demais G2 e G4.

A **Figura 15** destaca Imunomarcacão de IL- 6 (Interleucina 6) demonstrando ausência de infiltrado inflamatório de padrões semelhantes em orelha sem tratamento **A**; orelha com óleo de semente de maracujá **B**; orelha com LECIGEL® **C**; orelha com associação de LECIGEL® mais óleo de semente de maracujá **D**.

Figura 15: Imunoistoquímica para Interleucina 6 (400x, IL-6) demonstrando ausência de infiltrado inflamatório padrão semelhante em orelha sem tratamento **A**; orelha com óleo de semente de maracujá **B**; orelha com LECIGEL® **C**; orelha com associação de LECIGEL® mais óleo de semente de maracujá **D**

A **Figura 16** destaca Imunomarcação por IL-6 (Interleucina 6) demonstrando presença de infiltrado inflamatório na epiderme da orelha que recebeu imiquimode por 10 dias **A**; considerável diminuição da Imunomarcação celular devido o tratamento com óleo de semente de maracujá **B**; leve diminuição de Imunomarcação celular devido tratamento com LECIGEL **C**; expressiva diminuição na Imunomarcação celular devido tratamento com óleo de semente de maracujá mais LECIGEL **D**.

Figura 16: Imunoistoquímica para Interleucina 6 (400x, IL-6) demonstrando presença de infiltrado inflamatório (*) na epiderme da orelha que recebeu imiquimode por 10 dias **A**; considerável diminuição da proliferação celular devido o tratamento com óleo de semente de maracujá **B**; leve diminuição de proliferação celular devido tratamento com LECIGEL **C**; expressiva diminuição na proliferação celular inflamatória devido tratamento com óleo de semente de maracujá mais LECIGEL **D**.

Figura 17: Expressão imunoistoquímica de Interleucina 6 (IL-6) em epiderme: Porcentagem de células positivas marcadas. Análise por one-way ANOVA e pós teste Tukey. Podemos observar aumento estatístico na expressão de IL-6 nos grupos IMQG1 e IMQG3 em comparação aos grupos controles ($P<0,0001$) e aos G2 e G4.

A **Figura 18** destaca Imunomarcção por CD34+ (Cluster of Differentiation 34+) não aparente na primeira imagem, caracterizando a ausência de células hematopoiéticas mielóides, linfóides ou endoteliais vasculares na figura **A** (representando os 4 grupos controle, devido a marcação semelhante em todos); considerável presença da Imunomarcção celular devido presença de células hematopoiéticas após indução da psoríase por imiquimode sem tratamento **B**; leve diminuição de Imunomarcção celular devido tratamento com LECIGEL® **C**; diminuição na Imunomarcção celular devido tratamento com óleo de semente de maracujá **D**; expressiva diminuição da Imunomarcção celular devido tratamento da associação de LECIGEL® mais óleo de semente de maracujá **E**.

Figura 18 : Imunomarcção celular por Cluster of Differentiation 34+ (400x, CD34+) caracterizando a ausência de células hematopoiéticas mielóides, linfóides e endoteliais vasculares **A**, presença dessas células na epiderme com aplicação de IMQ **B**, baixa redução de marcação CD34+ em tratamento com LECIGEL **C**, redução na imunomarcção devido ao óleo puro **D**; e ausência de marcação devido tratamento com associação **E**.

Figura 19: Expressão imunoistoquímica de CD34+ (Cluster of Differentiation 34+) em epiderme: Porcentagem de células positivas marcadas. Análise por one-way ANOVA. Podemos observar aumento estatístico na expressão de CD34+ nos grupos IMQG1 e IMQG3 ($P < 0,0001$) e aos demais grupos.

A **Figura 20** destaca Imunomarcção por VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular) não aparente na primeira imagem, caracterizando a ausência de angiogênese **A** (representando os 4 grupos controle, devido a marcação semelhante em todos); considerável presença da Imunomarcção celular devido presença de angiogênese após indução da psoríase por imiquimode sem tratamento **B**; leve diminuição de Imunomarcção celular devido tratamento com LECIGEL® **C**; diminuição na Imunomarcção celular devido tratamento com óleo de semente de maracujá **D**; expressiva diminuição da Imunomarcção celular devido tratamento da associação de LECIGEL® mais óleo de semente de maracujá **E**.

Figura 20: Imunomarcacão por Fator de Crescimento Endotelial Vascular (400x, VEGF) mostrando ausencia de marcação (angiogênese) nos grupos controle **A**; intensa marcação no grupo IMQ sem tratamento **B**; intensa marcação no tratamento com LECIGEL **C**; moderada redução na marcação no grupo tratado com óleo puro **D**; redução da marcação no grupo tratado com associação **E**.

Figura 21: Expressão imunoistoquímica de VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular) em epiderme: Porcentagem de células positivas marcadas. Análise por one-way ANOVA. Podemos observar aumento estatístico na expressão de VEGF nos grupos IMQG1 e IMQG3 em comparação aos demais grupos ($P < 0,0001$).

- Tabela PASI:

Para marcar a gravidade da inflamação da pele da orelha, um sistema de pontuação objetivo foi desenvolvido com base na área clínica Psoríase e Índice de Severidade (PASI). Eritema, descamação, e espessamento* foram marcados independentemente de 0 a 4 como se segue: 0 nenhum; 1 ligeira; 2 moderado; 3 marcado; 4 muito marcada.

Tabela 2: Do **G1** ao **G4** não foram observadas nenhuma das características selecionadas pela tabela; **G5** apresentou pontuação 4 em todas as avaliações, caracterizando a máxima expressão de sintomas semelhantes à psoríase; **G6** apresentou pontuação 3 em todas as avaliações, caracterizando um tratamento de qualidade aos sintomas da psoríase; **G7** apresentou 3 pontos em todas as avaliações, caracterizando um tratamento mediano inferior aos sintomas da psoríase quando analisados as espessuras respectivas; **G8** apresentou 2 ponto em todas as avaliações, caracterizando um tratamento muito eficaz aos sintomas da psoríase.

Colunas1 ▼	ERITREMA ▼	ESCAMÇÃO ▼	ESPESSURA ▼
G1	0	0	± 7,8
G2	0	0	± 8,05
G3	0	0	± 8,9
G4	0	0	± 7,3
G5	4	4	± 39,4
G6	3	3	± 17,6
G7	3	3	± 24,5
G8	2	2	± 10,8

*Devido a possibilidade instrumental de medição precisa da espessura, foi adotada uma média dos valores dos animais de cada cada grupo, e expostos na tabela em forma de numeral ordinal.

Figura 22: Espessura da orelha dos grupos controle e tratamento: Espessura das orelhas dos animais antes aplicação de IMQ (grupos controle) e após tratamento sobre psoríase induzida por IMQ. Análise por one-way ANOVA. Podemos observar aumento estatístico na espessura das orelhas dos animais nos grupos IMQG1 e IMQG3 em comparação aos grupos controles ($P<0,0001$) e aos demais.

5. DISCUSSÃO

O óleo de semente de maracujá apresentou um efeito anti-inflamatório nas lesões epidérmicas da psoríase induzidas por Imiquimode. Tanto camundongos tratados com óleo de semente de maracujá puro quanto associado ao LECIGEL®, mostraram aumento de corpos apoptóticos visíveis em coloração H&E, comparado aos animais controle que receberam o óleo e a associação sem aplicação de IMQ. Nos animais tratados com óleo e associação foi possível visualizar um adelgaçamento na epiderme, reforçando a hipótese de que uma das vias de controle/resposta do organismo à psoríase se dá através da inibição da apoptose (psoríase) ou estímulo da mesma (tratamento). A coloração H&E ainda permitiu visualizar reversão no quadro de paraceratose nestes animais. Os animais que somente receberam Imiquimode, foram vistos pela coloração H&E, que tiveram sua epiderme espessada, hiperplasia seguida de acantose na epiderme e paraceratose na camada superficial da epiderme devido um processo anormal de maturação dessas células, caracterizando quadro típico de psoríase. Os animais tratados apenas com LECIGEL® ainda apresentaram moderada acantose na epiderme, paraceratose na camada superficial da epiderme e parcial ausência de corpos apoptóticos, indicando uma baixa eficácia deste tipo de tratamento.

Nas imunomarcações realizadas com VEGF, as amostras dos animais do grupo controle tiveram ausência de marcações semelhantes; tanto os animais do grupo controle absoluto G1, quanto os animais do grupo controle G2 que tiveram somente óleo de maracujá aplicados, quanto os animais do grupo controle G3 que tiveram LECIGEL® aplicado, quanto os animais do grupo controle G4 que tiveram associação de OSM + LECIGEL® não apresentaram marcações significativas. Já nas amostras dos animais que tiveram aplicação de IMQ por 10 dias consecutivos, todos os grupos apresentaram marcação positiva para VEGF, tendo o grupo IMQ G1 a marcação mais expressiva por tratar dos animais que apenas receberam IMQ sem nenhum tipo de tratamento; as amostras respectivas aos animais do

grupo IMQ G2 que foram tratados com OSM puro tiveram sua marcação reduzida em comparação ao animais do grupo IMQ G1, mostrando eficácia no tratamento proposto para o objeto de estudo; as amostras do grupo IMQ G3 que foram tratados com LECIGEL® tiveram sua marcação pouco reduzida em relação ao grupo IMQ G1, indicando baixa eficácia do tratamento proposto; já as amostras do grupo IMQ G4 tiveram sua marcação expressivamente reduzida em comparação ao grupo IMQ G1, sinalizando a alta eficácia do tratamento proposto. As marcações normais de cada grupo controle respectivo ao grupo de tratamento corroboram os dados apresentados em relação a imunomarcação por VEGF.

Nas imunomarcações realizadas com PCNA, as amostras dos animais do grupo controle tiveram marcações normais semelhantes; tanto os animais do grupo controle absoluto G1, quanto os animais do grupo controle G2 que tivera somente óleo de maracujá aplicados, quanto os animais do grupo controle G3 que tiveram LECIGEL® aplicado, quanto os animais do grupo controle G4 que tiveram associação de OSM + LECIGEL® apresentaram marcações normais. Já nas amostras do animais que tiveram aplicação de IMQ por 10 dias consecutivos, todos os grupos apresentaram marcação aumentada para PCNA, tendo o grupo IMQ G1 a marcação mais expressiva por tratar dos animais que apenas receberam IMQ sem nenhum tipo de tratamento; as amostras respectivas aos animais do grupo IMQ G2 que foram tratados com OSM puro tiveram sua marcação reduzida em comparação ao animais do grupo IMQ G1, mostrando eficácia no tratamento proposto; as amostras do grupo IMQ G3 que foram tratados com LECIGEL® tiveram sua marcação pouco reduzida em relação ao grupo IMQ G1, indicando baixa eficácia do tratamento; já as amostras do grupo IMQ G4 teve sua marcação expressivamente reduzida em comparação ao grupo IMQ G1, sinalizando a alta eficácia do tratamento. As marcações normais de cada grupo controle respectivo ao grupo de tratamento corroboram os dados apresentados em relação a imunomarcação por PCNA.

Nas imunomarcações realizadas com IL-6, as amostras dos animais do grupo controle mostraram ausência de marcações semelhantes; tanto os animais do grupo controle absoluto G1, quanto os animais do grupo controle G2 que tivera somente óleo de maracujá aplicados, quanto os animais do grupo controle G3 que tiveram LECIGEL® aplicado, quanto os animais do grupo controle G4 que tiveram associação de OSM + LECIGEL® não apresentaram marcações significativas. Já nas amostras dos animais que tiveram aplicação de IMQ por 10 dias consecutivos, todos os grupos apresentaram marcação positiva para IL-6, tendo o grupo IMQ G1 a marcação mais expressiva por tratar dos animais que apenas receberam IMQ sem nenhum tipo de tratamento; as amostras respectivas aos animais do grupo IMQ G2 que foram tratados com OSM puro tiveram sua marcação reduzida em comparação aos animais do grupo IMQ G1, mostrando eficácia no tratamento; as amostras do grupo IMQ G3 que foram tratados com LECIGEL® tiveram sua marcação pouco reduzida em relação ao grupo IMQ G1, indicando baixa eficácia do tratamento; já as amostras do grupo IMQ G4 teve sua marcação expressivamente reduzida em comparação ao grupo IMQ G1, sinalizando a alta eficácia do tratamento. As ausências de marcações de cada grupo controle respectivo ao grupo de tratamento corroboram os dados apresentados em relação à Imunomarcação por IL-6, caracterizando a presença de um infiltrado inflamatório na psoríase. Além de ser um grande estímulo para a síntese de proteínas de fase aguda, a IL-6 promove a diferenciação das células B em células plasmáticas maduras, bem como a diferenciação de células T e sua ativação (RINCON, M., 2012). A estimulação direta dos queratinócitos pela IL-6 caracteriza o quadro de escamas na epiderme devido a uma produção exacerbada dos mesmos.

Nas imunomarcações realizadas com CD34+, as amostras dos animais do grupo controle tiveram ausência de marcações semelhantes; tanto os animais do grupo controle absoluto G1, quanto os animais do grupo controle G2 que tivera somente óleo de maracujá aplicados, quanto os animais do grupo controle G3 que tiveram LECIGEL® aplicado, quanto

os animais do grupo controle G4 que tiveram associação de OSM + LECIGEL® não apresentaram marcações significativas. Já nas amostras dos animais que tiveram aplicação de IMQ por 10 dias consecutivos, todos os grupos apresentaram marcação positiva para CD34+, tendo o grupo IMQ G1 a marcação mais expressiva por tratar dos animais que apenas receberam IMQ sem nenhum tipo de tratamento; as amostras respectivas aos animais do grupo IMQ G2 que foram tratados com OSM puro tiveram sua marcação reduzida em comparação aos animais do grupo IMQ G1, mostrando eficácia no tratamento; as amostras do grupo IMQ G3 que foram tratados com LECIGEL® tiveram sua marcação pouco reduzida em relação ao grupo IMQ G1, indicando baixa eficácia do tratamento proposto; já as amostras do grupo IMQ G4 teve sua marcação expressivamente reduzida em comparação ao grupo IMQ G1, sinalizando a alta eficácia do tratamento. A ausência de marcações de cada grupo controle respectivo ao grupo de tratamento corroboram os dados apresentados em relação à imunomarcação por CD34+.

6. CONCLUSÕES

A eficácia do óleo de semente de maracujá torna-se evidente no tratamento das lesões causadas por psoríase induzida por imiquimode. Observa-se a ação anti-inflamatória do óleo através do aumento da formação de corpos apoptóticos e diminuição de hiperplasia epitelial. A análise histoquímica por H&E permite observar a redução de acantose da epiderme, tanto quanto a diminuição da paraceratose nas células da superfície da epiderme. As imunomarcações realizadas durante o projeto corroboram dados existentes na literatura que afirmam a presença de interleucinas como a IL-6 no processo inflamatório da psoríase e sinalizam a redução de expressão das mesmas após tratamento com o óleo de semente de maracujá ou associação com LECIGEL®. A Imunomarcação por CD34+ confirma o envolvimento de células hematopoiéticas no processo de desenvolvimento da psoríase nos animais que recebem IMQ por dez dias e a redução desta marcação nos animais tratados com óleo de semente de maracujá evidenciam os efeitos antiinflamatórios do mesmo. A presença de angiogênese confirma-se com marcação de VEGF nos animais que receberam IMQ por dez dias, e a redução desta marcação em animais que receberam tratamento do óleo de semente de maracujá reafirmam os efeitos antiinflamatórios do mesmo. A redução na marcação PCNA dos animais tratados com óleo de semente de maracujá em relação aos animais que apenas receberam IMQ, corroboram os dados já existentes na literatura que sinalizam a redução da apoptose como uma das principais causas da psoríase e evidenciam seus efeitos antiinflamatórios com a presença de corpos apoptóticos nos animais tratados com o óleo.

7. REFERÊNCIAS

- AMALINEI, C., et al Immunohistochemical analysis of steroid receptors, proliferation markers, apoptosis related molecules, and gelatinases in non-neoplastic and neoplastic endometrium **Ann. Anat.**, Vol. 193, p. 43-5520, 2011.
- ANTIGA, E. et al Oral Curcumin (Meriva) Is Effective as an Adjuvant Treatment and Is Able to Reduce IL-22 Serum Levels in Patients with Psoriasis Vulgaris **BioMed Research International**, Vol. 2015, p. 7, 2015.
- ARTÉS M. et al Tacalcitol in the treatment of psoriasis vulgaris: the Spanish experience. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, Vol. 19, p. 414–7, 2005.
- ARZT, E. et al Molecular mechanisms and Th1/Th2 pathways in corticosteroid regulation of cytokine production. **J. Neuroimmunol**, Vol. 109, p. 23–9, 2000.
- ASHCROFT, D.M; LI WAN, P.O.; A; GRIFFITHS, C.E. Therapeutic strategies for psoriasis. **J. Clin. Pharm. Ther.**, Vol. 25, p.1–10, 2000.
- ATAIE-KACHOIE, P.; POURGHOLAMI, M.H.; MORRIS, D. L. Inhibition of the IL-6 signaling pathway: a strategy to combat chronic inflammatory diseases and cancer. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, Vol. 24, no. 2, p. 163–173, 2013.
- BAI, S., Z.; ZHANG, S. H.; LIU, X. Influence of different types of contact hypersensitivity on imiquimod-induced psoriasis-like inflammation in mice. **Molecular Medicine Reports**, Vol. 14, n. 1, p. 671-680, 2016.
- BERTH-JONES, J. Psoriasis. **Medicine (United Kingdom)**, Vol. 41, n. 6, p. 334-340, 2013.
- BLANPAIN, C., et al. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. **Cell**, Volume **118** p.635–648, 2004.
- BOEHNCKE, W.H., SCHÖN, M.P. Psoriasis. **The Lancet**, Vol. 386, p. 983-994, Set., 2015.
- BONNET, D. Biology of human bone marrow stem cells. **Clin. Exp. Med.**, Vol. 3, p. 140-149, 2003.
- BRESSAN. A. L., et al. Evaluation of ICAM-1 expression and vascular changes in the skin of patients with plaque, pustular, and erythrodermic psoriasis. **International Journal of Dermatology**, Vol. 57, n.2, p.209-216, 2018.
- BHUSHAN. M., et al. Levels of endothelial cell stimulating angiogenesis factor and vascular endothelial growth factor are elevated in psoriasis. **Br J Dermatol.**, Vol. 141, n. 6, p. 1054-1060, 1999.
- CELIS, J. E.; CELIS, A. Cell cycle-dependent variations in the distribution of nuclear cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: Subdivision of S phase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Vol. 82, p. 3262-3266, 1985.

CHAN., C. S., et al. Treatment of severe scalp psoriasis: from the Medical Board of the National Psoriasis Foundation. **J. Am. Acad. Dermatol.**, Vol. 60, n. 6, p. 962-71, 2009.

CLARK, A.R. Topical noncorticosteroid therapies for psoriasis. **Curr. Probl. Dermatol.**, Vol. 12, n 5, p.230–2, 2000.

COIMBRA, S. et al. The roles of cells and cytokines in the pathogenesis of psoriasis. **Int. J. Dermatol.**, Vol. 51, n. 4, p. 389-95, 2012.

DHAWAN, K., DHAWAN, S., SHARMA, A. Passiflora: a review update. Journal of Ethnopharmacology. **J Ethnopharmacol.**, Vol. 94, n. 1, p. 1-23, 2004.

DE SANTANA, F. C., et al. Chemical Composition and Antioxidant Capacity of Brazilian Passiflora Seed Oils. **J Food Sci.**, Vol. 80, n. 12, p. 2647-54, 2015.

DETMAR M, et al. Increased microvascular density and enhanced leukocyte rolling and adhesion in the skin of VEGF transgenic mice. **J. Invest. Dermatol.**, Vol. 111, n. 1, p. 1-6, 1998.

FALEIRO, F., et al. Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro: desafios da pesquisa. **Planaltina: Embrapa Cerrados.**, Vol. 1, n. 1, p. 187- 202, 2005.

FARBER, E.M.; NALL, M.L. The natural history of psoriasis in 5,600 patients. **Dermatologica.**, Vol. 148, p. 1-18, 1974.

FERRARA, N., GERBER, H.P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nat. Med.**, Vol. 9, n. 6, p. 669-676, 2003.

FERRARI, R. A.; COLUSSI, F.; AYUB, R. Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá: aproveitamento das sementes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Vol. 26, n. 1, p. 101-102, 2004.

FIELDING C. A., et al. IL-6 regulates neutrophil trafficking during acute inflammation via STAT3. **J. Immunol.**, Vol. 181, p. 2189–2195, 2008.

FLEISCHER Jr., A. B., et al. Alternative therapies commonly used within a population of patients with psoriasis. **Cutis**, Vol. 58, n. 3, p. 216–220, 1996.

FREZZETTI, D., et al. VEGF as a potential target in lung cancer. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, Vol. 21, n. 10, p. 959-966, 2017.

GABRILOVICH, D.I., et al. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. **Nat Med.**, Vol. 2, n. 10, p.1096–1103, 1996.

GELFAND, J.M., et al. The prevalence of psoriasis in African Americans: results from a population-based study. **J. Am. Acad. Dermatol.**, Vol. 52, n. 1, p. 23–6, 2005.

GOTTLIEB, S.L., et al. Response of psoriasis to a lymphocyte-selective toxin (DAB389IL-2) suggests a primary immune, but not keratinocyte, pathogenic basis. **Nat Med.**, Vol. 1, n. 5, p. 442-7, 1995.

GROVE, J.E.; BRUSCIA, E; KRAUSE, D.S. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. **Stem Cells**, Vol. 22, p. 487-500, 2004.

HIGASHI, Y., et al. High-fat diet exacerbates imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis in mice. **Exp Dermatol**, Vol. 27, n. 2, p. 178-184, 2018.

HUNTER, C.A.; JONES, S.A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. **Nat Immunol**, Vol. 16, n.5, p. 448-57, 2015.

ISHIHARA, K.; HIRANO, T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, Vol. 13, n. 4-5, p. 357–368, 2002.

JONES S. A.; SCHELLER J.; ROSE-JOHN, S. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. **Journal of Clinical Investigation**, Vol. 121, n. 9, p. 3375–3383, 2011.

JIA-YOU FANG et al. Using Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin as a Model to Measure the Skin Penetration of Anti-Psoriatic Drugs. **PLoS One**, Vol. 10, n. 9, 2015.

JIANG, Y., et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**, Vol. 418, p. 41-49, 2002.

JULLIEN, D.; BARKER, J.N. Genetics of psoriasis. **J Eur Acad Dermatol Venereol**. Vol. 20, n. 2, p. 42–51, 2006.

KELMAN, Z. PCNA: structure, functions and interaction. **Oncogene**, Vol. 14, p. 629–640, 1997.

KESSLER, R.C. et al. Trends in alternative medicine use in the United States, 1990–1997: results of a follow-up national survey.” **JAMA**, Vol. 280, p. 1569-1575, 1998.

KIRKHAM, B.W.; KAVANAUGH, A.; REICH, K. Interleukin-17A: a unique pathway in immune-mediated diseases: psoriasis, psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. **Immunology**, Vol. 141, n. 2, p. 133-42, 2014.

KLEBOW, S., et al. IL-6 signaling in myelomonocytic cells is not crucial for the development of IMQ-induced psoriasis. **PLoS One**, Vol. 21, n. 11, 2016.

KOBORI. C.N.; JORGE. N. Caracterização dos óleos de algumas sementes de frutas como aproveitamento de resíduos industriais. **Ciênc. Agrotec.**, Vol. 29, p. 1008-1014, 2005.

LANGLEY, R.G.; ELLIS, C.N. Evaluating psoriasis with Psoriasis Area and Severity Index, Psoriasis Global Assessment, and Lattice System Physician’s Global Assessment. **J Am Acad Dermatol**, Vol. 51, n. 4, p. 563–9, 2004.

LEBWOHL, M. A clinician’s paradigm in the treatment of psoriasis. **J Am Acad Dermatol**, Vol. 53, n.1, p.59–69, 2005.

LEBWOHL, M.; ALI, S. Treatment of Psoriasis. Part 2. Systemic therapies. **J Am Acad Dermatol.**, Vol. 45, p.649–61, 2001.

LEBWOHL, M. The role of salicylic acid in the treatment of psoriasis. **Int J Dermatol.**, Vol. 38, n.1, p.16–24, 1999.

LIU, R.F., et al. Impact of BMMSCs from different sources on proliferation of CD34⁺ cells. **Genet Mol Res.** Vol. 14, n.1, p.474-82, 2015.

LIU, S., et al. Physical and chemical analysis of Passiflora seeds and seed oil from China. **Int J Food Sci Nutr.**, Vol. 59, n. 7-8, p. 706-15, 2008.

LOWES M.A., BOWCOCK A.M.; KRUEGER J.G. Pathogenesis and therapy of psoriasis. **Nature**, Vol. 445, p. 866– 873, 2007.

MALACRIDA C.R.; JORGE. N. Yellow passion fruit seed oil (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*): physical and chemical characteristics. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, Vol. 55, n. 1, p. 127-134, 2012.

MALECIC N.; YOUNG HS. Novel investigational vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor antagonists for psoriasis. **Expert Opin. Investig Drugs.**, Vol. 25, n. 4, p. 455-62, 2016.

MALMSTROM, P. U.; WESTER, K., VASKO, J.; BUSCH, C. Expression of proliferative cell nuclear antigen (PCNA) in urinary bladder carcinoma. Evaluation of antigen retrieval methods. **APMIS**, Vol. 100, p. 988-992, 1992.

MATSUMURA, Y.; ANANTHASWAMY, H.N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. **Toxicol Appl Pharmacol.**, Vol. 195, n. 3, p.298–308, 2004.

MIYOSHI, K. et al. Stat3 as a therapeutic target for the treatment of psoriasis: a clinical feasibility study with STA-21, a Stat3 Inhibitor. **Journal of Investigative Dermatology**, Vol. 131, no. 1, p. 108–117, 2011.

MOLDOVAN, G.L.; PFANDER, B.; JENTSCH, S. PCNA, the maestro of the replication fork. **Cell**, Vol. 129, p. 665–679, 2007.

NAKAYAMA H, et al. Differential expression of CD34 in normal colorectal tissue, peritumoral inflammatory tissue, and tumour stroma. **Journal of Clinical Pathology**, Vol. 53, p. 626-629, 2000.

NEILL, W.A.; HALLIDAY, K.E.; NORVAL, M. Differential effect of phototherapy on the activities of human natural killer cells and cytotoxic T cells. **J Photochem Photobiol B.**, Vol. 47, n. 2–3, p.129–35, 1998.

NESTLE, F.O.; KAPLAN, D.H.; BARKER, J. Psoriasis. **N Engl J Med.**, Vol. 30, n. 5, p. 496-509, 2009.

- NEUNER, P., et al. Increased IL-6 Production by Monocytes and Keratinocytes in Patients with Psoriasis. **Journal of Investigative Dermatology**, Vol. 97, n. 1, p. 27-33, 1991.
- NEURATH, M. F.; FINOTTO, S. IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, Vol. 22, no. 2, p. 83–89, 2011.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, Vol. 70, no. 3, pp. 461–477, 2007.
- NICKOLOFF, B.J. et al. The cytokine and chemokine network in psoriasis. **Clin Dermatol.**, Vol. 25, n. 6, p. 568-73, 2007.
- NICKOLOFF, B.J.; NESTLE, F.O. Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. **J Clin Invest.**, Vol. 113, p. 1664-75, 2004.
- NIELSEN, J.S.; McNAGNY, K.M. Novel functions of the CD34 family. **J Cell Sci.**, Vol. 121 p. 3683–3692, 2008.
- NISHII, Y.; OKANO, T. History of the development of new vitamin D analogs: studies on 22- oxacalcitriol (OCT) and 2beta-(3-hydroxypropoxy) calcitriol (ED-71). **Steroids.**, Vol. 66, n. 3–5, p. 137–46, 2001.
- NIU, X.P.; XU, H.T.; YIN, G.H. Of psoriatic peripheral blood in patients with a single nuclear cell culture supernatant on bone marrow hematopoietic stem cells and progenitor cell colony formation. **Zhong Hua Pi Fu Ke.**, Vol. 39, p. 143-145, 2006.
- OLIVEIRA, E. M. S.; REGIS, S. A.; RESENDE, E. D. Caracterização dos resíduos da polpa do maracujá-amarelo. **Cienc. Rural**, Vol. 41, n. 4, p. 725-730, 2011.
- PARK, S.C., et al. Clonogenically culturing and expanding CD34 + liver cancer stem cells in vitro. **Stem Cells Dev.**, Vol. 24, p. 506–1514, 2015.
- PATEL, A.B. et al. TNF stimulates IL-6, CXCL8 and VEGF secretion from human keratinocytes via activation of mTOR, inhibited by tetramethoxyluteolin. **Exp Dermatol.**, Vol. 27, n. 2, p. 135-143, 2018.
- PAULA, S. J. et al. Topical Brazilian propolis improves corneal wound healing and inflammation in rats following alkali burns. **BMC Complementary and Alternative Medicine.**, Vol. 13, p. 337, 2013.
- PAYNE, D.N.R.; ADCOCK, I. Molecular mechanisms of corticosteroid actions. **Paediatr Respir Rev.**, Vol. 2, n. 2, p. 145–50, 2001.
- RAUT, A. S. et al. Psoriasis Clinical Implications and Treatment: A Review **Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems**, Vol. 30, n. 3, p. 183–216, 2013.
- RINCON, M. Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. **Trends in Immunology**, Vol. 33, n. 11, p. 571–577, 2012.

SAGGINI, A.; CHIMENTI, S.; CHIRICOZZI, A. IL-6 as a Druggable Target in Psoriasis: Focus on Pustular Variants. **Journal of Immunology Research**, Vol. 2014, p. 10, 2014.

SAGOO, G.S., et al. Genome-wide studies of psoriasis susceptibility loci: a review. **J Dermatol Sci.**, Vol. 35, n. 3, p. 171–9, 2004.

SANCHEZ, A.P.G. Immunopathogenesis of psoriasis. **An. Bras. Dermatol.**, Vol. 85, 2010.

SCHON, M.P.; BOEHNCKE, W.H. Psoriasis. **N Engl J Med**, Vol. 352, n. 18, p. 1899-1912, 2005.

SCHON, M.P.; SCHON, M. Imiquimod: mode of action. **Br. J. Dermatol.**, Vol. 157, n. 2 p. 8-13, 2007.

SIDNEY, L.E., et al. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. **Stem Cells**, Vol. 32, p. 1380–1389, 2014.

SILVA, R. M. et al. Chemical characterization of passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) seeds. **African Journal of Biotechnology**, Vol. 14, n. 14, p. 1230-1233, 2015.

SUN, J.; ZHAO, Y.; HU, J. Curcumin Inhibits Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Inflammation by Inhibiting IL-1beta and IL-6 Production in Mice. **PLoS ONE**, Vol. 8, n. 6, 2013.

THEILE, A.; MUELLER, K.M. Proliferation kinetics of brochioloalveolar tumorlets. **Pathologe**, Vol. 17, n. 2, p. 163-170, 1996.

THEOHARIDES, T.C., et al. IL-33 augments substance P-induced VEGF secretion from human mast cells and is increased in psoriatic skin. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, Vol. 107, n. 9, p. 4448-4453, 2010.

VAN DER FITS, L., et al. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. **J Immunol.**, Vol. 182, n. 9, p. 5836-45, 2009.

VERSTUYF, A. et al. Mechanisms for the selective action of Vitamin D analogs. **J Steroid Biochem Mol Biol.**, Vol. 97, n. 1–2, p. 21–30, 2005.

VIZIO, B., et al. Pancreatic-carcinoma-cell-derived pro-angiogenic factors can induce endothelial-cell differentiation of a subset of circulating CD34 + progenitors. **J Transl Med.**, Vol. 11, n. 314, 2013.

WANG, W.Q., et al. Intratumoral alpha-SMA enhances the prognostic potency of CD34 associated with maintenance of microvessel integrity in hepatocellular carcinoma and pancreatic cancer. **PLoS One**, Vol. 8, n. 71189, 2013.

WARGON, O.; PAVER, W.K. Dithranol in a cream base in the treatment of psoriasis. **Australas J Dermatol.**, Vol. 23, n. 3, p. 123–5, 1982.

WEIGE, M. T. et al. Differential expression of MMP-2, MMP-9 and PCNA in endometriosis and endometrial carcinoma. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, Vol. 160, n. 1, p. 74-78, 2012.

WEINSTEIN, G.D. et al. Psoriasis treatment 2003 at the new millennium: Position paper on behalf of the authors.” **J Am Acad Dermatol.**, Vol. 49, n. 2, p. 39–43, 2003.

WITTE, C.J. de, et al. Imiquimod in cervical, vaginal and vulvar intraepithelial neoplasia: A review. **Gynecologic Oncology**. Vol. 139, n. 2, p. 377-384, 2015.

XIA, J.X. et al. Effect of FGF10 monoclonal antibody on psoriasis-like model in guinea pigs. **Int J Clin Exp Pathol.**, Vol. 15, n. 5, p. 2219-28, 2014.

XIONG, H., et al. Glycyrrhizin Ameliorates Imiquimod- Induced Psoriasis-like Skin Lesions in BALB/c Mice and Inhibits TNF- α -Induced ICAM-1 Expression via NF- κ B/MAPK in HaCaT Cells. **Cell Physiol Biochem.**, Vol. 35, p. 1335-1346, 2015.

YIN, G.H.; LI, X.H.; ZHANG, K.M. Psoriasis patients bone marrow CD34+ cells in vitro directed differentiation of T cell activity research. **Zhong Hua Pi Fu Ke.**, Vol. 39, p. 124-127, 2006.

YU, C.W., et al. Haemangiopericytomas. The prognostic value of immunochemical staining with a monoclonal antibody to proliferating cell nuclear antigen. **Histopathology**, Vol. 19, p. 29-33, 1991.

ZHANG K, et al. Differential cytokine secretion of cultured bone marrow stromal cells from patients with psoriasis and healthy volunteers. **Eur. J. Dermatol.**, Vol. 20, p. 49-53, 2010.

ZHANG, K.M.; LI, X.H. “Bone marrow, psoriasis disease “center”. **Zhong Guo Pi Fu Xing Bing Xue**, Vol. 18, p. 501-503, 2004.

ZHANG, Y.; LI, L.S.; FU, X.H. Cord Blood CD34+ cells in MACS sorting and significance. **Hu Nan Shi Fan Da Xue Xue Bao**, Vol. 1, p. 36-38, 2004.

8. ANEXOS

I - Certificado de aprovação no Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*Efeitos do óleo da semente do maracujá na psoríase experimental*”, registrado com o número **156/2016**, sob a responsabilidade da **Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 20 de fevereiro de 2017.

Este Protocolo prevê a utilização de 36 camundongos Balb/c machos pesando 20g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 20/02/2017 a 20/12/2017.

We certify that the Protocol *nº 156/2016*, entitled “*Effects of passion fruit seed oil on experimental psoriasis*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 02/20/2017. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 36 male Balb/c mice weighing 20g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 12/20/2017.

Ribeirão Preto, 20 de fevereiro de 2017

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP – USP

ANEXO II – Formulação de Creme à base de LECIGEL®

Lecigel	2%
Água deionizada	q.sp.

LECIGEL® - AQIA Química Industrial

INCI:	Sodium acrylates copolymer (and) Lecithin
pH:	4 – 8
Principal dose de emulsificante:	0,5-2%
Dose regulador de viscosidade:	0,5-2%
Dose estabilizador:	0,1-2%

ANEXO III – Formulação Óleo de semente de maracujá 20% + LECIGEL®2 %

Óleo de semente de maracujá	20%
Glicerina Bidestilada	3,0%
LECIGEL®	2,0%
QUEMINOL K®	2,0%
BHT (butylated hydroxytoluene)	0,05%
Água Deionizada	q.s.p