

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**LUISE ZOZULA BLIND CARRENHO**

**Investigação das atividades anti-inflamatória e antiproliferativa de porfirina  
catiônica**

**CURITIBA 2015**

**LUISE ZOZULA BLIND CARRENHO**

**Investigação das atividades anti-inflamatória e antiproliferativa de porfirina  
catiônica**

Tese apresentada como requisito parcial  
à obtenção do grau de Doutor em  
Ciências Farmacêuticas, no Curso de  
Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas, Setor de Ciências da  
Saúde, da Universidade Federal do  
Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Michel Fleith Otuki

**CURITIBA 2015**

Carrenho, Luise Zozula Blind  
Investigação das atividades anti-inflamatória e antiproliferativa de  
porfirina catiônica / Luise Zozula Blind Carrenho - Curitiba, 2015.  
151 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientador: Professor Dr. Michel Fleith Otuki  
Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do  
Paraná. 2015.

Inclui bibliografia  
1. Terapia fotodinâmica. 2. Porfirina. 3. Inflamação. 4.  
Hiperproliferação. 5. Psoríase. I. Otuki, Michel Fleith. II. Universidade  
Federal do Paraná. III. Título.

CDD 547.593

# TERMO DE APROVAÇÃO

**LUISE ZOZULA BLIND CARRENHO**

**Título: “Investigação da atividade anti-inflamatória e antiproliferativa de Porfirina Catiônica”**

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.



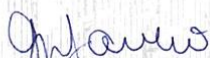
Prof. Dr. Michel Fleith Otuki  
Orientador



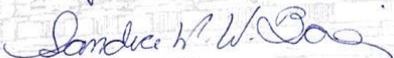
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Regina Orofino Kreuger  
Universidade do Vale do Itajaí



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Eunice André  
Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. Giovanni Marino Favero  
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sandra Mara Woranovicz Barreira  
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 19 de junho de 2015.

**Ao meu eterno amor Willian, pelo amor, dedicação, compreensão, ajuda, paciência, sempre ao meu lado com palavras de apoio e incentivo.**

**Ao meu bem mais precioso, meu filho Caio, por proporcionar essa maravilhosa chance de ser sua mãe, a luz da minha vida.**

**A minha mãe Diana, exemplo de mãe, sempre dando apoio e incentivo em todas as horas, sempre ajudando em qualquer momento, obrigada por tudo.**

**Ao meu pai Frederico, pelo exemplo que foi em minha vida, seu amor e dedicação à família, seus grandes ensinamentos, sempre incentivando seus filhos a estudarem e tornarem-se pessoas melhores.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pelo caminho que tem traçado em minha vida durante todos esses anos.

Ao meu orientador Dr. Michel Otuki, pelo apoio, confiança e grandes ensinamentos no durante esse tempo de convívio.

A minha irmã Leonora, sempre incentivando, ajudando e apoiando em todas as horas, meu cunhado Renato e meus sobrinhos Eduardo, Arthur e Giórgia, pelo apoio e incentivo.

Ao meu irmão Leonardo pela sua ajuda, incentivo em todos os momentos, minha cunhada Hotiene, sempre disposta a ajudar e incentivando sempre.

A minha irmã Elise, por ser uma grande irmã, ajudando em todas as horas, meu cunhado Wagner pelo apoio e incentivo e minhas sobrinhas Amanda e Camila.

A minha irmã Elena, por seu apoio e palavras de conforto e animo sempre, meu cunhado Fabricio pelo apoio.

A minha irmã Eunice, sempre ajudando com palavras de força e animo e seu noivo Neto.

As minhas cunhadas Bia e Cris juntamente com meus cunhados William e Marcelo por todo apoio e incentivo.

A minha eterna amiga, Camila Moreia, um grande exemplo de ajuda ao próximo, sempre disposta a ajudar, por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis durante essa jornada dando apoio e incentivo, pelas inúmeras risadas, muito obrigada do fundo do meu coração Cami.

A todos os meus colegas de laboratório durante essa jornada, pela convivência, incentivo e sempre ajudando quando precisei: Arthur, Bruna, Bruno, Daniel, Graziela, Priscila, vocês foram uma grande força durante esses anos.

A professora, mestre e amiga. Dra. Sandra Barreira, por ter acreditado em meu potencial, sempre disposta a ajudar, foi uma grande amiga em momentos bem difíceis.

A professora, mestre e sempre amiga em todas as horas desde minha graduação, meu exemplo de trabalho e garra, Dra. Maria Regina Kreuger, obrigada por tudo.

A Camila Vandresen, grande exemplo de amor ao próximo, sempre disposta a ajudar e ensinar com sua calma e bondade.

Ao Prof. Dr. Alan Gonçalves, pela oportunidade e confiança de trabalhar junto.

As minhas eternas amigas Michele e Simone, quantas vezes foram vocês que me ajudaram a não desanimar jamais, sempre dispostas a ajudar em todas as horas.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Ciências Farmacêuticas, pelos ensinamentos.

Aos servidores do Departamento de Farmacologia e Ciências Farmacêuticas e todos os colegas de pós-graduação.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto.

.

## RESUMO

A psoríase é uma doença inflamatória crônica da pele, com características tanto imunológicas quanto hiperproliferativas. Os tratamentos tradicionais para essa doença apresentam algumas desvantagens, dentre elas falta de adesão e toxicidade. A terapia fotodinâmica (TFD) tem sido usada, cada vez mais, no tratamento de algumas doenças, inclusive cutâneas. Consiste na utilização de luz, oxigênio e um agente fotossensibilizador onde ocorre uma reação fotoquímica com o objetivo de causar destruição seletiva de um tecido. Nesse trabalho a porfirina lodeto de 5,10 -difênil – 15, 20 (N-metilpiridino-4-il) porfirina (Di-*cis*-Py+) foi utilizada como fotossensibilizador e seus possíveis efeitos anti-inflamatório e antiproliferativo foram avaliados em modelos de inflamação cutânea. A aplicação tópica de Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, reduziu significativamente o edema de orelha induzido pela aplicação de agentes flogísticos como óleo de cróton e TPA, bem como a migração leucocitária para o foco inflamatório. A atividade anti-inflamatória da Di-*cis*-Py+ também foi evidenciada pela redução das citocinas inflamatórias IL-6, IL1- $\beta$  e TNF- $\alpha$  induzidas por ambos agentes flogísticos. Além do efeito anti-inflamatório, no modelo induzido por múltiplas aplicações de óleo de cróton, a Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, levou à redução da hiperproliferação epidérmica, evidenciada através da inibição dos níveis e da expressão do marcador de proliferação PCNA. Também foi capaz de reduzir a viabilidade celular de queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT). Seu efeito anti-inflamatório, porém, não ocorre através de receptores de glicocorticoide, uma vez que não houve a reversão do efeito da Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, após o tratamento com o antagonista de receptores de glicocorticoide, mifepristona. Além disso, provavelmente, não ocorre sua absorção, ao contrário da dexametasona. Os resultados apresentados sugerem que a Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, pode ser uma molécula com potencial para o desenvolvimento de um novo agente fotossensibilizador para o tratamento de doenças inflamatórias proliferativas cutâneas, apresentando vantagens por ser de aplicação tópica, não ocorrendo uma aparente fotossensibilidade, com efeitos similares aos da dexametasona, uma droga de primeira linha para o tratamento de doenças inflamatórias hiperproliferativa.

**Palavras-chave:** Terapia Fotodinâmica, Porfirina, Inflamação, Hiperproliferação, Psoríase.



## ABSTRACT

Psoriasis is a chronic inflammatory skin disease, with immunological and hyperproliferative characteristics. Traditional treatments for this disease present some disadvantages, as lack of adherence and toxicity. Photodynamic therapy (PDT) is getting more and more applied in the treatment of certain diseases, including skin ones. It consists in the use of light, oxygen and a photosensitizer agent in which a photochemical reaction occurs in order to cause a selective destruction of a tissue. In this work the porphyrin iodide 5, 10-diphenyl - 15 20 (N-methylpyridinium-4-yl) porphyrin (Di-*cis*-Py +) was applied as a photosensitizer; and their possible anti-inflammatory and antiproliferative effects were assessed in skin inflammation models. The topical application of Di-*cis*-Py+, when photoactivated, reduced significantly the ear edema induced by the application of phlogistic agents such as croton oil and TPA, as well the leukocyte migration into the inflammatory focus. The anti-inflammatory activity Di-*cis*-Py+, when photoactivated, was also noticed by the reduction of the inflammatory cytokines IL-6, IL1- $\beta$  and TNF- $\alpha$  induced by both phlogistic agents. Besides the anti-inflammatory effect, in the model induced by multiple croton oil application, Di-*cis*-Py +, when photoactivated, led to a reduction of epidermal hyperproliferation, noticed by the inhibition of the levels and expression of the proliferation PCNA marker. It was also able to reduce the cell viability of human immortalized keratinocytes (HaCaT). Its anti-inflammatory effect, however, does not occur through glucocorticoid receptors, once there was no reversion of the Di-*cis*-Py+, when photoactivated, effect after the treatment with the antagonist of glucocorticoid receptors, mifepristone. Moreover, probably no absorption occurs, different from dexamethasone. The presented results suggest that Di-*cis*-Py +, when photoactivated, can be a molecule with potential for developing a new photosensitizing agent to treat proliferative inflammatory skin diseases, offering advantages for being topically applied, without an apparent photosensitivity, with similar dexamethasone effects, a high level drug for treating inflammatory hyperproliferative disease.

**Keywords:** Photodynamic Therapy, Porphyrin, Inflammation, Hyperproliferation, Psoriasis.

**“Dizem que a vida é para quem sabe viver, mas ninguém nasce pronto. A vida é para quem é corajoso o suficiente para se arriscar e humilde o bastante para aprender.”**

Clarice Lispector

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	A pele, suas camadas, estruturas e células residentes do sistema imune.....	27
Figura 2 -	Formação e evolução das placas psoriáticas.....	33
Figura 3 -	Terapia Fotodinâmica.....	42
Figura 4 -	Iodeto de 5,10 -difênil – 15,20 (N-metilpiridino-4-il) porfirina (Di-cis-Py+).....	47
Figura 5 -	Lâmpada LUMACARE LC-122A.....	52
Figura 6 -	Delineamento experimental do modelo de edema induzido por múltiplas aplicações de óleo de cróton.....	60
Figura 7 -	Avaliação da viabilidade das células da linhagem HaCat após tratamento da Di-cis-Py+ sem fotoativação.....	70
Figura 8 -	Avaliação da viabilidade das células da linhagem HaCat após tratamento da Di-cis-Py+ com fotoativação.....	72
Figura 9 -	Efeito da Porfirina Di-cis-Py+ sem fotoativação aplicada por via tópica em edema de orelha agudo.....	75
Figura 10 -	Efeito da aplicação tópica de Di-cis-Py+ no modelo de inflamação aguda induzida por TPA.....	78
Figura 11 -	Avaliação histológica do efeito da Di-cis-Py+ no modelo de inflamação aguda induzida por TPA.....	81
Figura 12 -	Efeito da Di-cis-Py+ fotoativada sobre os níveis de TNF- $\alpha$ no modelo de inflamação aguda induzida por TPA.....	82
Figura 13 -	Efeito da Di-cis-Py+ fotoativada sobre os níveis de IL-6 no no modelo de inflamação aguda induzida por TPA.....	83
Figura 14 -	Efeito da Di-cis-Py+ fotoativada sobre os níveis de IL-1 $\beta$ no no modelo de inflamação aguda induzida por TPA.....	84
Figura 15 -	Efeito da Di-cis-Py+ induzido por múltipla aplicação de óleo de cróton.....	86

Figura 16 - Análise do efeito da Di-cis-Py+ sem fotoativação sobre alterações histológicas no modelo de indução de inflamação crônica mediado por aplicações múltiplas de óleo de cróton.....	88
Figura 17 - Efeito da Di-cis-Py+ no edema induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton.....	90
Figura 18 - Efeito tópico da Di-cis-Py+ no modelo de indução de inflamação crônica mediado por aplicações múltiplas de óleo de cróton, e avaliação da atividade das enzimas MPO e NAG...	91
Figura 19 - Imagens representativas da análise histológica do efeito da Di-cis-Py+ sobre alterações histológicas no modelo de indução de inflamação crônica mediado por aplicações múltiplas de óleo de cróton.....	95
Figura 20 - Efeito da Di-cis-Py+ fotoativada sobre os níveis de TNF- $\alpha$ no modelo de inflamação induzido pela múltipla aplicação de Óleo de cróton.....	97
Figura 21 - Efeito da Di-cis-Py+ fotoativada sobre os níveis de IL-1 $\beta$ no modelo de inflamação induzido pela múltipla aplicação de Óleo de cróton.....	98
Figura 22 - Efeito da Di-cis-Py+ fotoativada sobre os níveis de IL-6 no modelo de inflamação induzido pela múltipla aplicação de Óleo de cróton.....	99
Figura 23 - Efeito da Di-cis-Py+ fotoativada (0,1 mg/orelha) sobre a expressão epidérmica de PCNA induzida pela aplicação múltipla de óleo de cróton.....	101
Figura 24 - Avaliação da proliferação dos níveis de antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) no modelo com múltipla aplicação de Óleo de cróton.....	102
Figura 25 - Efeito da aplicação tópica de Di-cis-Py+ em orelha oposta no modelo de inflamação aguda induzida por TPA.....	104
Figura 26 - Reversão da atividade antiedematogênica de Di-cis-Py+ fotoativada e dexametasona pela mifepristona.....	105

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Porcentagem de inibição celular após tratamento com Di-cis-Py+ fotoativada (0,01 - 1 $\mu$ M) nos tempo de 10, 20 e 30 minutos.....	73
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPs - peptídeos antimicrobianos

ANOVA - análise de variância de uma via

BSA - albumina de soro bovino

BPD-MA - monoacídico de uma benzoporfirina

CDs - células dendríticas

CD4<sup>+</sup> - células T helper

CLA - linfócito cutâneo

DAB - kit substrato diaminobenzidina para peroxidase

DMEM - Meio dulbecco mem

DTT - ditioneitol

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

EGF - fator de crescimento epidérmico

ELISA - Ensaio Imunoadsorvente Ligado à Enzima

ERO - espécies reativas de oxigênio

EPM - erro padrão da média

G-CSF - fator estimulante de colônia de granulócito

GM-CSF - fator estimulante de colônia de granulócitos-macrófagos

GM-GSF - fator estimulador de colônias de granulócitos e leucócitos

HaCaT - queratinócitos humanos imortalizados

HE - hematoxilina e eosina

HEPES - 4-(2-hidroxietil)piiperazina-1

HPA - hipotálamo-pituitária-adrenal

HTAB - hexadeciltrimetilamônio

ICAM-1 - molécula de adesão intercelular-1

KGF - fator de crescimento de queratinócitos

LTB<sub>4</sub> - quimioatraente leucotrieno de neutrófilos

LL- 37 - peptídeo catelicidina humana

MPO - enzima mieloperoxidase

MTT - brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

NAG- p-nitrofenil- N-acetil-β-D-glicosamina

NKT - células T natural killer

PCNA - antígeno nuclear de proliferação celular

PGE<sub>2</sub> – prostaglandina

PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonil

PKC - proteína quinase C

PpIX - Protoporfirina IX

PUVA - Psoraleno + UVA

SFB - soro fetal bovino

TFD - terapia fotodinâmica

TMB – tetrametilbenzidina

TNF-α - fator de necrose tumoral α

TPA - 12-O-tetradecanoilforbol acetato

UVA – radiação ultravioleta

UVB - luz ultravioleta B.

UVB-NB - UVB de banda estreita

VCAM-1 - molécula de adesão de células vasculares-1

VEGF - fator de crescimento vascular endotelial

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>23</b>
2.1 Pele.....	23
2.1.1 Epiderme.....	23
2.1.2 Derme.....	26
2.1.3 Hipoderme.....	27
2.2 Doenças inflamatórias de pele.....	28
2.3 Psoríase.....	28
2.3.1 Imunopatogênese e alterações histopatológicas.....	31
2.3.2 Tratamentos.....	36
2.4 Terapia Fotodinâmica (TFD).....	40
2.5 Fotossensibilizador.....	44
2.5.1 Porfirina.....	45
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>48</b>
3.1 Objetivo Geral.....	48
3.2 Objetivos Específicos.....	48
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>50</b>
4.1 Drogas e Reagente.....	50



4.2 Fotossensibilizador.....	51
4.3 Tratamento com fotossensibilização.....	51
4.4 Cultivo celular.....	52
4.5 Ensaio de Viabilidade Celular.....	53
4.6 Estudos de fotoativação <i>in vitro</i> .....	54
4.6.1 Tratamento sem luz (fotoativação).....	55
4.6.2 Tratamento com luz (fotoativação) nos tempos de 10, 20 e 30 minutos.....	55
4.7 Animais.....	56
4.8 Edema de orelha.....	56
4.8.1 Edema de orelha agudo induzido pela aplicação de TPA.....	57
4.8.2 Modelo de edema induzido por múltiplas aplicações de óleo de cróton.....	59
4.9 Ensaio da atividade enzimática de Mieloperoxidase (MPO).....	60
4.10 Ensaio da atividade enzimática de N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG).....	61
4.11 Quantificação de Citocinas.....	62
4.12 Avaliação do tecido cutâneo através de análise histológica.....	63
4.13 Verificação e quantificação da expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) por Imunohistoquímica.....	64
4.14 Avaliação dos níveis da proteína PCNA pelo ensaio de Western Blot.....	66

4.15 Edema de orelha agudo induzido pela aplicação de TPA com tratamento de Di- <i>cis</i> -Py+ no lado oposto.....	67
4.16 Ensaio de Reversão por Antagonista Corticóide (RU 486-Mifepristona).....	67
4.17 Análise estatística.....	68
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>69</b>
5.1 Modelo in vitro.....	69
5.1.1 Tratamento com fotossensibilizador Di- <i>cis</i> -Py+ sem fotoativação.....	69
5.1.2 Tratamento da Di- <i>cis</i> -Py+ com fotoativação.....	71
5.2 Avaliação de parâmetros inflamatórios no modelo de edema de orelha induzido por 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA).....	74
5.2.1 Efeitos da Di- <i>cis</i> -Py+ sem fotoativação no edema agudo de orelha induzido pela aplicação de TPA.....	74
5.2.2 Avaliação da Di- <i>cis</i> -Py+ com fotoativação no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação de TPA.....	75
5.2.3 Efeitos da Di- <i>cis</i> -Py+ fotoativada na liberação de citocinas após a indução por TPA.....	81
5.3 Modelo de edema induzido pela múltipla aplicação de óleo de cróton	85
5.3.1 Efeito da Di- <i>cis</i> -Py+ sem fotoativação.....	85
5.3.2 Efeito da Di- <i>cis</i> -Py+ com fotoativação.....	88

5.4 Avaliação do possível efeito sistêmico da administração tópica de Di- <i>cis</i> -Py+, quando fotoativada.....	103
5.5 Avaliação da interação da Di- <i>cis</i> -Py+ fotoativada com os receptores glicocorticoides.....	104
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>107</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>135</b>
<b>REFERÊNCIA.....</b>	<b>136</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A psoríase é uma doença inflamatória crônica, mediada pelo sistema imune, que se manifesta principalmente por lesões cutâneas e em alguns casos, comprometimento articular (NESTLE; KAPLAN *et al.*, 2009). É uma doença cutânea comum, com prevalência entre 1-3%, sendo influenciada por fatores ambientais e étnicos (JACOBSON, KUMAR *et al.*, 2011). A etiopatogenia da psoríase ainda não está bem elucidada, embora a transmissão genética esteja claramente envolvida, parece não haver o padrão de transmissão clássico autossômico recessivo ou dominante. Estudos de mapeamento genético demonstraram o envolvimento de diversos genes; no entanto somente a presença destes parece não ser suficiente para a manifestação dos sinais e sintomas, sendo necessária a interação com estímulos ambientais (ORTONNE, 1996). Vários fatores parecem ser capazes de desencadear ou agravar os sintomas da doença como o consumo de álcool, o uso de cigarros, lesões por trauma e estresse (BASAVARAJ, NAVYA *et al.*, 2011).

Tradicionalmente, a psoríase é tratada com corticosteróides e agentes tópicos. Os resultados insatisfatórios incentivaram os avanços científicos e aumentaram a adesão de terapias sistêmicas, os quais foram desenvolvidos com o intuito de atender questões como mau controle da doença. No entanto, o tratamento sistêmico usualmente interfere negativamente na qualidade de vida do paciente, além de envolver altos custos para a continuidade da terapia, sem alcançar resultados totalmente satisfatórios. Além disso, há relutância na prescrição de terapia sistêmica, devido ao risco de baixa adesão, intolerância e efeitos adversos (ROZENBLIT e

LEBWOHL, 2009; STROWD, YENTZER *et al.*, 2009; BEYER e WOLVERTON, 2010).

Outra modalidade de tratamento adotada para os quadros moderados a graves de psoríase é a fototerapia com radiação ultravioleta. A fototerapia com PUVA (Psoraleno + UVA), geralmente é eficaz, mas o grau de eficácia é variável entre os pacientes. Além disso, há o risco do surgimento de câncer de pele desencadeado pela fototerapia com PUVA (LAPOLLA, YENTZER *et al.*, 2011). De uma forma geral, os efeitos adversos mais comuns são eritema, pequenas queimaduras e lesões que podem persistir por semanas após a aplicação de radiação ultravioleta. (LAPOLLA, YENTZER *et al.*, 2011).

As propriedades terapêuticas da luz são conhecidas há mais de três mil anos. Antigas civilizações utilizavam, como opção para o tratamento da psoríase e outras doenças de pele, a ingestão de plantas (contendo psoralenos) juntamente com a exposição à luz, porém os estudos na área da Terapia Fotodinâmica iniciaram apenas no último século (SIMPLICIO, MAIONCHI *et al.*, 2002).

Há algum tempo, a terapia fotodinâmica (TFD) tem sido muito utilizada e com bastante sucesso no tratamento de diferentes tumores, e vem se tornando uma técnica cada vez mais poderosa no tratamento de doenças de pele não oncológicas e/ou inflamatórias (LARISCH, VERWANGER *et al.*, 2014).

A terapia fotodinâmica envolve a administração de um agente fotossensibilizador, o qual é absorvido metabolicamente pelas células e ativado por irradiação com uma fonte de luz. Nos últimos anos a terapia fotodinâmica vem sendo utilizada como outra opção terapêutica para a psoríase, tendo como vantagem o

risco não carcinogênico, o que facilita a adesão à terapia dos pacientes que se limitam a tratamentos com PUVA (CARRASCOSA, LÓPEZ-ESTEBARANZ *et al.*, 2011).

Fotossensibilizador é um composto químico que, ao absorver luz em comprimento de onda específico, inicia reações de foto-oxidação (SILVA, SANTOS *et al.*, 2009). A maioria dos fotossensibilizadores utilizados atualmente corresponde às porfirinas. Uma classe de compostos macrocíclicos que ocorrem naturalmente e desempenham uma enorme variedade de funções nos sistemas biológicos. Os derivados porfirínicos, apresentam um espectro de absorção característico, com uma banda de absorção intensa em torno de 420nm, e outras de menor intensidade na faixa de 500 a 700 nm. São muito utilizadas em aplicações médicas e industriais, como fototerapia, fotodiagnóstico, fotocátalise, conversão de energia solar e optoeletrônica (BIESAGA, PYRZYNSKA *et al.*, 2000; BERG, SELBO *et al.*, 2005)

Estudos prévios conduzidos neste laboratório com algumas porfirinas foram realizados para avaliar a atividade das mesmas em queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) com e sem a fotoativação, em várias concentrações. Após esse “screening” com várias porfirinas, a porfirina Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, foi a que apresentou melhores resultados e foi escolhida para dar continuidade ao trabalho, verificando a possível atividade para fins terapêuticos.

Devido à grande necessidade de busca por novas ferramentas terapêuticas para o tratamento da psoríase que sejam eficazes, seguras e de fácil aceitabilidade pelos pacientes, bem como do conhecimento de que a terapia fotodinâmica é uma técnica em ascensão e aprovada para o tratamento de diversas doenças, espera-se com

este trabalho verificar a possível atividade anti-inflamatória e antipsoriática tópica da Porfirina Di-*cis*-Py<sup>+</sup> quaternizada, visto que a mesma já apresentou resultados prévios em modelos *in vitro*. Além disso, espera-se abrir novas possibilidades para o tratamento clínico dessa enfermidade, que possibilitará um novo tratamento através de composto fotoativo.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 PELE

A pele é maior órgão do corpo humano com uma área aproximada de 1,8 m<sup>2</sup>, cuja função principal é a de barreira, protegendo o meio interno de injúrias provenientes do meio externo, bem como permitindo sua interação com o mesmo. A pele também é responsável por auxiliar na manutenção da homeostase, ao evitar a perda de água e de calor (termorregulação). É muito mais que uma barreira contra os insultos externos, sendo um complexo dinâmico, integrando células, tecidos, promovendo a primeira linha de defesa contra patógenos microbianos. É considerada uma barreira física contra lesões por impacto mecânico e fricção, sensações, reparo e regeneração de feridas e proteção contra raios ultravioleta (GOLDSMITH *et al.*, 2012; PROKSCH, BRANDNER *et al.*, 2008; NESTLE, DI MEGLIO *et al.*, 2009; GROEBER, HOLEITER *et al.*, 2011).

É composta por três camadas diferentes. A camada mais externa é a epiderme, a intermediária é a derme e a mais profunda é a hipoderme (BRAGULLA e HOMBERGER, 2009). As várias camadas da pele desempenham funções diferentes, sendo uma dependente da outra.

#### 2.1.1 Epiderme



A epiderme é a camada mais externa da pele, que está em constante renovação, medindo de 0,4 – 1,5 mm. Ela não possui sistema de irrigação sanguínea direta, sendo nutrida pela permeação dos nutrientes procedentes da derme por capilaridade (GOLDSMITH *et al.*, 2012; BOLOGNIA, JORIZZO *et al.*, 2012)

É constituída por vários tipos celulares: queratinócitos (80 – 85%), melanócitos 10-13 %, 4% de células de Langerhans e 1% de células de Merckel (FREINKEL e WOODLEY, 2001; KOSTER e ROOP, 2004).

A epiderme faz parte do sistema imunológico, envolvendo mecanismos de defesa específicos contra estímulos endógenos ou exógenos. A exposição a qualquer substância nociva ativa o sistema local, incluindo a percepção e a apresentação de antígeno, resultando na migração de células imunocompetentes para dentro da epiderme, a fim de assegurar o reconhecimento do antígeno ou a eliminação do patógeno (NESTLE, DI MEGLIO *et al.*, 2009; BOLOGNIA, JORIZZO *et al.*, 2012 GOLDSMITH *et al.*, 2012).

A epiderme é o compartimento exterior e possui quatro camadas. A camada inferior é o estrato basal, responsável pela proliferação celular dos queratinócitos que se dividem com frequência. Além disso, as células T, principalmente células T CD8<sup>+</sup>, podem ser encontrados no estrato basal e estrato espinhoso. Logo acima, o estrato espinhoso é formado por queratinócitos que são responsáveis pela síntese dos filamentos de queratina (queratinização), interagindo entre eles através dos desmossomos, além da síntese de agentes antioxidantes (glutathione redutase, peroxidase, catalase), citocinas, quimiocinas, entre outros. Logo abaixo está o

estrato granuloso, onde se inicia o processo de cornificação, através do qual as células sofrem apoptose e diferenciam-se em corneócitos. A camada mais externa, o estrato córneo, atua como uma grande barreira à penetração de organismos externos e toxinas, prevenindo também a perda de água (Figura 1 pag. 25). (NESTLE, DI MEGLIO *et al.*, 2009; BOLOGNIA, JORIZZO *et al.*, 2012; GOLDSMITH *et al.*, 2012)

As diferentes camadas podem ser definidas de acordo com o estágio: o de diferenciação e o processo de deposição de queratina, essencial para formação do estrato córneo. A camada basal, onde os queratinócitos são gerados mitoticamente a partir de uma célula mãe; o estrato espinhoso, onde é iniciada a diferenciação; o estrato granuloso, o penúltimo estágio de queratinização; e o estrato córneo onde ocorre o final da diferenciação (KANITAKIS, 2002).

Os queratinócitos são os principais componentes da epiderme, podendo expressar resposta imune e/ou inflamatória através da secreção de citocinas e quimiocinas, metabólitos do ácido araquidônico, componentes do complemento e peptídios antimicrobianos (PERERA, GAYATHRI K., DI MEGLIO, PAOLA *et al.*, 2012). Estão em constante renovação da superfície da epiderme, por meio da atividade mitótica dos queratinócitos. À medida que as novas células vão se formando, as células vão se deslocando em direção à superfície. Ao longo de seu percurso até a superfície, ocorre a diferenciação dos queratinócitos onde começam a acumular filamentos de queratina em seu citoplasma. Esse processo de diferenciação dos queratinócitos é um processo controlado com etapas bem definidas. Após sua geração na camada basal, o queratinócito inicia, na camada

suprabasal, a síntese de diversas proteínas que irão desencadear a queratinização. (BRAGULLA e HOMBERGER, 2009; BOLOGNIA, JORIZZO *et al.*, 2012; GOLDSMITH *et al.*, 2012).

Muitas doenças comuns de pele, como psoríase, feridas cutâneas crônicas, queratose actínica e câncer de pele são causadas por distúrbios no crescimento e maturação dos queratinócitos (GNIADDECKI, 1998; BOLOGNIA, JORIZZO *et al.*, 2012).

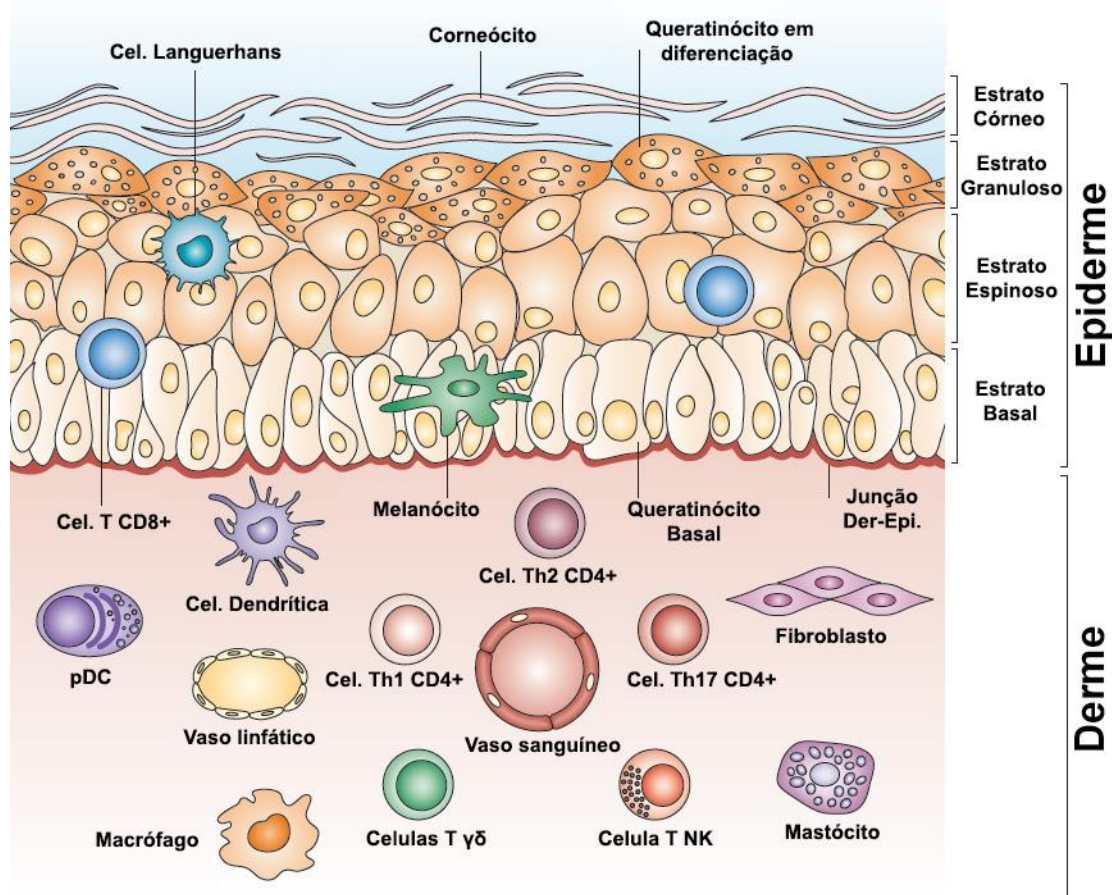
### **2.1.2 Derme**

Logo abaixo da epiderme encontra-se a derme, a qual possui como principal função a ligação da epiderme com o organismo. É formada de tecido conjuntivo, tendo o fibroblasto como sua principal célula, sendo ele o responsável pela síntese de colágeno (KANITAKIS, 2002).

A derme apresenta maior diversidade celular (Figura1 p. 25). Contém várias células especializadas do sistema imune, incluindo células dendríticas (CDs), células T helper (Th) CD4<sup>+</sup> e células T natural killer (NKT) (NESTLE, DI MEGLIO *et al.*, 2009; PERERA, GAYATHRI K., DI MEGLIO, PAOLA *et al.*, 2012).

Estas células fazem parte do sistema imune inato e respondem a estímulos antigênicos de maneira rápida e não específica. Apesar de a maioria não ser célula apresentadora de antígenos, elas são capazes de processar e apresentar antígenos às células T (PERERA, GAYATHRI K., DI MEGLIO, PAOLA *et al.*, 2012). Os queratinócitos também liberam células produtoras de eicosanoides, conjunto de

mediadores lipídicos que regulam reações inflamatórias e imunes, como o produto da ciclooxigenase, prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) e o quimioatraente leucotrieno  $B_4$  ( $LTB_4$ ) de neutrófilos (NESTLE, DI MEGLIO *et al.*, 2009; GOLDSMITH *et al.*, 2012).



**Figura 1.** A pele, suas camadas, estruturas e células residentes do sistema imune.

**Fonte:** Adaptado NESTLE; DI MEGLIO P. *et al.* 2009)

### 2.1.3 Hipoderme

A derme é suportada em sua região inferior pela hipoderme, à camada mais profunda subjacente à pele, constituída de tecido adiposo, ricamente servido por

nervos e vasos sanguíneos. Funcionalmente, a hipoderme ajuda na regulação térmica, proteção no amortecimento de estresse mecânico e depósito nutricional (KANITAKIS, 2002).

## **2.2 Doenças inflamatórias da pele**

As doenças dermatológicas que têm em sua etiologia componentes inflamatórios e/ou imunológicos, nas quais incluem dermatites como a psoríase caracteriza-se por alterações cutâneas que conferem um aspecto desagradável à pele e que necessitam de tratamento prolongado, além de envolver componentes emocionais, que promovem recidivas ou exacerbações das lesões (LJUBOJEVIC, LIPOZENCIC *et al.*, 2002; RUSSELL-JONES, POWELL *et al.*, 2005; WILLIAMS, 2005). Os mecanismos envolvidos na patogênese das doenças inflamatórias cutâneas podem ser distintos, sendo algumas doenças iniciadas por um processo alérgico ou irritativo. Assim, as doenças inflamatórias cutâneas não envolvem necessariamente o mesmo perfil e, conseqüentemente, o mesmo tipo de tratamento (FIRESTEIN, 2004).

## **2.3 Psoríase**

É uma doença inflamatória crônica, que afeta aproximadamente de 2% a 3% da população mundial e que pode apresentar remissão e exacerbação espontâneas. A variação na prevalência e incidência parece ser fortemente influenciada por fatores

climáticos e étnicos, embora o entendimento dessas relações seja ainda bastante complexo (JACOBSON, KUMAR *et al.*, 2011). O aparecimento dos sinais e sintomas é mais comum durante dois períodos da vida: entre os 15 e 25 anos e entre os 50 e 60 anos de idade. Apresenta maior incidência em populações americanas e canadenses (4,6-4,7%) do que em populações africanas e asiáticas (0,4-0,7%) (FEINGOLD e GRUNFELD, 2012).

A psoríase atualmente é reconhecida como uma doença autoimune causada por uma ativação inapropriada do sistema imune celular, sendo caracterizada como uma enfermidade pápulo-escamosa, como consequência da hiperproliferação excessiva dos queratinócitos e da formação de um foco inflamatório. A sua patogenia envolve a integração de leucócitos infiltrados no tecido cutâneo (células T, neutrófilos e mastócitos), células residentes e uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, fatores de crescimento e eicosanoides (NICKOLOFF e NESTLE, 2004; KRUEGER e ELLIS, 2005).

Manifesta-se principalmente por lesões cutâneas e, em alguns casos, apresenta comprometimento das articulações (NESTLE, KAPLAN *et al.*, 2009; FEINGOLD e GRUNFELD, 2012).

As lesões psoriáticas manifestam-se classicamente como placas bem demarcadas, elevadas, eritematosas e cobertas com escamas prateadas sobrepostas. As lesões normalmente apresentam uma coloração acinzentada, sendo bastante comum o desenvolvimento de hiperpigmentação cutânea pós-inflamatória após a remissão das lesões (COHEN, BARON *et al.*, 2012). Geralmente essas lesões aparecem principalmente nos cotovelos, joelhos, couro cabeludo, umbigo e

região lombar; entretanto, em alguns casos, a psoríase se manifesta de forma bastante particular, o que permitiu dividir a doença em diversos tipos. O tipo mais comum que se manifesta como placas clássicas bem delimitadas principalmente nos locais acima citados é a psoríase vulgar, responsável por 90% dos casos da doença (GRIFFITHS e BARKER, 2007).

Os outros tipos são: gutata, pustular, invertida e eritematosa. A psoríase gutata se manifesta por pequenas lesões, de aproximadamente um centímetro, em forma de gotas espalhadas por todo o tronco. A pustular é caracterizada por lesões com pústulas dolorosas especialmente nas mãos e nos pés. A mais severa é a forma eritematosa, que acomete grande parte da superfície corporal por lesões eritemato-escamosas e pode estar associada com sintomas graves como insuficiência cardíaca, representando risco de morte ao paciente. Psoríase ungueal é quando essas lesões acometem as unhas, na qual aparecem depressões puntiformes ou manchas amareladas principalmente nas unhas das mãos (GRIFFITHS e BARKER, 2007; IRLA, NAVARINI *et al.*, 2012; JIN e WANG, 2013; MUMOLI, VITALE *et al.*, 2013).

A psoríase por si só é uma doença complexa que não se manifesta apenas por seus sinais físicos, sendo bastante comum o aparecimento de sintomas psicossociais e emocionais, o que acaba sendo o principal fator causador de prejuízo na qualidade de vida dos pacientes. Muitas vezes as lesões psoriáticas aparecem em locais visíveis, podendo ainda ser acompanhadas de dor ou coceira; os pacientes acabam se incomodando com a impressão que causam ao outro. É comum as pessoas apresentarem problemas de autoestima, depressão, ansiedade e

outras dificuldades psicológicas que acabam por afetar o convívio social e a aceitação própria do paciente. Isso faz com que, apesar de a psoríase não ser uma doença fatal, a diminuição na qualidade de vida seja tão importante quanto à observada em doenças como câncer e doenças cardíacas (BASAVARAJ, NAVYA *et al.*, 2011; OTUKI, REIS *et al.*, 2011).

Assim como outras doenças inflamatórias crônicas, a psoríase apresenta comorbidade com outras doenças crônicas. Diversos estudos clínicos tem relatado uma forte associação entre psoríase e aterosclerose, diabetes tipo 2, síndrome metabólica envolvendo obesidade, dislipidemias e resistência à insulina, e ainda doenças cardiovasculares e distúrbios psicológicos (REICH, 2012).

Pacientes com psoríase podem desenvolver ainda artrite psoriática, uma espondiloartrite caracterizada por inflamação das articulações que geram lesões articulares dolorosas e debilitantes, além das manifestações cutâneas. Essa manifestação articular tem associação com a psoríase e é distinta da artrite reumatóide, sendo normalmente negativa para o fator reumatóide. As estimativas da prevalência da artrite psoriática em indivíduos com psoríase variam desde 6% até 42%, dependendo da população estudada (BOEHNCKE, KIRBY *et al.*, 2013).

### **2.3.1 Imunopatogênese e alterações histopatológicas**

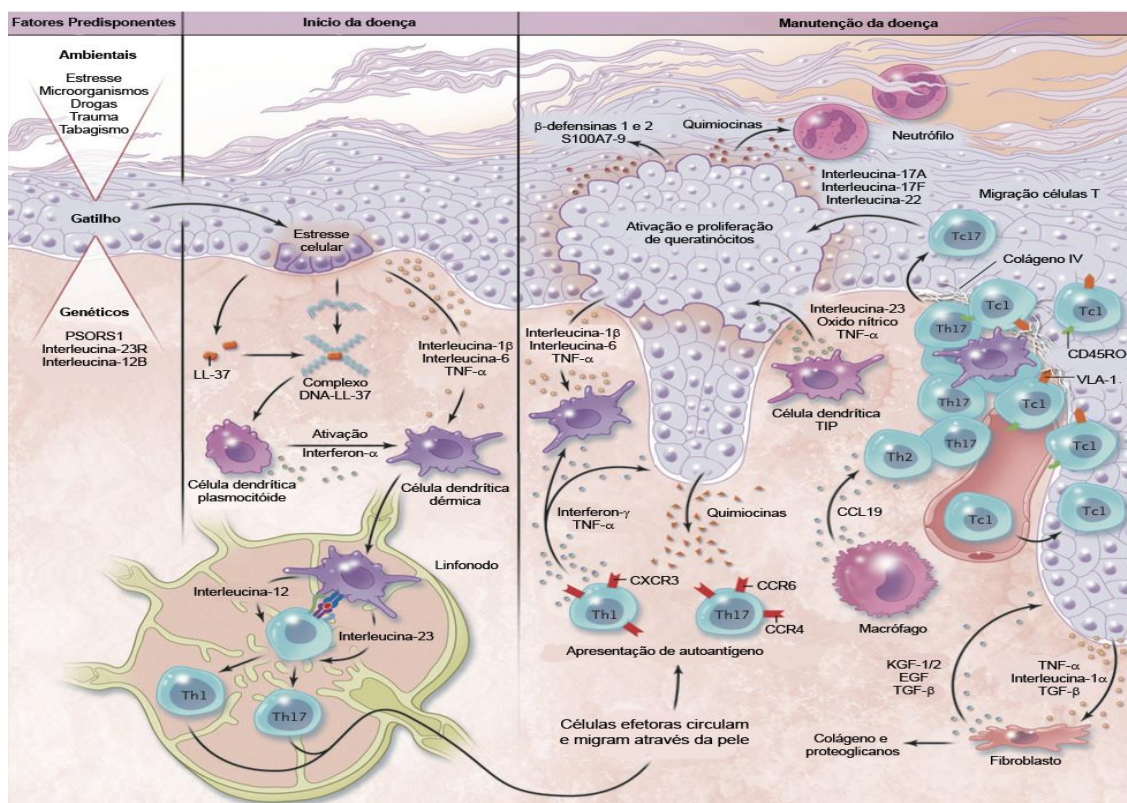
Estudos sobre a resposta imunológica têm permitido uma nova definição da doença, aumentando a compreensão dos processos de regulação da inflamação na psoríase, mesmo que ainda não totalmente elucidados. Desta forma, atualmente há



a certeza de que a quantidade e os tipos de citocinas, bem como os mediadores inflamatórios que são sintetizados na pele lesionada são muito maiores do que se tem admitido (BOWCOCK e KRUEGER, 2005).

Os eventos imunológicos que contribuem para a patogênese da doença envolvem a desregulação de mediadores celulares envolvidos na resposta imune capazes de modificar a estrutura da pele, levando a uma resposta inflamatória prolongada (PERERA, GAYATHRI K., DI MEGLIO, PAOLA *et al.*, 2012).

A psoríase é uma doença mediada por estimulação persistente das células T ativadas, com a participação tanto da imunidade inata quanto da adquirida. Diversos fatores ambientais são capazes de ativar o sistema imune inato através de células residentes como queratinócitos e células dendríticas (CD). Após estímulos, os queratinócitos secretam citocinas como interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), as quais são capazes de ativar as CD (Figura 2 p. 30). Esses estímulos também promovem a liberação de peptídeos antimicrobianos (AMPs), como o peptídeo catelicidina humana (LL-37), levando à formação de um complexo LL-37-DNA, o qual ativa as células dendríticas plasmocitóides e a secreção de interferon  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) por estas. INF- $\alpha$  também ativa células dendríticas mielóides, que por sua vez migram até o linfonodo mais próximo onde ativam linfócitos T, iniciando a ativação do sistema imune secundário (NESTLE, KAPLAN *et al.*, 2009; PERERA, GAYATHRI K., DI MEGLIO, PAOLA *et al.*, 2012).



**Figura 2.** Formação e evolução das placas psoriáticas.

**Fonte:** Adaptado de (Nestle, Kaplan *et al.* 2009).

Após a ativação das células dendríticas, inicia-se a cascata inflamatória, com a diferenciação dos linfócitos e, conseqüente, desenvolvimento da placa psoriática (LIMA EDE e LIMA MDE, 2011). Os principais linfócitos ativados na psoríase são linfócitos T *helper* TCD4+ tipo 1 (LTh1), tipo 17 (LTh17) e linfócitos T citotóxicos TCD8+ tipo 1 (LTc1). Quando ativadas, essas células são capazes de sintetizar e liberar outras citocinas, dentre as quais estão: IL-2, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , além de fator estimulador de colônias de granulócitos e leucócitos (GM-GSF) e fator de crescimento epidérmico (EGF) (NESTLE, KAPLAN *et al.*, 2009; PERERA, GAYATHRI K., DI MEGLIO, PAOLA *et al.*, 2012).

Durante o processo de maturação, as células T produzem novas proteínas de superfície que permitem sua passagem dos vasos para a pele, como o antígeno associado ao linfócito cutâneo (CLA), molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e molécula de adesão de células vasculares (VCAM-1), as quais contribuem para a quimiotaxia de linfócitos T e B, assim como de neutrófilos e macrófagos para a lesão, por ativação do endotélio vascular. Sendo assim, uma vez ativados, os linfócitos migram dos linfonodos para a pele onde ativam CDs e macrófagos, sustentando a ativação do sistema imune inato. As CDs e macrófagos ativados secretam IL-12 e IL-23 que estimulam a proliferação de LTh1 e LTh17, respectivamente, estabelecendo assim, um ciclo vicioso de ativação do sistema imune (NESTLE, KAPLAN *et al.*, 2009; PERERA, GAYATHRI K., DI MEGLIO, PAOLA *et al.*, 2012).

Ocorre a presença de um grande número de CD mielóides na derme psoriática sugerindo que estas células podem desempenhar um papel crítico na psoríase. CDs atuam como células apresentadoras de antígenos e liberam IL-20 que estimula a proliferação dos queratinócitos, e também óxido nítrico o qual promove vasodilatação. Secreta ainda IL-23, responsável pelo aumento da proliferação de LTh17, com conseqüente aumento na produção de IL-22 e IL-6, as quais estimulam a proliferação dos queratinócitos. TNF- $\alpha$  induz a expressão de ICAM-1 dos queratinócitos e de VCAM-1 das células endoteliais, favorecendo e mantendo a diapedese linfocitária e a produção de mediadores pró-inflamatórios e quimioatraentes tais como IL-8, IL-6 e IL-1. Na psoríase, o TNF também é sintetizado em macrófagos, queratinócitos e células de Langerhans intraepidérmicas

e se distribui por toda a epiderme, preferencialmente junto aos vasos sanguíneos da parte superior da derme (NESTLE, DI MEGLIO *et al.*, 2009; NESTLE, KAPLAN *et al.*, 2009; COPPELLOTTI, FABRIS *et al.*, 2012; PERERA, GAYATHRI K., DI MEGLIO, PAOLA *et al.*, 2012).

As CDs provenientes de lesões de psoríase ativam as células T para produzir IL-17 e IFN- $\gamma$ , desse modo regulando positivamente o eixo IL-23/Th17. IL-17 interage com o IFN- $\gamma$  para aumentar a síntese de citocinas pró-inflamatórias pelos queratinócitos, como IL-6 e IL-8, aumentando o influxo de células T na pele, o que contribui para a manutenção da placa psoriática. IFN- $\gamma$  juntamente com TNF e IL-20, ativam os fatores de transcrição envolvidos no processo inflamatório como STAT-1, STAT-3 e fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (PERERA, GAYATHRI K., DI MEGLIO, PAOLA *et al.*, 2012).

Este processo imunológico com a participação de citocinas estimuladoras, como IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$  e a presença de células T entre os queratinócitos, ativa uma hiperproliferação epidérmica caracterizada pelo aumento em duas vezes do número de mitoses e pela redução do ciclo dos queratinócitos em torno de oito vezes, levando a uma maturação incompleta. A síntese de lipídios para a formação dos desmossomos pelos queratinócitos está reduzido devido a um distúrbio da membrana plasmática. Os linfócitos Tc1 (CD8+) agridem o local das lesões psoriáticas pela liberação de citocinas e conseguem penetrar nos espaços intercelulares dos queratinócitos, facilitando o processo inflamatório observado na psoríase (REDIGHIERI, MAIA TDE *et al.*, 2011).

Manifestações histopatológicas incluem renovação das células epidérmicas, resultando em espessamento epidérmico marcante (acantose), com diminuição ou perda do estrato granular, alongamento e engrossamento do estrato córneo (hiperqueratose) e disfunção do processo de cornificação, com queratinócitos contendo núcleo no estrato córneo (paraqueratose) e infiltração atípica de células inflamatórias na epiderme, chegando até a camada córnea. Além disso, o processo de angiogênese é aumentado com a formação exagerada de novos vasos. A proliferação dos queratinócitos é mediada por fatores de crescimento, como fator de crescimento de queratinócitos (KGF) e fator de crescimento transformante (TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ ) (ALBANESI, DE PITA *et al.*, 2007; FEINGOLD e GRUNFELD, 2012).

A formação de escamas e a ruptura da barreira protetora são causadas pela diferenciação anormal dos queratinócitos e pela falha destes em se organizarem normalmente, secretarem lipídios extracelulares e aderirem uns aos outros (LOWES, BOWCOCK *et al.*, 2007). Essas mudanças estão associadas com a expressão alterada de diversos componentes celulares. Na psoríase, a queratina, principal componente dos filamentos intermediários dos queratinócitos, é expressa de forma anormal. Entre as queratinas expressas anormalmente, a queratina 17 (K17) é bastante notável, uma vez que não é expressa normalmente na epiderme saudável, mas é altamente expressa em lesões psoriáticas (FU e WANG, 2012).

### **2.3.2 Tratamentos**

As opções de tratamento tradicionais para a psoríase incluem, para os casos mais leves, terapias tópicas (corticosteroides, análogos da vitamina D e retinóides) e fototerapia (UVB e PUVA), e para casos mais severos, terapias sistêmicas (Metotrexato retinóides e Ciclosporina A). No entanto, todas as terapias existentes possuem algum tipo de limitação (AFIFI, DE GANNES *et al.*, 2005).

A melhor compreensão da imunologia cutânea permitiu grandes avanços em relação ao desenvolvimento de novas terapias e aumentou o arsenal de agentes disponíveis para o tratamento de doenças inflamatórias cutâneas tanto na forma de monoterapia quanto na forma de um esquema terapêutico que inclui diferentes agentes utilizados simultaneamente (SKINNER, 2004).

Embora os estudos em busca da compreensão da psoríase tenham evoluído consideravelmente, a doença não tem cura e os tratamentos utilizados têm o objetivo de modificar a progressão da doença e reduzir os sinais e sintomas (BAKER, COLEMAN *et al.*, 2012). O índice de severidade e área da psoríase (PASI) é a ferramenta utilizada para avaliação da gravidade da doença e leva em consideração o eritema, a espessura e grau de descamação das lesões, bem como a área da superfície corporal envolvida (ABUABARA, WAN *et al.*, 2013).

Dos agentes já em uso na prática clínica, os corticosteroides tópicos ainda são os anti-inflamatórios mais empregados, devido aos seus efeitos sobre a resposta imune e sua ação anti-inflamatória. No entanto, o uso contínuo dos corticosteroides também é, frequentemente, acompanhado de efeitos adversos. Os principais observados são: alterações na pele (atrofia cutânea e diminuição do processo de cicatrização), osteoporose, atrofia muscular/miopatia, glaucoma, alterações do eixo

HPA (hipotálamo-pituitária-adrenal), indução do diabetes e hipertensão (NICKOLOFF e NESTLE, 2004; SCHOEPE, SCHACKE *et al.*, 2006).

O sistema imune como alvo no tratamento de algumas condições dermatológicas e a compreensão do mecanismo de ação destes agentes permitiu a transição da terapia clássica com os corticosteroides tópicos para a terapia com agentes imunomoduladores (NICKOLOFF e NESTLE, 2004; SKINNER, 2004).

O tratamento tópico pode ser utilizado em monoterapia ou de forma combinada, principalmente nas formas leves da psoríase. Já nas formas moderadas a graves, quando associado à fototerapia e/ou à terapia sistêmica, pode acelerar a melhora das lesões e ocasionar maior conforto ao paciente. As substâncias queratolíticas, emolientes e umectantes sempre são incluídas no regime terapêutico, tanto alternadamente com produtos ativos, quanto nas fases assintomáticas ou até mesmo como adjuvantes (MASON, MASON *et al.*, 2013).

Por via tópica também são utilizados análogos da vitamina D, que atuam sobre a resposta imunológica, induzindo a apoptose pela ligação aos receptores de vitamina D (TRÉMEZAYGUES e REICHRATH, 2011). Os inibidores de calcineurina (Pimecrolimo e Tacrolimo) também são muito utilizados por provocarem menos efeitos colaterais do que os corticosteroides e os análogos da vitamina D (AYER e YOUNG, 2013).

O tratamento sistêmico é representado principalmente pelo Metotrexato, retinóides orais e pela ciclosporina. O Metotrexato possui efeitos imunossupressores e também atua na redução da hiperproliferação de queratinócitos, mas seu uso é limitado por causa de sua toxicidade, incluindo complicações no fígado e rins

(BAKER, COLEMAN *et al.*, 2012; MIHELLER, KISS *et al.*, 2013). Os retinóides orais (Acitretina e Isotretinoína) são análogos sintéticos da vitamina A, e são capazes de interferir sobre o sistema imune, diferenciação e proliferação celulares. A ciclosporina é um imunossupressor citotóxico, capaz de reduzir a migração de células T e de neutrófilos (RAUT, PRABHU *et al.*, 2013).

Uma nova geração de agentes terapêuticos, chamados biológicos, derivados da tecnologia de DNA recombinante, tem sido desenvolvida nos últimos anos, porém não se conhece exatamente seus efeitos em longo prazo (TONEL e CONRAD, 2009). Esses agentes nada mais são do que proteínas recombinantes criadas por engenharia genética, incluindo: anticorpos monoclonais, proteínas de fusão ou citocinas humanas recombinantes. Nas duas primeiras categorias, estão incluídos os novos medicamentos já aprovados para o tratamento da psoríase e da artrite psoriática no Brasil. Esses compostos são capazes de bloquear, antagonizar ou neutralizar alvos específicos do processo inflamatório (KIM, WEST *et al.*, 2012). No entanto, como a psoríase é uma doença de natureza crônica, muitos pacientes requerem tratamento por um período muito longo e o alto custo do tratamento é o que pode limitar seu uso (AHN, GUSTAFSON *et al.*, 2013; GARCIA-PEREZ, STEVANOVIC *et al.*, 2013).

Numerosos outros agentes biológicos estão disponíveis e são classificados em três classes: agentes anti-células T (Efalizumab e Alefacept), agentes anti-TNF (Infliximab, Adalimumab e Etanercept) e agentes anti-interleucina 12/23 (Ustekinumab) (BAKER, COLEMAN *et al.*, 2012).



Novas drogas estão em desenvolvimento para o tratamento de pacientes com psoríase, anti-TNF- $\alpha$ , anti-IL-17 e anti-IL 12/23. Entretanto, a minimização da toxicidade e aumento do custo/benefício das terapias antipsoriáticas ainda representam um grande desafio clínico em termos de tempo, custos e inconveniente (GARCIA-PEREZ, STEVANOVIC *et al.*, 2013; PALFREEMAN, MCNAMEE *et al.*, 2013).

A fototerapia é uma opção terapêutica indicada de forma isolada ou em associação com agentes tópicos e/ou sistêmicos, com o objetivo de controlar a doença ou diminuir a dose dos medicamentos associados. Essa terapia possui ações anti-inflamatória e imunossupressora, além de ser capaz de diminuir a proliferação celular (WONG, HSU *et al.*, 2013). Pode ser utilizada com UVB de banda estreita (UVB-NB) ou com PUVA, que consiste na associação de Psoraleno e radiação UVA (320-400 nm) (LAPOLLA, YENTZER *et al.*, 2011).

A terapia fotodinâmica com a combinação de porfirina e irradiação de luz visível 400-800nm (maior comprimento de onda em relação à UVA) parece representar uma alternativa com menor risco cancerígeno, além de ter melhor penetração na pele (SERRA, ZAMARRON *et al.*, 2010).

## **2.4 Terapia Fotodinâmica (TFD)**

A luz tem sido empregada desde a antiguidade no tratamento de doenças. Por 3000 anos é utilizada pelos humanos, conhecida no Egito, Índia e China (DANIELL e HILL, 1991).

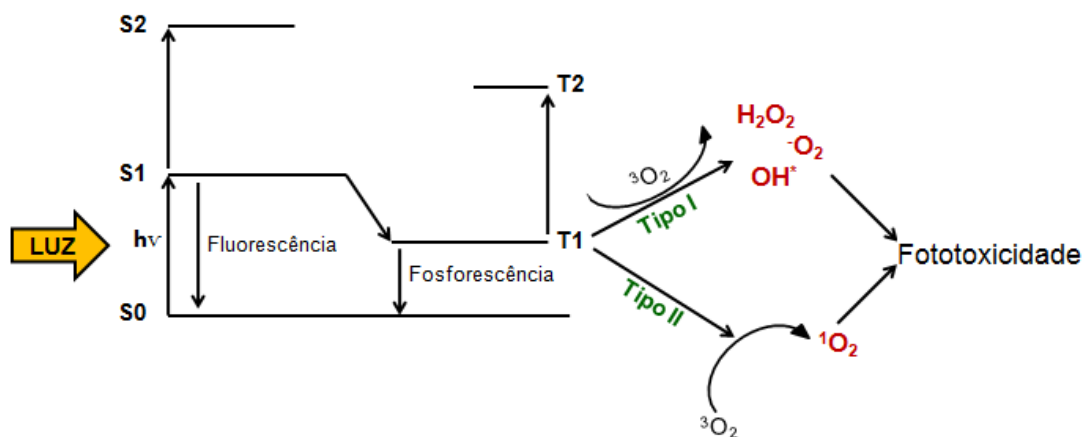
A terapia fotodinâmica é uma técnica em ascensão já aprovada para o tratamento de diversas doenças, tendo como mecanismo baseado na citotoxicidade das células proliferativas, onde uma reação química, ativada pela energia da luz, é utilizada para seletivamente destruir o tecido. (BADER, STEPP *et al.*, 2013).

Esse processo é baseado na combinação de três componentes: fotossensibilizador que se acumula nas células; oxigênio molecular tecidual e fonte de luz com comprimento de onda adequado que coincida com o espectro de absorção deste agente utilizado. Esta ativação pela luz ocorre na presença de oxigênio e faz com que o agente fotossensibilizador passe de um estado de repouso para um estado de ativação denominado singlete. Sendo assim, a reação fotoquímica resultante é capaz de iniciar uma sequência de eventos fotoquímicos e fotobiológicos levando à destruição do tecido-alvo com a morte celular através produção de oxigênio singlete (BABILAS, *et al.* 2010 ; DANIELL e HILL, 1991; DARLENSKI e FLUHR, 2013).

Durante a fotossensibilização, o oxigênio se alterna entre diferentes estados eletrônicos: estados singlete S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub> e estados triplete T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub>, que surgem como consequência da mecânica quântica do spin eletrônico (Figura 3 pg. 39). O estado de excitação singlete possui uma meia vida curta (cerca de 6 a 10 segundos) e, nesta etapa, as moléculas podem retornar ao estado de repouso liberando energia na forma de fluorescência ou progredir para um estado de meia vida longa chamado triplete, responsável por espécies fotoativas na geração de produtos citotóxicos. O estado triplete sofre dois tipos de reação. Na reação tipo I, o fotossensibilizador no estado triplete excitado interage com moléculas de oxigênio, dando início a reações

fotoquímicas que originarão uma mistura complexa de espécies reativas de oxigênio, há geração de radicais livres extremamente reativos (SLOMP, 2012).

São dois tipos de reações que ocorrem na terapia fotodinâmica. A reação do Tipo I é quando o oxigênio reage diretamente, quer com o substrato, quer com a membrana celular ou uma molécula, transferindo um átomo de hidrogênio para radicais de formulário; os radicais interagem com o oxigênio para produzir produtos oxigenados ( $^1\text{O}_2$ ). Alternativamente na reação Tipo II, o sensibilizador ativado pode transferir sua energia diretamente para o oxigênio, para formar oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) - uma espécie de oxigênio altamente reativa (BOLOGNIA; JORIZZO, *et al.* 2012).



**Figura 3.** Terapia Fotodinâmica  
Fonte: SLOMP, 2012.

As moléculas interagem com substratos biológicos para formar espécies reativas, como os radicais superóxido, hidroxila e peróxido, reação esta comum no tratamento que envolve o 8-metoxipsoraleno e UVA, e não necessita de oxigênio. A reação típica da TFD é a reação tipo II. O mesmo fotossensibilizador no estado

tripleto excitado transfere a sua energia ao oxigênio no seu estado fundamental, levando à produção de oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ), que provocará a destruição do tecido irradiado. Devido às reações de transferência de energia serem mais rápidas do que as reações de transferência de elétrons, o mecanismo tipo II é geralmente favorecido nas reações de foto-oxidação. Isso se dá quando há geração de oxigênio singleto onde as moléculas transferem sua energia para o oxigênio intracelular formando oxigênio singleto altamente reativo e responsável pela morte celular (BOLOGNIA; JORIZZO, *et al.* 2012).

Os dois tipos de reação podem ocorrer simultaneamente. O tripleto é o estado fundamental e estável da molécula, encontrado, preferencialmente, em qualquer célula, e é pouco reativo, enquanto que o oxigênio singleto reage facilmente com outras substâncias (TOREZAN, 2009; WONG, HSU *et al.*, 2013).

Como o tempo de vida do oxigênio singleto é muito curto ( $\sim 2 \mu\text{s}$ ) e a distância que alcança na célula não ultrapassa 0,01 – 0,02 mm, esta espécie reage no seu sítio de formação. O dano gerado é limitado ao local de concentração da molécula do fotossensibilizador, sendo essa uma das principais vantagens da terapia fotodinâmica. As principais biomoléculas que sofrem ação do oxigênio singleto gerado são os lipídeos insaturados e ácidos nucleicos, tendo como os principais alvos na célula a mitocôndria, membrana plasmática, complexo de Golgi, lisossomos, endossomos e retículo endoplasmático, indicando que uma das principais ações das reações foto-oxidativas são as alterações na permeabilidade celular, provocando a morte do tecido por necrose ou apoptose (CASTANO, MROZ *et al.*, 2006; CHATTERJEE, FONG *et al.*, 2008; PENG, LAI *et al.*, 2010).

A TFD foi planejada para causar uma reação citotóxica no tecido, entretanto, ocorre uma resposta pós-TFD envolvendo reação imune inflamatória inata e adaptativa para auxiliar na erradicação bem sucedida de células residuais (WONG, TRACY *et al.*, 2003; WONG, HSU *et al.*, 2013).

Para atingir a eficácia da terapia fotodinâmica o comprimento de onda de absorção do fotossensibilizador é um importante parâmetro a ser considerado. Normalmente na pele, a intensidade de absorção da luz diminui com a profundidade das camadas cutâneas. A penetração da luz em 630 nm se dá em cerca de 2 e 3 mm e aumenta para 5 a 6 mm com comprimento de onda mais longo (700 – 800 nm). Geralmente a luz é capaz de ativar no intervalo entre 600 e 800 nm. Comprimentos de onda mais curtos têm menor penetração em tecidos e são mais suscetíveis de induzir fotossensibilidade cutânea. Comprimentos de onda acima do limite de 900 nm podem penetrar profundamente na pele, além de gerar uma energia que não é suficiente para produzir oxigênio singlete (MELLISH, COX *et al.*, 2002; TAYLOR e GONZALEZ, 2009; CALZAVARA-PINTON, ROSSI *et al.*, 2012).

A terapia fotodinâmica é uma perspectiva no tratamento de diversas patologias como opção de tratamento. Tem-se observado um grande interesse na aplicação desta técnica na dermatologia, com indicação para tratamento de tumores e atualmente está sendo empregada no tratamento de doenças inflamatórias como na psoríase, na acne, hiperplasia sebácea, entre outras (CASTANO, MROZ *et al.*, 2006; DARLENSKI e FLUHR, 2013).

## **2.5 Fotossensibilizador**

Fotossensibilizadores são compostos químicos que, ao absorverem luz, provocam alterações químicas ou físicas em outra substância química. O fotossensibilizador ideal para terapia fotodinâmica precisa atender alguns critérios como: estabilidade química, solubilidade em água, alto rendimento quântico de geração de  $^1\text{O}_2$ , não ser citotóxico no escuro, ter uma seletividade tecidual, eliminação rápida e elevado coeficiente de absorção no comprimento de onda (600-800nm) para penetrar nos tecidos mais profundos (YANO, HIROHARA *et al.*, 2011).

Diversos fotossensibilizadores têm sido estudados para tratamento de doenças como a psoríase, acne, lúpus, câncer de pele, além de diversas outras doenças oncológicas e não-oncológicas (BABILAS, SCHREML *et al.*, 2010; FILIP, CLICHICI *et al.*, 2011).

### **2.5.1. Porfirina**

Os fotossensibilizadores mais amplamente estudados são as porfirinas, que são uma classe de compostos macrocíclicos amplamente encontrados na natureza, com enorme variedade de funções, desempenhando papel essencial no metabolismo de organismos vivos. São muito utilizadas na terapia fotodinâmica como agentes fotossensibilizados por possuir estabilidade química e fotoquímica (BIESAGA, PYRZYNSKA *et al.*, 2000).

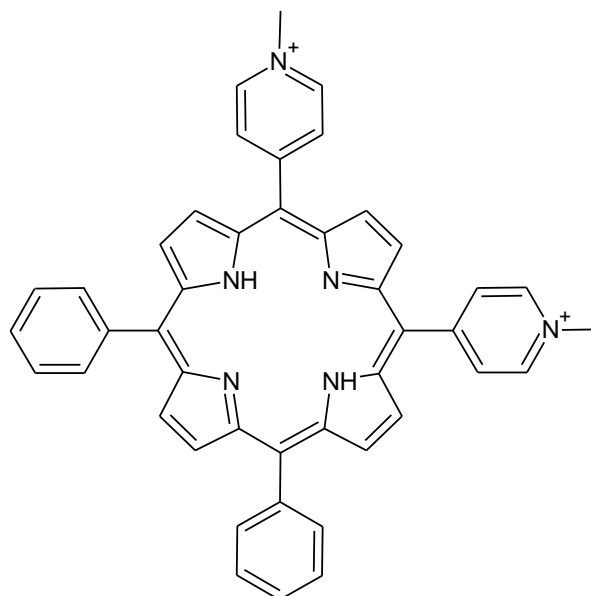
Sua versatilidade é uma das características mais interessantes, sendo possível associar outros substituintes em um ou mais dos quatro átomos de carbono

participantes das ligações metálicas dos anéis pirrólicos, a fim de melhorar a eficácia do fotossensibilizador (BIESAGA, PYRZYNSKA *et al.*, 2000; BERG, SELBO *et al.*, 2005).

O primeiro fotossensibilizador a ser aprovado para o tratamento de vários tipos de câncer é uma preparação semi-purificada de porfirinas para uso injetável, comercialmente conhecida como Photofrin®. Sua primeira licença para uso clínico em terapia fotodinâmica foi no Canadá, em 1993, para o tratamento de varizes esofágicas e câncer de bexiga, e desde então tem sido extensivamente descrito e estudado. Atualmente já tem aprovação para uso clínico em países como Japão, Alemanha e Reino Unido, e tem indicação para diversas outras doenças além das já citadas, como o câncer de pulmão e neoplasias de cabeça e pescoço. Esse medicamento apresenta algumas desvantagens, como a baixa seletividade, a necessidade de grandes quantidades de droga para se obter uma boa eficiência e a elevada fotossensibilidade cutânea, a qual pode durar até seis semanas (ALLISON e MOGHISSI, 2013; NOKES, APEL *et al.*, 2013).

Após o Photofrin®, outros fotossensibilizadores foram aprovados para uso em terapia fotodinâmica, os quais usualmente se baseiam na estrutura porfirínica. O Visudyne®, um derivado monoacídico de uma benzoporfirina (BPD-MA), é outro fotossensibilizador já aprovado, sendo indicado para degeneração macular da retina. O Levulan® (ácido aminolevulínico), indicado para aplicação em queratose actínica, é um pró-fármaco precursor de porfirina (SUN e LEUNG, 2002; HONIGSMANN, 2013).

A porfirina utilizada no estudo Di-*cis*-Py+ (Figura 4) é uma molécula catiônica.



**Figura 4.** Iodeto de 5,10 -difenil – 15,20 (N-metilpiridino-4-il) porfirina (Di-*cis*-Py<sup>+</sup>).

A procura por novos fotossensibilizadores ideais é grande; o mesmo precisa apresentar uma toxicidade intrínseca baixa ou ausente, a região de absorção precisa permitir a penetração da droga no tecido, deve ser seletivo para o tecido alvo e, assim, permitir que ocorra a fotoatividade nos alvos intracelulares.

Apesar disso, essa abordagem ainda não atingiu os efeitos terapêuticos ideais devido às limitações dos fotossensibilizadores atuais, o que incentiva a busca por novos agentes. Para determinar a eficácia desses novos agentes para o uso clínico, é necessário primeiramente conhecer seu comportamento *in vitro* em células saudáveis. Os queratinócitos, sendo um dos tipos celulares com participação importante na resposta imune e no processo de cicatrização da pele, comumente são as células de escolha para avaliar a proliferação e a viabilidade celular em tratamentos *in vitro* com fotossensibilizadores.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos do derivado porfirínico Iodeto de 5,10 -difênil – 15,20 (N-metilpiridino-4-il) porfirina (Di-*cis*-Py+) em modelo *in vitro* e modelos animais, como uma possível abordagem terapêutica na psoríase.

#### 3.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar se o fotossensibilizador porfirina Di-*cis*-Py+ apresenta atividade somente após a fotoativação;
- ✓ Avaliar a ação da Di-*cis*-Py+ na viabilidade celular em linhagem de queratinócitos (HaCaT);
- ✓ Verificar a ação anti-inflamatória da Di-*cis*-Py+ no modelo de edema de orelha induzido por 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA) em camundongos, através da espessura da orelha, atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), análise histológica e citocinas.
- ✓ Verificar ação da Di-*cis*-Py+ em parâmetro inflamatório no modelo por múltipla aplicação de óleo de cróton, através de espessura da orelha, MPO, NAG, histologia e níveis de citocinas.

✓ Avaliar a ação da Di-*cis*-Py+ na hiperproliferação celular induzida no modelo por múltipla aplicação de óleo de cróton, através de imunohistoquímica e Western Blott.

✓ Verificar a possível ação via sistêmica da Di-*cis*-Py+.

✓ Verificar a possível interação da Di-*cis*-Py+ com os receptores glicocorticoides

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Drogas e Reagentes

Para a execução dos protocolos experimentais foram utilizados: etanol absoluto, polietilenoglicol 400, peróxido de hidrogênio, acetato de sódio, Tween 20, cloreto de sódio, hematoxilina, eosina, xilol, molibdato de sódio, glicerol, glicina, metanol, fosfato de sódio, cloreto férrico, sacarose, dextrana, 4-2-hidroxietilpiiperazina-1 (HEPES), Triton X-100, ácido fosfomolibdico, Tris-HCl (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil); acetona, fenol, dimetilformamida, citrato de sódio, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), formaldeído, ácido acético glacial, Entellan e parafina (Merck Biosciences, Alemanha). Dexametasona, óleo de cróton, 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA), mifepristona, hexadeciltrimetilamônio (HTAB), tetrametilbenzidina (TMB), p-nitrofenil- N-acetil- $\beta$ -D-glicosamina (NAG), fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), aprotinina, albumina de soro bovino (BSA), Ditiotreitól (DTT), 1,4-bis(5-fenil-2-oxazolil)benzeno (POPOP), 2,5-Difeniloxazol (PPO), brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), gelatina, bálsamo do Canadá e cloreto de benzetônio (Sigma-Aldrich Co., USA). Cetamina e xilazina (Syntec, Cotia, Brasil). Anticorpo policlonal anti-PCNA (sc- 9857), anticorpo secundário conjugado à peroxidase (HRP – horseradish peroxidase, sc-2020) (Santa Cruz Biotechnology®, EUA), kit substrato diaminobenzidina (DAB) para peroxidase (BD Biosciences harmigen®, EUA). Meio dulbecco mem (DMEM), soro fetal bovino (SFB), tripsina

(Cultilab, Campinas, Brasil) e estreptomicina/penicilina (Gibco, Life Technologies Corporation, USA), DMSO (Sigma).

## **4.2 Fotossensibilizador**

A Porfirina di-*cis*-piridil quaternizada (Di-*cis*-Py<sup>+</sup>) utilizada no estudo foi sintetizada pelo grupo de pesquisa coordenado pelos professores Dr<sup>a</sup>. Sandra Mara Woranovicz Barreira e Dr. Alan Guilherme Gonçalves (Departamento de Farmácia-UFPR).

Sua estrutura está representada na Figura 4 pg.43.

## **4.3 Tratamentos com fotossensibilização**

Para todos os tratamentos com luz tanto, *in vitro* quanto *in vivo*, a luz foi incidida no comprimento de onda entre 400 e 800 nm (fornecido pela LumaCare LC-122A – Figura 5), intensidade de 100 mW/cm<sup>2</sup>. Este valor foi determinado através da compilação dos dados publicados em outros trabalhos na área, bem como pela validação da intensidade no laboratório que forneceu a Di-*cis*-Py<sup>+</sup>.



**Figura 5.** Lâmpada LUMACARE LC-122A, utilizada nos tratamentos para incidência de luz.

#### **4.4 Cultivo celular**

Foram utilizados queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT), cultivados no Laboratório de Farmacologia da Inflamação, Dor e Febre, do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Estas células foram armazenadas em nitrogênio líquido e crioprotegidas por DMSO (Sigma). O descongelamento foi realizado em banho-maria à 37°C por dois minutos. Em seguida, as células foram transferidas para um tubo de centrifugação contendo 10 mL de meio Dulbecco MEM (DMEM - CINTILAB), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB – Cultilab) e 1% estreptomicina-penicilina (GIBCO). Esta mistura foi centrifugada a 1300 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi aspirado e o precipitado de células ressuspensionado em 1 mL de DMEM suplementado com 10% SFB. A suspensão de células resultante foi transferida para um frasco de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> contendo 10 mL de DMEM suplementado com 10% SFB, e mantidas em estufa à temperatura de 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de

CO<sub>2</sub>. O crescimento celular foi monitorado em microscópio invertido e o meio de cultura trocado a cada 1-2 dias, conforme o tempo de duplicação celular.

Ao atingir confluência de aproximadamente 80%, o meio foi removido e as células lavadas com solução 0,05% de EDTA. Após serem lavadas, as células foram incubadas por 10 minutos a 37°C com a solução de EDTA a 0,05%. Os queratinócitos foram então desaderidos com o auxílio da solução de tripsina / EDTA 1:250 (CULTILAB) durante aproximadamente 5 minutos. Em seguida, a tripsina foi inativada com DMEM acrescido de SFB e as células em suspensão foram centrifugadas a 1300 rpm durante 5 minutos. Após retirar o sobrenadante, as células foram ressuspensas em 1 mL de DMEM.

Antes do plaqueamento, foi retirada uma alíquota de 10 µL para avaliação da viabilidade celular e contagem de células. As células foram contadas em câmara de Neubauer.

Foi adotada a densidade de  $7 \times 10^3$  para células viáveis por garrafa, as quais foram mantidas estufa umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C até o momento dos experimentos posteriores.

#### **4.5 Ensaio de viabilidade celular**

A viabilidade celular, após o tratamento com diferentes concentrações de Di-cis-Py+, foi determinada através do ensaio colorimétrico MTT - brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio.

O ensaio de viabilidade celular através do método do MTT foi realizado de acordo com Tada e cols. (1986), com algumas modificações (TADA, SHIHO *et al.*, 1986). O fundamento é que, quando a célula está viável, a atividade da desidrogenase mitocondrial faz com que seja formado um complexo com o MTT (formazan), possibilitando a leitura através da análise colorimétrica. Foram plaqueadas em placas de 96 poços  $7 \times 10^3$  células/poço. Após 24 h, o meio foi removido, lavado 2 vezes com PBS e as diversas concentrações preparadas em meio DMEM (1% SFB) foram adicionadas. Após 24 e 96 h (ensaios distintos), o meio foi removido, os poços foram lavados com PBS e a solução de MTT (0,5 mg/mL) foi adicionada em cada poço (200  $\mu$ L). Após 4 h, a solução de MTT foi removida e 200  $\mu$ L de etanol 70° foi adicionado em cada poço. A absorbância foi lida a 570 nm em um leitor de microplacas (EL808B, BioTech Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

#### **4.6 Estudos de fotoativação *in vitro***

Para os testes *in vitro*, as células HaCaT foram plaqueadas (200  $\mu$ L/poço) em placas de 96 poços de fundo chato estéril (Corning) com  $7 \times 10^3$  células por poço. As células foram pré-incubadas por 24 horas em estufa umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após as 24 horas, as células foram tratadas com 200  $\mu$ L por poço com diferentes concentrações da Di-*cis*-Py+ (0,01 a 10  $\mu$ M) diluídas em DMEM com apenas 1% de SFB, a fim de controlar seu crescimento exponencial durante os ensaios. Um grupo controle foi adicionado a cada placa, recebendo apenas meio (DMEM com 1% de SFB).

As células foram incubadas com diferentes concentrações da Di-*cis*-Py+ por 4 horas (SERRA *et al.*, 2010). Logo em seguida as células receberam a incidência de luz, por determinado(s) tempo(s), de acordo com o tratamento aplicado.

#### **4.6.1 Tratamento sem luz (fotoativação)**

Para avaliar a citotoxicidade da Di-*cis*-Py+, as células HaCat foram inicialmente submetidas a experimentos no escuro. Para isso, as concentrações (0,01 - 10  $\mu$ M) da Di-*cis*-Py+ foram aplicadas nas células e incubadas por 28 horas na ausência de luz, esse tempo foi o mesmo que as células ficaram em contato com a Di-*cis*-Py+ nos experimentos com fotossensibilização. Após 28 horas de incubação, o composto foi removido e a viabilidade celular avaliada.

#### **4.6.2 Tratamento com luz (fotoativação) nos tempos de 10, 20 e 30 minutos**

As células aderidas em placas com 96 poços foram incubadas com a Di-*cis*-Py+ nas concentrações de 0,01 a 1  $\mu$ M durante 4 horas na ausência de luz. Após o tempo de incubação, nos tempos de 10, 20 e 30 minutos foi incidido a luz com comprimento de onda entre 400 e 800 nm (lâmpada LumaCare LC-122A), na intensidade de 100 mW/cm<sup>2</sup>, e incubadas por 24 horas na ausência de luz. Após esse tempo o composto foi removido e a viabilidade celular avaliada.



#### **4.7 Animais**

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos Swiss fêmeas (25-35 g) proveniente do Biotério Central do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba (PR). Todos os animais foram mantidos em temperatura de  $22 \pm 2$  °C, respeitando o ciclo claro/escuro de 12 horas, com livre acesso à água e ração. Antes do início de cada experimento os animais foram mantidos no laboratório por um período de pelo menos 48 horas para aclimatação; os mesmos não foram reutilizados em experimentos posteriores. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as orientações estabelecidas para os cuidados com animais de laboratórios, segundo normas do COBEA. O presente projeto foi submetido à avaliação do comitê de ética em experimentação animal do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, sob o CEUA nº 736.

#### **4.8 Edema de orelha**

O modelo de indução de edema de orelha em camundongos é utilizado em estudos sobre processo inflamatório cutâneo.

Esta metodologia é empregada inicialmente com o objetivo de verificar a formação de edema induzido pelo agente flogístico e, posteriormente, analisar outros parâmetros relacionados ao processo inflamatório, a partir da retirada de amostras teciduais (círculos de 6 mm de diâmetro da orelha do camundongo) após a eutanásia. O edema de orelha foi expresso como o aumento da espessura da orelha

dos camundongos em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ). A espessura da orelha foi medida antes e após a indução do processo inflamatório com a utilização de um micrômetro digital (Electronic Outside Micrometer DIGIMESS 0,25 mm - 0,001 mm). A medida foi realizada próxima à extremidade medial da orelha direita, calculando-se a espessura através da diferença entre a medida inicial (basal) e a medida feita após a aplicação do agente flogístico. Para minimizar variações de medida na técnica, os experimentos foram realizados por um único experimentador.

Para aplicação dos agentes flogísticos, assim como o tratamento com a droga de referência dexametasona ou a Di-*cis*-Py+, as substâncias foram solubilizadas em acetona e dissolvidas em um volume de 20  $\mu\text{L}$  e então administradas por via tópica na face interna da orelha direita de cada animal (OTUKI, VIEIRA-LIMA *et al.*, 2005).

Para os agentes flogísticos, dexametasona e a Di-*cis*-Py+, a acetona foi utilizada como veículo. Os seguintes grupos foram divididos: (Naive) animais que não receberam qualquer tratamento; (Veículo) animais que receberam acetona apenas; (Controle) animais que foram estimulados com agentes flogísticos mas não foram tratados com a Di-*cis*-Py+; (Porfirina) animais tratados com diferentes doses da Di-*cis*-Py+; (Dexametasona) animais tratados com dexametasona na dose de 0,05mg/orelha, utilizada como fármaco de referência, após a indução com agente flogístico.

#### **4.8.1 Edema de orelha agudo induzido pela aplicação de TPA**

Um dos constituintes ativos presente no óleo da *Croton tiglium* L. é o 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). A aplicação tópica de ésteres de forbol, como o TPA, na forma aguda, induz uma resposta de inflamação cutânea, e quando aplicado repetidas vezes nos animais induz uma resposta hiperproliferativa, assemelhando-se, sob muitos aspectos, aos sinais de algumas doenças de pele como a psoríase (GABOR, 2000).

Assim o processo inflamatório cutâneo foi induzido pela aplicação tópica de TPA (2,5 µg) na orelha direita de camundongos em um volume de 20 µL de acetona (0,125 mg/mL). A Di-*cis*-Py+ em diferentes doses (0,01 - 0,3 mg/orelha), assim como a droga de referência dexametasona (0,05 mg/orelha), foram aplicados na orelha dos animais em seguida a aplicação do TPA nos grupos experimentais. Logo após a administração dos tratamentos, a luz foi incidida durante 20 minutos a 100mW/cm<sup>2</sup>. A espessura da orelha foi verificada antes (basal) e 6 horas após a indução do processo inflamatório (DE YOUNG, KHEIFETS *et al.*, 1989). Após 6 ou 24 horas, os animais foram eutanasiados e amostras teciduais das orelhas (6mm) foram coletadas e submetidas a avaliação dos níveis de citocinas, à análise histológica e avaliação da enzima mieloperoxidase (MPO).

Para controle dos experimentos onde a Di-*cis*-Py+ recebeu a fotoativação todos os outros grupos do experimento foram anestesiados e receberam a incidência de luz durante 20 minutos a 100mW/cm<sup>2</sup>.

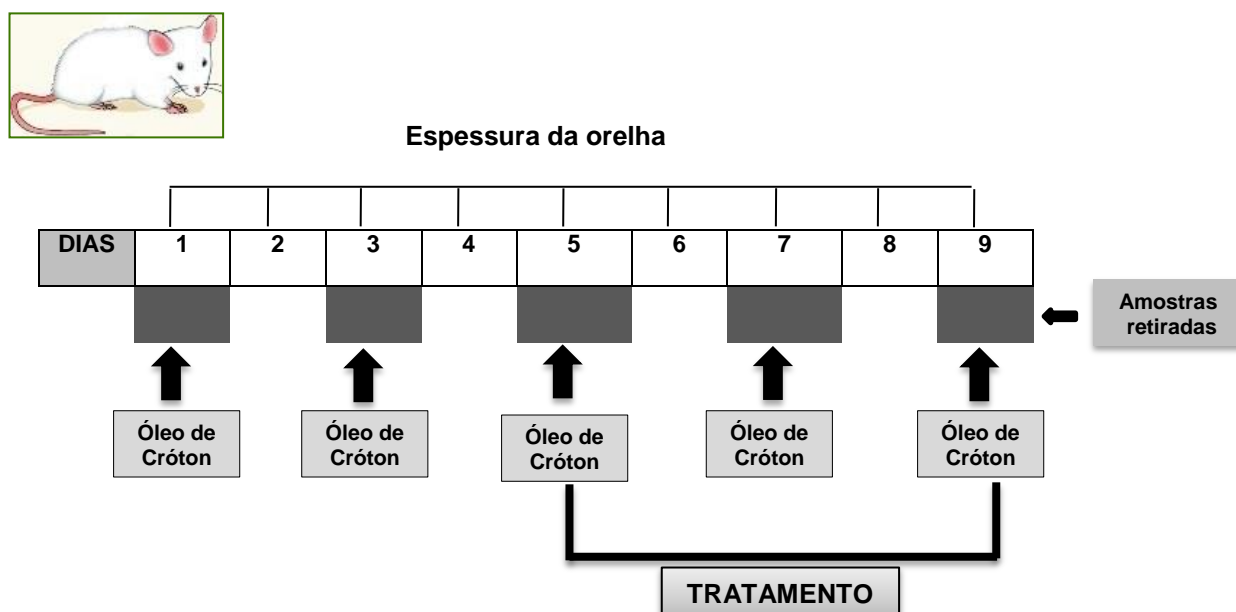
#### 4.8.2 Modelo de edema induzido por múltiplas aplicações de óleo de cróton

Para avaliar o efeito anti-inflamatório cutâneo pré-estabelecido e a atividade antiproliferativa da Di-*cis*-Py+, foi utilizado o modelo por múltipla aplicação de óleo de cróton, o qual promove um processo inflamatório cutâneo com parâmetros que se assemelham a características de doenças inflamatórias crônicas, mimetizando aspectos clínicos e histopatológicos de psoríase. A inflamação da pele neste modelo é persistente e tem sido útil para avaliar se os compostos aplicados são capazes de reverter ou proteger uma lesão inflamatória existente (DE VRY, VALDEZ *et al.*, 2005). Dessa forma, a Di-*cis*-Py+ foi avaliada frente a um processo inflamatório já estabelecido.

O processo inflamatório foi estabelecido após múltiplas aplicações de óleo de cróton (0,4 mg/orelha em 20 µL de acetona) em dias alternados durante 9 dias. O tratamento com Di-*cis*-Py+ (0,1 mg/orelha) e dexametasona (0,05 mg/orelha), teve início a partir do quinto dia de experimento sendo aplicado por via tópica cada 24 hora, durante 4 dias consecutivos. Logo após a administração dos tratamentos a luz foi incidida durante 20 minutos a 100mW/cm<sup>2</sup>, a espessura da orelha foi avaliada 6 e 24 horas após a aplicação (Figura 6 p. 56) (STANLEY, STEINER *et al.*, 1991).

No 9º dia de experimento os animais foram eutanasiados e amostras teciduais (6mm) das orelhas foram coletadas, pesadas e submetidas à avaliação dos níveis de citocinas, atividades de mieloperoxidase (MPO), n-acetil-β-D-glucosaminidase (NAG) e fixadas para avaliação histológica bem como para determinação dos níveis de expressão da proteína PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular).

Para controle dos experimentos onde a Di-cis-Py+ recebeu a fotoativação todos os outros grupos do experimento foram anestesiados e receberam a incidência de luz durante 20 minutos a  $100\text{mW}/\text{cm}^2$ .



**Figura 6.** Delineamento experimental do modelo de edema induzido por múltiplas aplicações de óleo de cróton

#### 4.9 Ensaio da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO)

A atividade da enzima MPO é utilizada como indicativo da presença de leucócitos polimorfonucleares no tecido inflamado. Para a avaliação da atividade da enzima MPO foi utilizada a metodologia de Bradley e colaboradores (1982) modificada por De Young e colaboradores (1989). As amostras de tecido (círculos de 6 mm de tecido) das orelhas dos camundongos submetidos ao modelo agudo e

modelo por múltipla aplicação foram pesadas e adicionadas a 0,75 ml de tampão fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4), contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTBA) e homogeneizadas por 45 s a 0°C. O homogenato foi decantado em microtubos e adicionado a 0,75 ml de tampão fosfato (anteriormente descrito). As amostras (1,5 ml) foram colocadas em microtubos e centrifugadas a 11.200 x g a 4 °C por 20 min. Triplicatas de 30 µl do sobrenadante foram colocadas em placas de 96 poços, adicionando 200 µl de uma mistura contendo 100 µl de tampão fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4), 85 µl de PBS 0,22 M (pH 5,4) e 15 µl de peróxido de hidrogênio 0,017% em cada poço. A adição de 20 µl de tetrametilbenzidina.HCl (TMB) 18,4 mM dissolvida em uma solução aquosa de dimetilformamida a 8%, promove o início da reação. Posteriormente a placa foi incubada a 37°C por 3 min, adicionando 30 µl de acetato de sódio 1,46 M (pH 3,0) em cada poço para interromper a reação. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando leitor de placas (Bio-Tek Multi-Mode Microplate reader Synergy HT) cuja leitura da absorbância será feita a 620 nm, sendo expressa em mDO/amostra.

#### **4.10 Ensaio da atividade enzimática da N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG)**

A avaliação da atividade da enzima NAG é utilizada como indicativo da presença de leucócitos mononucleares e foi realizada, assim como a MPO, a partir de amostras de orelhas de camundongos oriundas do modelo da múltipla aplicação de óleo de cróton (SANCHEZ e MORENO, 1999). As amostras de tecido (círculos de 6

mm de tecido da orelha dos camundongos) foram adicionadas a 750  $\mu$ L de solução de fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4) contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) e homogeneizado por cerca de 45 s a 0°C. O homogenato foi decantado em microtubos e foram adicionados 750  $\mu$ L do tampão anteriormente descrito. As amostras (1,5 mL) foram adicionadas em microtubos e centrifugadas a 12000 x g a 4°C por 15 min. Triplicatas de 25  $\mu$ L do sobrenadante foram colocadas em placas de 96 poços e posteriormente foi adicionado 100  $\mu$ L de tampão citrato 50 mM (pH 4,5). A reação foi iniciada pela adição de 25  $\mu$ L da solução de p-nitrofenil-acetamida- $\mu$ -D-glicopiranosídeo (NAG- 2,24 mM) em água ultra pura (MilliQ – Millipore). A seguir a reação foi incubada a 37°C por 1 h e interrompida pela adição de 30  $\mu$ L de tampão glicina 200 nM (pH 10,4) em cada poço. A atividade enzimática foi determinada por colorimetria usando um leitor de placas (BioTek Ultra Microplate reader EL 808), cuja leitura foi realizada na absorvância de 405 nm e os resultados expressos como mDO/amostra (SANCHEZ e MORENO, 1999).

#### **4.11 Quantificação de Citocinas**

Para avaliar os efeitos do tratamento tópico com Di-cis-Py+ sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias foi realizada a quantificação de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 nas orelhas dos camundongos. As amostras teciduais (6 mm) foram homogeneizadas em tampão específico (PBS, 0,05% de Tween 20, 0,1 mM de PMSF, 0,1 mM de cloreto de benzametônio, 10 mM de EDTA, 2  $\mu$ g/mL de aprotinina, 0,5% de BSA e 0,4 M de NaCl) na proporção de 20% peso/volume e o homogenato centrifugado a

3000 g à 4 °C por 10 min. No sobrenadante, a concentração de proteínas de cada amostra foi verificada através do método de Bradford. A determinação dos níveis de citocinas foi realizada através de kit de ensaio de imunoadsorvente ligado à enzima (ELISA) (Ready-Set-Go®, eBioscience). Os anticorpos de captura respectivos para IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  foram diluídos para a concentração de uso de acordo com o fabricante do Kit, adicionados 100  $\mu$ l/poço em placa de 96 poços e incubados *overnight*. Após incubação, os poços foram lavados (o conteúdo dos poços foram aspirados e lavados três vezes com 400  $\mu$ l/poço de tampão de lavagem (PBS, 0,05% de Tween) e a placa esgotada sobre papel toalha, adicionado 300  $\mu$ l de tampão de bloqueio (PBS, 1% BSA, 5% Sacarose, 0,05 mM NaNO<sub>3</sub>) e incubado por 1 h. A placa foi lavada (como descrito anteriormente) e as amostras (100  $\mu$ l) foram incubadas. Após 2 h, a placa foi lavada e adicionada 100  $\mu$ l de streptavidina diluída (1:200) em PBS + 1% de BSA em cada poço e incubado por 20 min no escuro. A placa foi lavada, incubada por 20 min no escuro com 100  $\mu$ l/poço de solução substrato (TMB + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A reação foi encerrada com a adição de 50  $\mu$ l da solução de parada (H<sup>2</sup>SO<sub>4</sub> 1M). A densidade óptica foi determinada a 450 nm e a 550 nm, sendo o resultado expresso pela diferença entre a segunda e a primeira leitura.

#### **4.12 Avaliação do tecido cutâneo através da análise histológica**

As amostras de orelhas, coletadas dos camundongos submetidos aos modelos anteriormente citados, foram fixadas em solução de Alfac (85% álcool 80° GL, 10% formaldeído 40% e 5% ácido acético) por um período de 16 h, sendo em seguida



conservadas em álcool 70% até início do processo de desidratação. As orelhas foram então desidratadas em uma bateria seriada de álcool e xilol, emblocadas em parafina, e seccionados em cortes de 5  $\mu\text{m}$  e colocados sob lâminas de vidro. Os cortes foram, então, hidratados em xilol e uma sequência decrescente de etanol, em seguida, corados com hematoxilina e eosina (RECIO, GINER *et al.*, 2000). Para coloração com HE, as lâminas foram expostas à hematoxilina de Harris durante 1,5 min e em seguida lavadas em água corrente por 10 min. As lâminas foram, então, lavadas em dois banhos de água destilada e em seguida expostas à eosina por 2 min e desidratadas. Após o último banho de xilol, as lâminas foram montadas com Bálsamo do Canadá e lamínula. A infiltração de leucócitos, o edema e a espessura da epiderme foram avaliados em áreas representativas com aumento de 200x e/ou 400x. A quantificação da celularidade presente na derme e espessura da epiderme foram realizadas através da contagem dessas células e da espessura ( $\mu\text{m}$ ) por campo com aumento de 400x, sendo analisados dez campos de três cortes histológicos distintos de cinco animais por grupo. As análises foram realizadas com auxílio do software ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, Bethesda, Maryland, USA). A média de cada animal foi utilizada para a construção do gráfico e análise estatística (OTUKI, VIEIRA-LIMA *et al.*, 2005).

#### **4.13 Verificação e quantificação da expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) por Imunohistoquímica.**

Para analisar o efeito da Di-cis-Py+ sobre a celularidade da epiderme foi realizada a análise imunohistoquímica para verificar a expressão de marcador celular como marcador de proliferação celulares. Um desses marcadores é o PCNA que foi descrito como marcador da atividade proliferativa (EINSPAHR, XU *et al.*, 2006). Para verificar expressão de PCNA, amostras de orelhas de animais submetidos ao modelo de edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton foram processadas conforme descrito no item anterior. Os cortes histológicos obtidos foram montados em lâminas gelatinizadas (gelatina tipo A e cromo alúmem) contendo uma solução de albumina 1%. As lâminas foram reidratadas em uma bateria seriada de concentrações de xilol-álcool hidratado e seguidas de banho de PBS. As lâminas foram então submetidas a um banho de glicina (0,1 M) para o bloqueio dos radicais aldeídos, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%) em metanol para bloqueio da peroxidase endógena e PBS/BSA (1%) para bloqueio dos sítios inespecíficos. Em seguida os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti-PCNA (1:100) durante duas horas a temperatura ambiente em câmara úmida. Após banho com PBS, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:100) durante uma hora a temperatura ambiente e em câmara úmida. As lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com kit contendo o cromógeno DAB durante 15 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas, contracoradas com hematoxilina e desidratadas em uma bateria seriada de álcool hidratado-xilol, seguidas da montagem com bálsamo do Canadá e lamínula. A presença de células imunopositivas para o marcador PCNA foi quantificada em áreas representativas com aumento de 400x em microscópio óptico. A quantificação

foi realizada através da contagem do número de células imunopositivas por campo, sendo analisados 10 campos de 3 cortes histológicos distintos de 5 animais de cada grupo utilizando o software ImageJ 1.46R, em aumento de 400x. A média de cada animal foi utilizada para a construção do gráfico e análise estatística.

#### **4.14 Avaliação dos níveis da proteína PCNA pelo ensaio de *Western Blot***

Com o objetivo de avaliar a proliferação celular, após a aplicação múltipla de Óleo de Cróton, foi utilizada a técnica de *Western Blot* para quantificação da expressão da proteína PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) na pele de camundongos. Para tal, amostras (círculos de 6 mm de diâmetro de tecido da orelha dos camundongos) foram coletadas no dia 9 após o tratamento crônico com a aplicação múltipla de Óleo de Cróton para avaliação dos níveis de PCNA. A fração total dos extratos de amostras de orelhas, obtida como descrito anteriormente, foi submetida à eletroforese em gel desnaturante e SDS-poliacrilamida (12,5%), sendo logo depois transferida para uma membrana de nitrocelulose Hybond-C Extra Amersham Biosciences (GE Healthcare). Após a transferência, a membrana foi bloqueada com solução de leite em pó (5%) e posteriormente incubada com anticorpo policlonal para PCNA (Santa Cruz Biotechnology, EUA). A visualização das proteínas foi realizada utilizando anticorpo secundário específico conjugado à peroxidase e as bandas imunorreativas foram visualizadas usando-se kit de aumento de quimioluminescência (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Inglaterra) e filme radiográfico, segundo recomendações do fabricante.

#### **4.15 Edema de orelha agudo induzido pela aplicação de TPA com tratamento de Di-cis-Py+ no lado oposto**

Com o intuito de verificar se a Di-cis-Py+ apresentava ação sistêmica, foi induzido o processo inflamatório pela aplicação de TPA como descrito no item 6.8.1 e na sequência realizado o tratamento tópico. A Di-cis-Py+ (0,1 mg/orelha) e a dexametasona (0,05 mg/orelha, utilizada como droga de referência) foram administrados na orelha oposta da indução com TPA. Logo após a administração dos tratamentos foi incidida a luz durante 20 minutos a 100 mW/cm<sup>2</sup>. Assim como o TPA, as drogas testadas também foram dissolvidas em 20 µL de acetona. A variação da espessura da orelha foi avaliada 6 horas após a aplicação do agente flogístico (TPA) (DE YOUNG, KHEIFETS *et al.*, 1989).

#### **4.16 Ensaio de Reversão por Antagonista Corticosteróides (RU486 – Mifepristona)**

Para verificar o possível envolvimento dos receptores de corticosteróides na ação anti-inflamatória e antiproliferativa da Di-cis-Py+, os animais foram pré-tratados com o antagonista farmacológico RU486 (mifepristona) (50 mg/kg, sc) ou com seu veículo Polietilenoglicol 400 (PEG400) e, após 30 minutos foi induzido o edema de orelha pela aplicação de TPA como descrito no item 4.8.1 e na sequência realizado o tratamento tópico com Di-cis-Py+ (0,1 mg/orelha) fotoativada e dexametasona (0,05 mg/orelha). A espessura da orelha foi utilizada como indicador

do processo inflamatório e para avaliar a possível reversão causada pelo antagonista (PINTO, MORAIS *et al.*, 2010).

#### **4.17 Análise estatística**

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média). A significância estatística entre os grupos foi avaliada por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls e de duas vias, seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni, dependendo do ensaio realizado. Para dados não-paramétricos, foi utilizado qui-quadrado. O nível de significância aceito para os testes é de  $P < 0,05$ . Todos os testes foram realizados utilizando o software estatístico GraphPad Prism 5.0, São Diego, Califórnia, EUA.

## 5 RESULTADOS

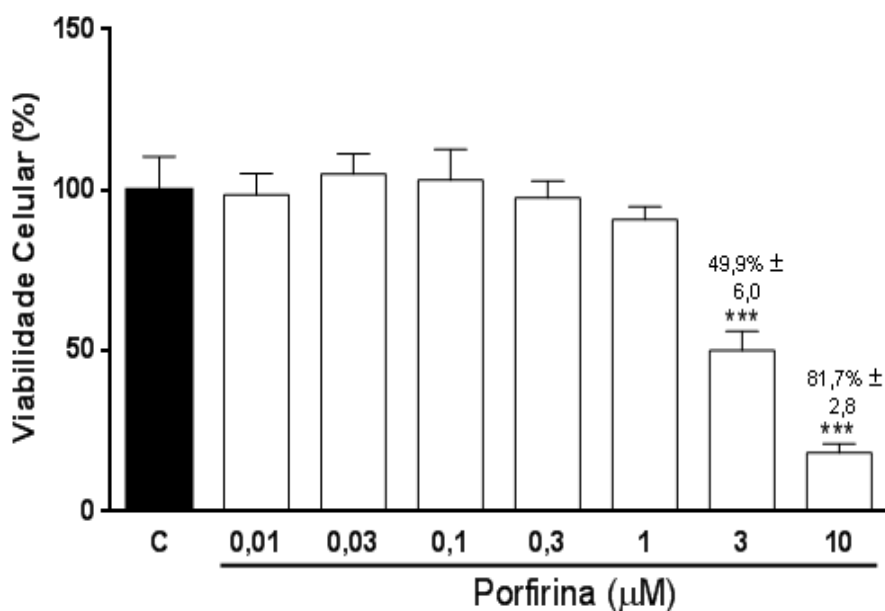
Os estudos pré-clínicos, *in vitro* e *in vivo*, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária visam definir os perfis farmacológico e toxicológico de possíveis medicamentos. São obtidas informações preliminares sobre a atividade farmacológica e segurança da nova molécula estudada. O uso de métodos alternativos *in vitro* em substituição a estudos *in vivo*, desde que validados e aceitos internacionalmente, são recomendados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

A fim de determinar a eficácia de um novo agente para o uso clínico, é importante, primeiramente, conhecer seu comportamento *in vitro*. Através da viabilidade celular pode-se verificar quais concentrações são capazes de causar danos a célula, por sua vez minimizando, posteriormente, o uso de animais (SVENSSON, ROPKE *et al.*, 2012).

### 5.1 Modelo *in vitro*

#### 5.1.1 Tratamento com fotossensibilizador Di-*cis*-Py+ sem fotoativação

Quando se está à procura de um fotossensibilizador ideal para terapia fotodinâmica, este precisa atender alguns critérios; entre eles, não apresentar citotoxicidade no escuro (CASTANO, DEMIDOVA *et al.*, 2004; 2005; JOSEFSEN e BOYLE, 2008; YANO, HIROHARA *et al.*, 2011).



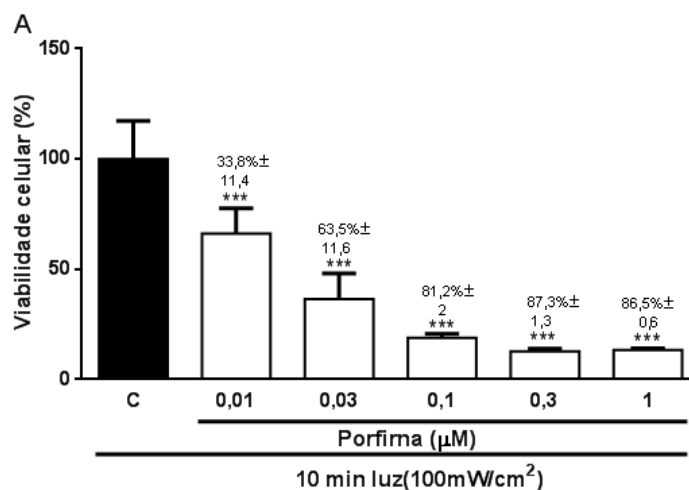
**Figura 7. Avaliação da viabilidade das células da linhagem HaCat após tratamento da Di-cis-Py+ sem fotoativação.** As células foram tratadas nas diferentes concentrações de Di-cis-Py+ (0,01; 0,03; 0,1; 0,3, 1, 3 e 10 µM). Após 28 horas, a porcentagem de células viáveis foi determinada através do método de MTT. Os símbolos indicam os níveis de significância. \*\*\* P <0,001 quando comparado com o grupo de Controle (C), o qual foi tratado somente com meio DMEM 1%.

O primeiro ensaio com Di-cis-Py+ avaliou a viabilidade celular sem a incidência de luz. As células foram incubadas com diferentes concentrações da Di-cis-Py+ (0,01; 0,03; 0,1; 0,3, 1, 3 e 10 µM) por um período de 28 horas. A viabilidade celular foi mensurada através do ensaio colorimétrico do MTT e os resultados mostraram que, sem a fotoativação, Di-cis-Py+ diminuiu a viabilidade das células HaCaT nas concentrações de 3 e 10 µM em  $49,9 \pm 6\%$  e  $81,7 \pm 2,8\%$ , respectivamente, quando comparadas com o grupo controle (Figura 7). Estas concentrações (3 e 10 µM) se mostraram citotóxicas independente da fotoativação.

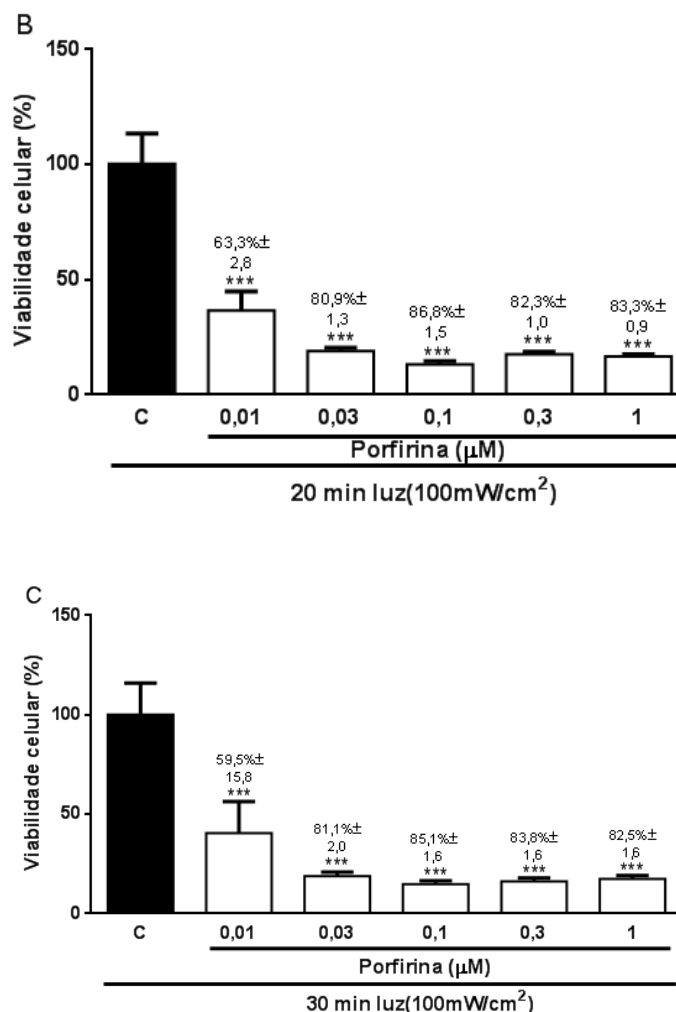
### 5.1.2 Tratamento da Di-*cis*-Py+ com fotoativação

De acordo com os resultados obtidos na ausência de luz, foram escolhidas as concentrações para uma curva no teste com fotoativação. As concentrações (3 e 10  $\mu\text{M}$ ) que reduziram a viabilidade celular independente da fotoativação foram excluídas do experimento subsequente.

A viabilidade celular da HaCaT foi avaliada após a pré-incubação com diferentes concentrações da Di-*cis*-Py+ (0,01; 0,03; 0,1; 0,3 e 1  $\mu\text{M}$ ) por um período de 4 horas na ausência da fotoativação. Logo em seguida, nos tempos de 10, 20 e 30 minutos, foi incidida a luz no comprimento de onda entre 400 a 800 nm na intensidade de 100  $\text{mW}/\text{cm}^2$ . A viabilidade celular foi mensurada através do ensaio colorimétrico de MTT.







**Figura 8. Avaliação da viabilidade das células da linhagem HaCat após tratamento da Di-cis-Py+ com fotoativação.** As células foram pré-tratadas com diferentes concentrações da Di-cis-Py+ (0,01; 0,03; 0,1; 0,3 e 1  $\mu\text{M}$ ) por 4 horas na ausência de luz. Em seguida foi incidida a luz nos tempos de 10 (A); 20 (B) e 30 (C) minutos. Após 24 horas a quantidade de células viáveis foi determinada através do método de MTT. Os símbolos indicam os níveis de significância. \*\*\*  $P < 0,001$  quando comparado com o grupo de Controle (C) o qual foi tratado somente com meio DMEM 1%.

De acordo com os resultados obtidos nos três tempos de incidência de luz, todas as concentrações foram capazes de causar redução na viabilidade celular (Figura 8).

No tempo de 10 minutos com a incidência de luz (Figura 8A) todas as concentrações foram capazes de reduzir a viabilidade celular, sendo a concentração de 0,3  $\mu\text{M}$  a que causou maior redução da viabilidade em  $87,3 \pm 1,3\%$ .

Quando as células foram expostas no tempo de 20 minutos com a incidência de luz (Figura 8B) todas as concentrações também foram capazes de reduzir a viabilidade celular sendo a concentração de 1  $\mu\text{M}$  com menor redução da viabilidade celular em  $83,3 \pm 0,9\%$ .

Após 30 minutos de incidência de luz (Figura 8C) semelhante aos outros tempos ocorreu uma redução da viabilidade celular em todas as concentrações, sendo 0,3  $\mu\text{M}$  que causou maior redução em  $83,8 \pm 1,6\%$ .

De acordo com Tabela 1 verifica-se a redução da viabilidade celular de cada concentração em células de linhagem HaCaT nos tempos do tratamento.

<b>Redução da Viabilidade Celular (%)</b>			
	<b>10 minutos</b>	<b>20 minutos</b>	<b>30 minutos</b>
<b>0,01</b>	33,8 $\pm$ 11,4	63,3 $\pm$ 2,8	59,5 $\pm$ 15,8
<b>0,03</b>	63,5 $\pm$ 11,6	80,9 $\pm$ 1,3	81,1 $\pm$ 2,0
<b>0,1</b>	81,2 $\pm$ 2,0	86,8 $\pm$ 1,5	85,1 $\pm$ 1,6
<b>0,3</b>	87,3 $\pm$ 1,3	82,3 $\pm$ 1,0	83,8 $\pm$ 1,6
<b>1</b>	86,5 $\pm$ 0,6	83,3 $\pm$ 0,9	82,5 $\pm$ 1,6

**Tabela 1.** Porcentagem de inibição celular após tratamento com Di-cis-Py+ fotoativada (0,01 - 1  $\mu\text{M}$ ) nos tempos de 10, 20 e 30 minutos.

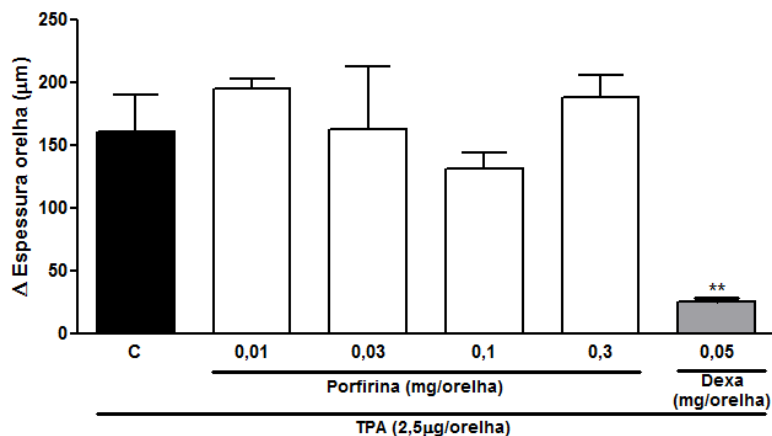
## **5.2 Avaliação de parâmetros inflamatórios no modelo de edema de orelha induzido por 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA).**

Esse ensaio foi realizado para verificar de que forma a Di-*cis*-Py+ atuaria *in vivo*, utilizando modelos mais específicos para avaliar alguns parâmetros que podem estar relacionados com a Psoríase.

Primeiramente foi realizado um *screening* para avaliar a ação anti-inflamatória da Di-*cis*-Py+, através do modelo agudo de inflamação induzido por TPA em animais Swiss.

### **5.2.1 Efeitos da Di-*cis*-Py+ sem fotoativação no edema agudo de orelha induzido pela aplicação de TPA**

Como descrito anteriormente, um agente fotossensibilizador ideal é aquele que não apresenta atividade na ausência de luz. Dessa forma, primeiramente, os experimentos foram realizados na ausência de fotoativação, com o objetivo de verificar se poderia ocorrer alguma atividade do agente fotossensibilizador sem a mesma.



**Figura 9. Efeito da Porfyrina Di-cis-Py+ sem fotoativação aplicada por via tópica em edema de orelha agudo.** Efeito da Di-cis-Py+ na concentrações de 0,01 a 0,3 mg/orelha e da dexametasona 0,05 mg/orelha (Dexa) (droga de referência), quando aplicados por via tópica. As barras verticais representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=5-10). Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo controle (C) no qual os animais receberão apenas o agente flogístico. \*\*P<0,01.

Após 6 horas do tratamento com a Porfyrina em estudo, não ocorreu a redução do edema quando comparada ao grupo controle, o qual recebeu somente o agente flogístico (Figura 9).

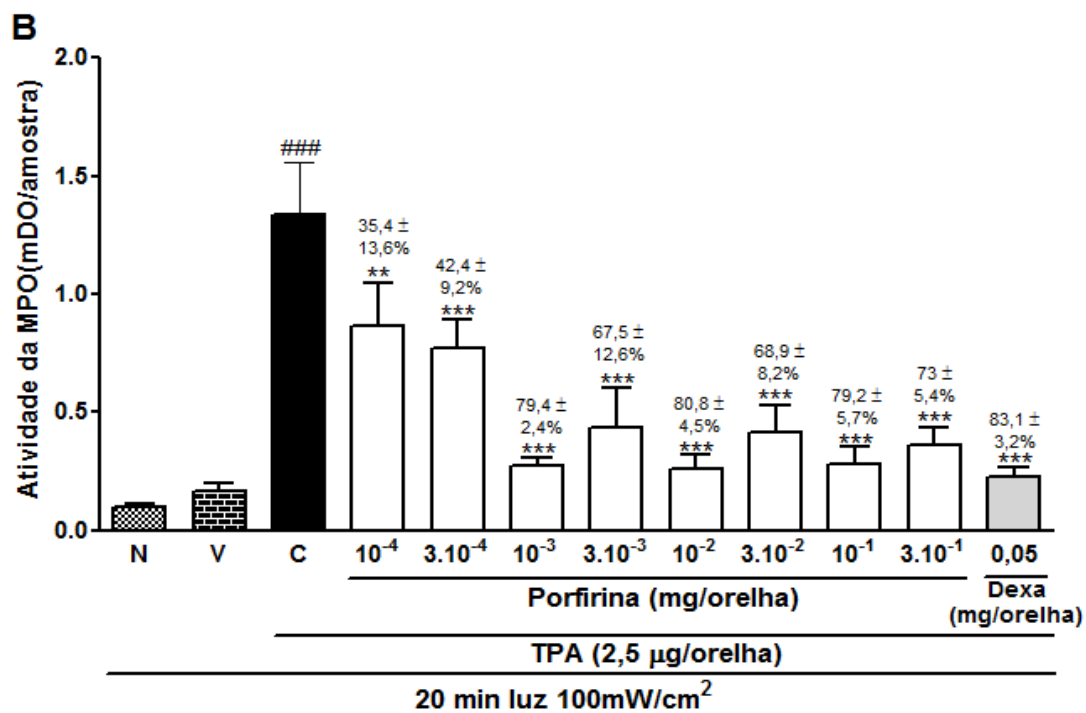
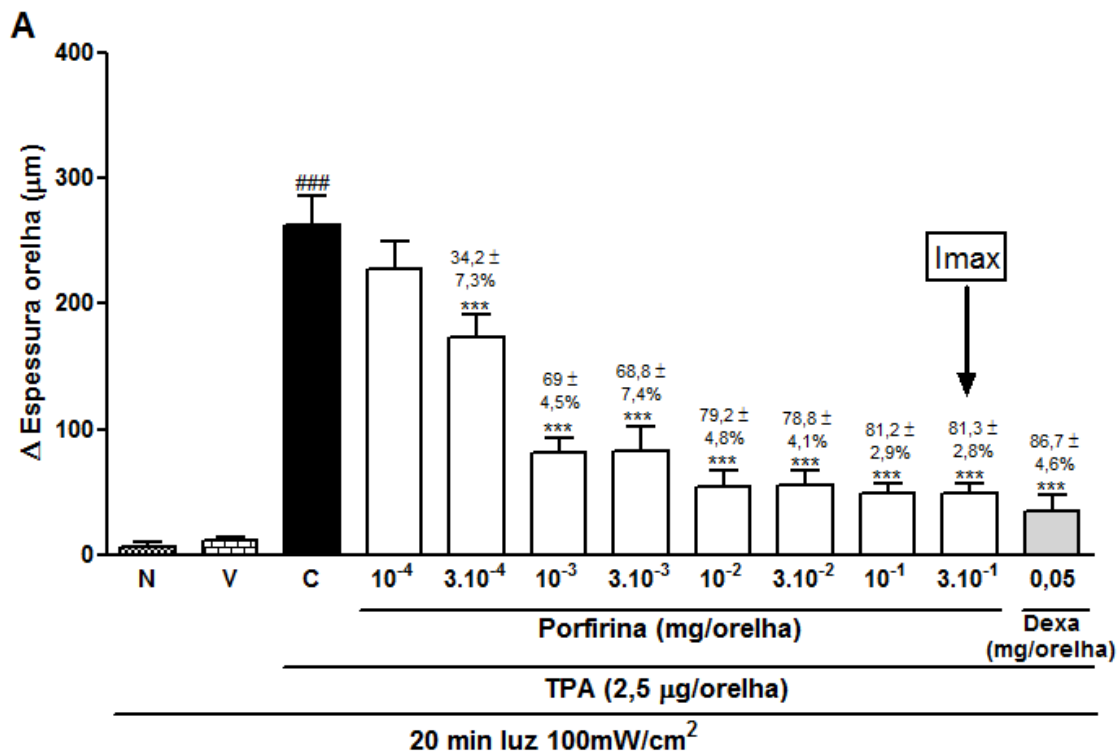
### 5.2.2 Avaliação da Di-cis-Py+ com fotoativação no modelo de edema agudo de orelha induzido pela aplicação de TPA

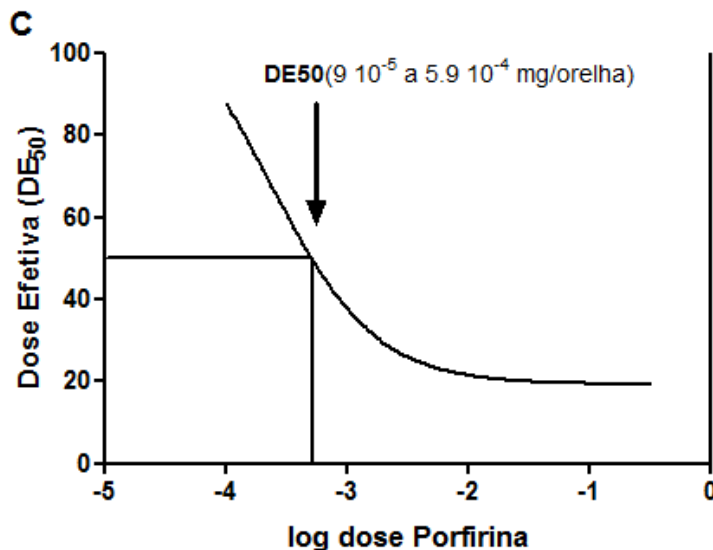
Após verificar que a Di-cis-Py+ não apresentou ação quando a mesma não recebeu a fotoativação, foi feita uma curva de doses após fotoativação da Di-cis-Py+.

A Di-cis-Py+, quando ativada por 20 minutos, apresentou uma redução no edema de orelha no modelo agudo induzido pela aplicação de TPA, mostrando diferença nas doses de 0,0003 mg/orelha – 0,3 mg/orelha, em comparação ao grupo controle (Figura 10A). A aplicação da Di-cis-Py+ foi capaz de alterar o edema na orelha dos animais, apresentando inibição máxima ( $I_{max}$ ) de  $81,3 \pm 2,8\%$  ( $P < 0,001$ ) na dose de 0,3 mg/orelha e  $DE_{50}$  de  $2,3 \cdot 10^{-4}$  mg/orelha ( $9 \cdot 10^{-5}$  a  $5,9 \cdot 10^{-4}$  mg/orelha) (Figura 10C). A droga de referência (dexametasona) também foi capaz de alterar do edema em  $93,4 \pm 1,5\%$  ( $P < 0,001$ ).

Na Figura 10A é possível observar que, após o estabelecimento do processo inflamatório agudo, tanto a Di-cis-Py+, quando fotoativada, quanto à dexametasona impediram a formação do edema, mostrando a capacidade da Di-cis-Py+, quando fotoativada, em impedir o efeito edematogênico provocado pela aplicação tópica de TPA na dose de 2,5  $\mu$ g/orelha.

De acordo com a Figura 10B, a aplicação tópica de TPA promoveu o aumento da atividade da enzima MPO no tempo de 24 horas. Este aumento não foi observado no grupo tratado com Di-cis-Py+, quando fotoativada, por 20 minutos, a qual demonstrou uma inibição máxima de  $80,8 \pm 4,5\%$  ( $P < 0,001$ ) na dose de 0,01 mg/orelha. A atividade da enzima MPO é utilizada como indicativo da presença de leucócitos polimorfonucleares no tecido inflamado. Assim pode-se dizer que a Di-cis-Py+ inibiu o infiltrado de polimorfonucleares de forma semelhante à dexametasona, a qual inibiu a atividade da enzima em  $83,1 \pm 3,2\%$  ( $P < 0,001$ ).





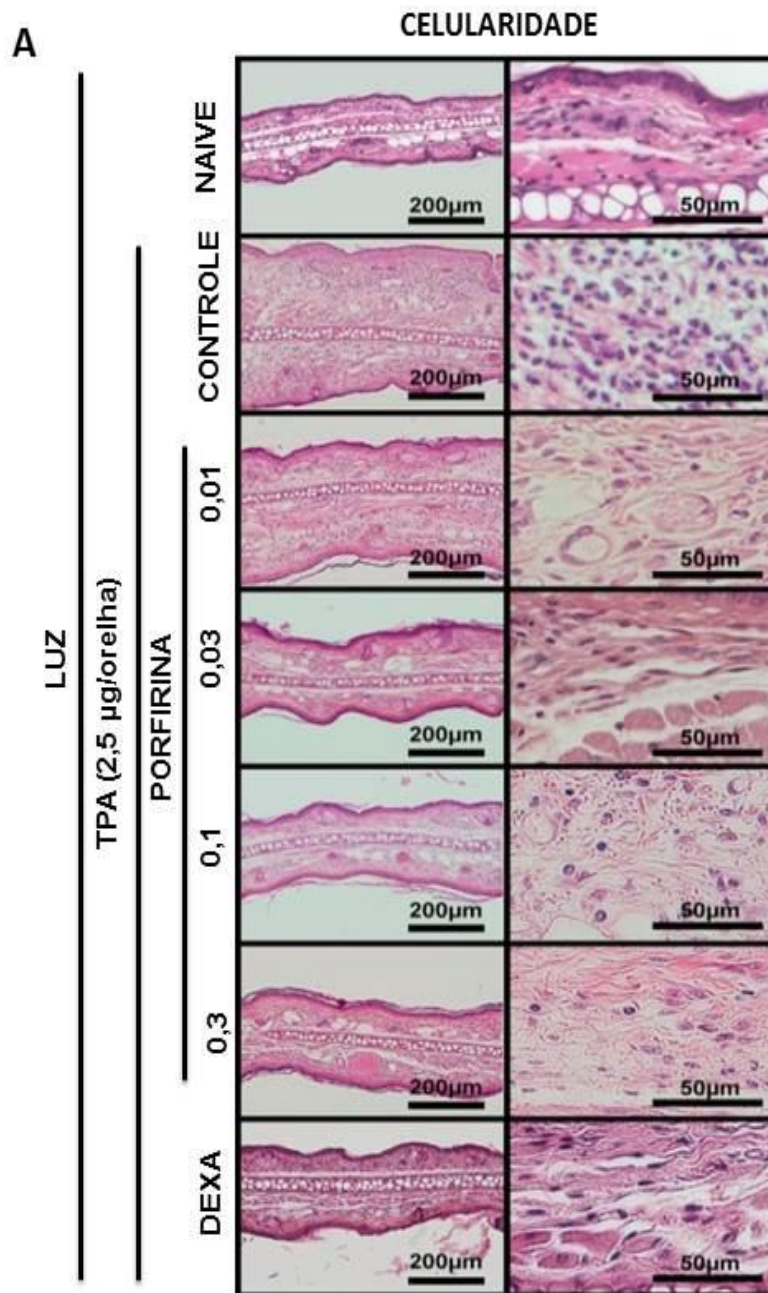
**Figura 10. Efeito da aplicação tópica de Di-cis-Py+ no modelo de inflamação aguda induzida por TPA.** Ação da Di-cis-Py+ nas doses de (0,01; 0,03; 0,1; 0,3 mg/orelha) sobre a formação do edema (A), atividade da enzima MPO (B) e DE<sub>50</sub> (C) induzidos pela aplicação tópica de TPA. O grupo controle recebeu o agente flogístico (TPA 2,5µg/orelha), O grupo veículo foi tratado topicamente. O tratamento com as doses de Di-cis-Py+ e dexametasona (0,05 mg/orelha) foram aplicados logo após a aplicação do agente flogístico, seguido pela incidência de luz por 20 minutos no comprimento de onda entre 400 e 800 nm, na intensidade de 100 mW/cm<sup>2</sup>. O edema nas orelhas foi medido 6h após a indução com o TPA. Foram coletadas amostras das orelhas 24h após a indução e homogeneizadas em HTAB. A partir do sobrenadante o ensaio da MPO foi realizado para avaliação da atividade enzimática. As barras representam a média ± EPM para (n = 6-10). Os símbolos indicam os níveis de significância para: ### P <0,001 quando comparado com o grupo naivo(N), não tratado. \*\*\* P <0,001. \*\*P<0,01 quando comparado ao grupo controle (C).

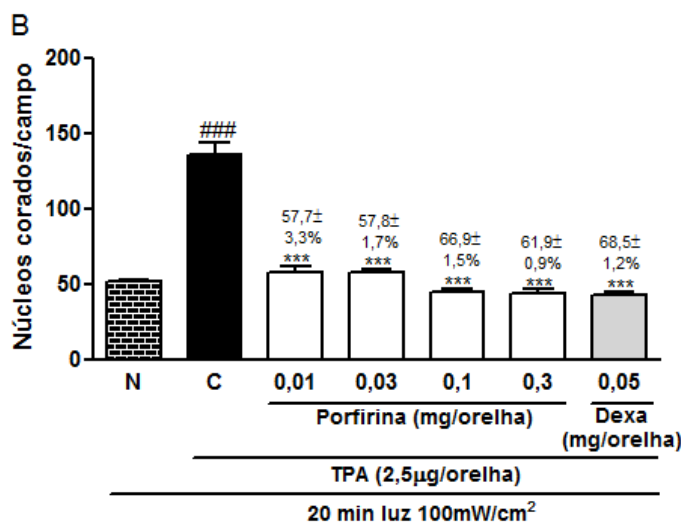
Para confirmar o efeito da Di-cis-Py+, quando fotoativada, sobre a migração de células inflamatórias para o local inflamado, amostras das orelhas foram submetidas à análise histológica.

Nas fotos representativas de cortes histológicos (Figura 11A) observa-se, que o grupo com aplicação do TPA apresenta um intenso infiltrado inflamatório dérmico, o qual não ocorre nos grupos tratados com a Di-cis-Py+, quando fotoativada.

Após o tratamento com a Di-cis-Py+, quando fotoativada, a dose de 0,1 mg/orelha reduziu o infiltrado celular em  $66,9\pm 1,5\%$  e o grupo dexametasona reduziu em  $68,5\pm 1,2\%$  (Figura 11B).



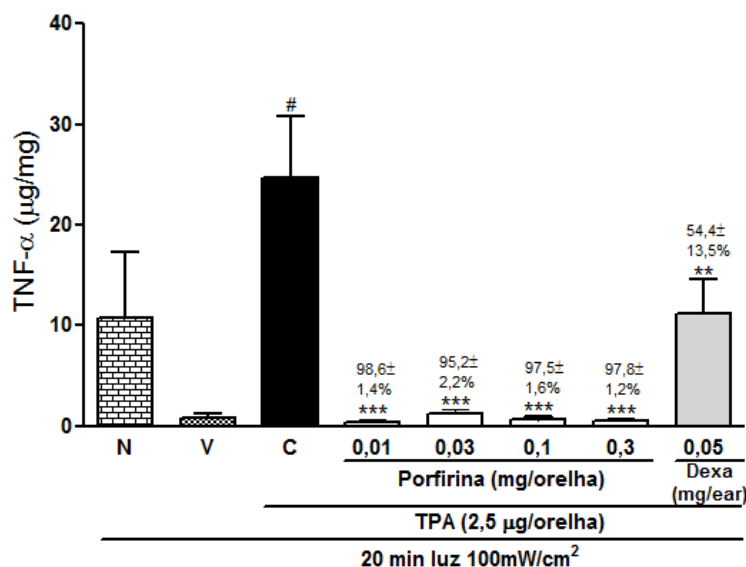




**Figura 11. Avaliação histológica do efeito da Di-cis-Py+ no modelo de inflamação aguda induzida por TPA.** Foram coletadas amostras das orelhas 24h após a indução e coradas com hematoxilina-eosina. (A) fotos representativas foram tiradas a partir de lâminas coradas (aumento de 200 - 400x / escala 200-50µm) e analisadas. Avaliação da celularidade através do número total de núcleos corados com HE em células da derme (B). Barras representam a média ± EPM para (n = 6-10). Os símbolos indicam os níveis de significância para: \*\*\* P <0,001 quando comparado ao grupo controle (C); ### P <0,001 quando comparado ao grupo naive (N), não tratado com a Porfirina.

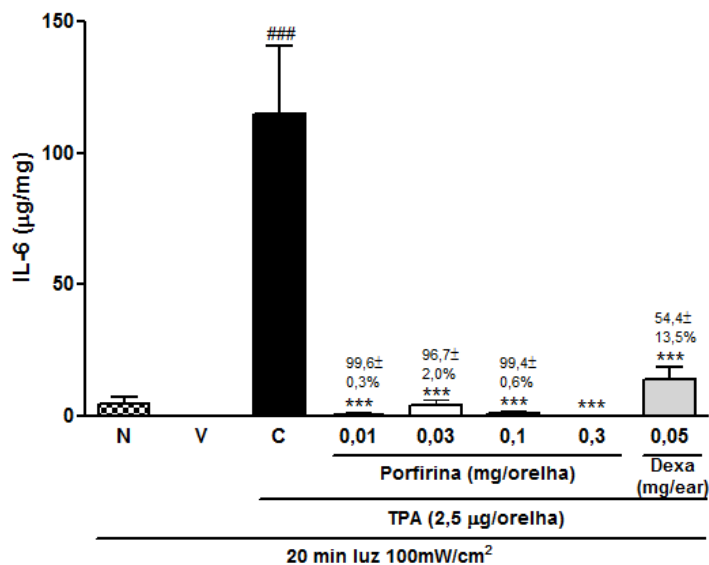
### 5.2.3 Efeitos da Di-cis-Py+ fotoativada na liberação de citocinas após a indução por TPA

Outro parâmetro avaliado no modelo de inflamação aguda foi o nível de citocinas pró-inflamatórias. O tratamento com diferentes doses da Di-cis-Py+, quando fotoativada, por via tópica inibiu significativamente a liberação das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 induzida pela aplicação tópica de TPA (2,5 µg/orelha).



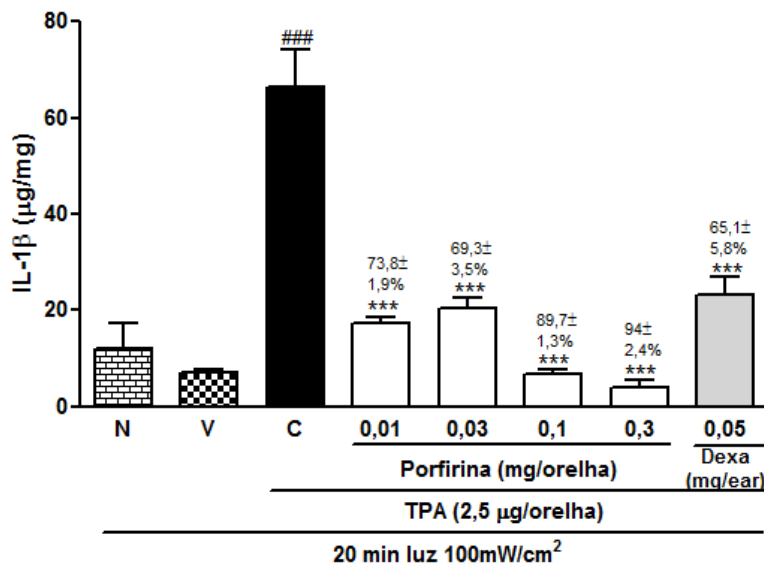
**Figura 12. Efeito da Di-*cis*-Py+ fotoativada sobre os níveis de TNF- $\alpha$  no modelo de inflamação aguda induzida por TPA.** O processo inflamatório foi induzido na orelha dos animais pela administração tópica de TPA. O grupo controle recebeu o agente flogístico (TPA 2,5 $\mu$ g/orelha) O grupo veículo (V) foi tratado topicamente com acetona. O Grupo Naive(N). O tratamento com as doses de Di-*cis*-Py+ (0,01 – 0,3 mg/orelha) e dexametasona (0,05 mg/orelha) foram aplicados logo após a aplicação do agente flogístico, seguido pela incidência de luz por 20 minutos no comprimento de onda entre 400 e 800 nm, na intensidade de 100 mW/cm<sup>2</sup>. Após 6 horas da aplicação do agente flogístico, amostras de tecido (6 mm) foram retiradas e utilizadas para a quantificação dos níveis de TNF- $\alpha$  por Kit ELISA. As barras representam a média  $\pm$  EPM (n=6). Os símbolos representam o índice de significância quando comparados os grupos tratamento com o grupo controle (C) ou veículo (V), respectivamente. \*\*\* P<0,001, \*\* P<0,01 e # P<0,05. (N) representa o grupo naive.

A Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, promoveu a maior inibição da liberação de TNF- $\alpha$  de 98,6  $\pm$  1,4% (P<0,001) na dose de 0,01mg/orelha; a dexametasona inibiu em 54,4  $\pm$  13,5% (P<0,01) (Figura 12).



**Figura 13. Efeito da Di-*cis*-Py+ fotoativada sobre os níveis de IL-6 no modelo de inflamação aguda induzida por TPA.** O processo inflamatório foi induzido na orelha dos animais pela administração tópica de TPA. O grupo controle recebeu o agente flogístico (TPA 2,5µg/orelha). O tratamento com as doses de Di-*cis*-Py+ (0,01 – 0,3 mg/orelha) e dexametasona (0,05 mg/orelha) foram aplicados logo após a aplicação do agente flogístico, seguido pela incidência de luz por 20 minutos no comprimento de onda entre 400 e 800 nm, na intensidade de 100 mW/cm<sup>2</sup>. Após 6 horas da aplicação do agente flogístico, amostras de tecido (6 mm) foram retiradas e utilizadas para a quantificação dos níveis de IL-6 por ELISA. As barras representam a média ± EPM (n=6). Os símbolos representam o índice de significância quando comparados os grupos tratamento com o grupo controle (C) ou veículo (V), respectivamente. \*\*\*, ###P<0,001. (N) representa o grupo naivo

Os níveis de IL-6 retornaram a valores basais na dose 0,3 (mg/orelha) pela aplicação da Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, enquanto a dexametasona promoveu inibição máxima de 88,1 ± 4,3 % (P<0,001) (Figura 13).



**Figura 14. Efeito da Di-*cis*-Py+ fotoativada sobre os níveis de IL-1 $\beta$  no modelo de inflamação aguda induzida por TPA.** O processo inflamatório foi induzido na orelha dos animais pela administração tópica de TPA. O grupo controle recebeu o agente flogístico (TPA 2,5 $\mu$ g/orelha). O tratamento com as doses de Di-*cis*-Py+ (0,01 – 0,3 mg/orelha) e dexametasona (0,05 mg/orelha) foram aplicados logo após a aplicação do agente flogístico, seguido pela incidência de luz por 20 minutos no comprimento de onda entre 400 e 800 nm, na intensidade de 100 mW/cm<sup>2</sup>. Após 6 horas da aplicação do agente flogístico, amostras de tecido (6 mm) foram retiradas e utilizadas para a quantificação dos níveis de IL-1 $\beta$  por ELISA. As barras representam a média  $\pm$  EPM (n=6). Os símbolos representam o índice de significância quando comparados os grupos tratamento com o grupo controle (C) ou veículo (V), respectivamente. \*\*\*,### P<0,001 (N) representa o grupo naive.

De maneira semelhante às citocinas anteriores, a liberação de IL-1 $\beta$  teve uma inibição máxima de 94,0 $\pm$  2,4% (P<0,001) na dose de 0,3mg/orelha da Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, enquanto que a dexametasona promoveu inibição máxima de 65,1  $\pm$  5,8% (P<0,001) (Figura 14).

### **5.3. Modelo de edema induzido por múltiplas aplicações de óleo de cróton**

#### **5.3.1 Efeito da Di-*cis*-Py+ sem fotoativação**

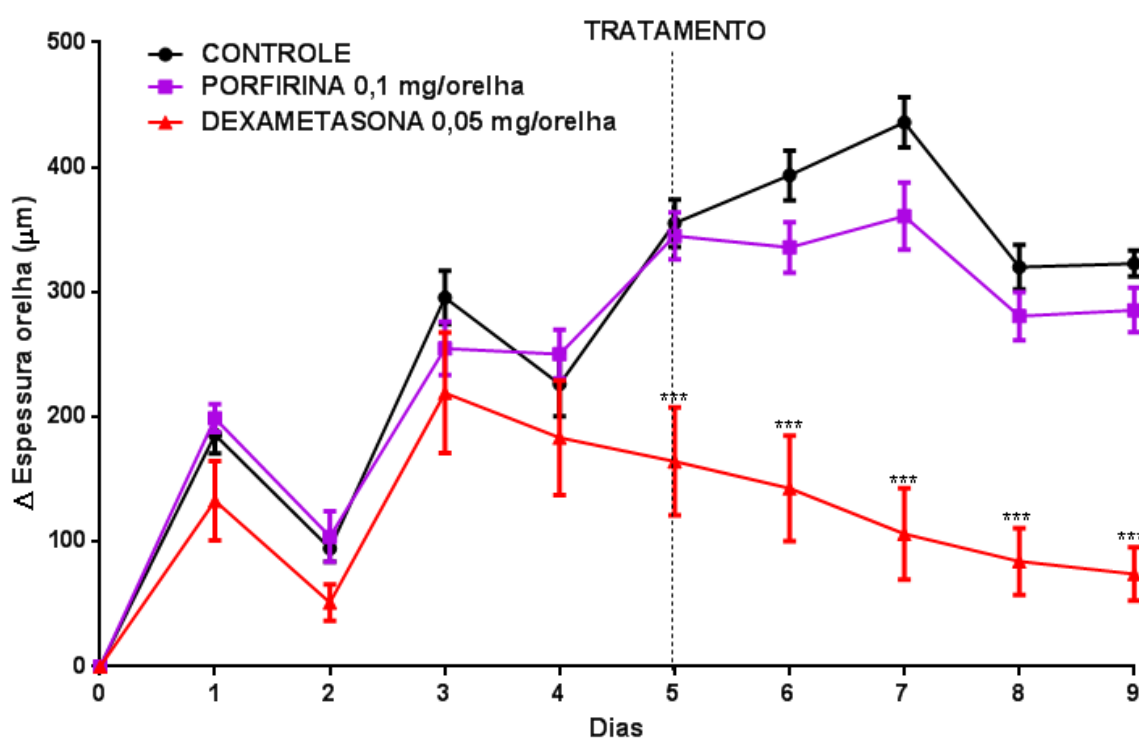
Após verificar que a Di-*cis*-Py+ reduziu vários parâmetros inflamatórios no modelo de edema agudo provocado por TPA, e que a Psoríase é uma doença de cunho inflamatório crônico com aumento da proliferação de queratinócitos, foi necessário aprofundar o estudo em modelo que mimetiza processos de hiperproliferação, como é o caso do modelo de inflamatório induzido por múltiplas aplicações de Óleo de Cróton.

De forma semelhante às aquelas realizadas nos experimentos anteriores, antes de iniciar os testes com fotoativação, os experimentos foram realizados sem a fotoativação, com o intuito de confirmar se a Di-*cis*-Py+ tem ação sem fotoativação.

A dose de 0,1mg/orelha foi escolhida baseada nos resultados anteriores os quais foi mostrada a semelhança entre as doses maiores.

Quando aplicado na orelha do animal, o Óleo de Cróton é capaz de promover aumento da sua espessura e, com a múltipla aplicação, pode-se observar o estabelecimento do edema com um intenso infiltrado celular e um espessamento da epiderme. O óleo de cróton foi aplicado durante todo o experimento em dias alternados. A partir do 5º dia os tratamentos com Di-*cis*-Py+ (0,1 mg/orelha) e Dexametasona (Dexa, 0,05 mg/orelha) foram realizados, 1 vez ao dia, até o final do experimento (9 dias) sem a incidência de luz. Os animais foram mantidos na ausência de luz para que não ocorresse interferência da luz externa. O edema foi avaliado sempre 6 e 24 horas após a aplicação do Óleo de Cróton.

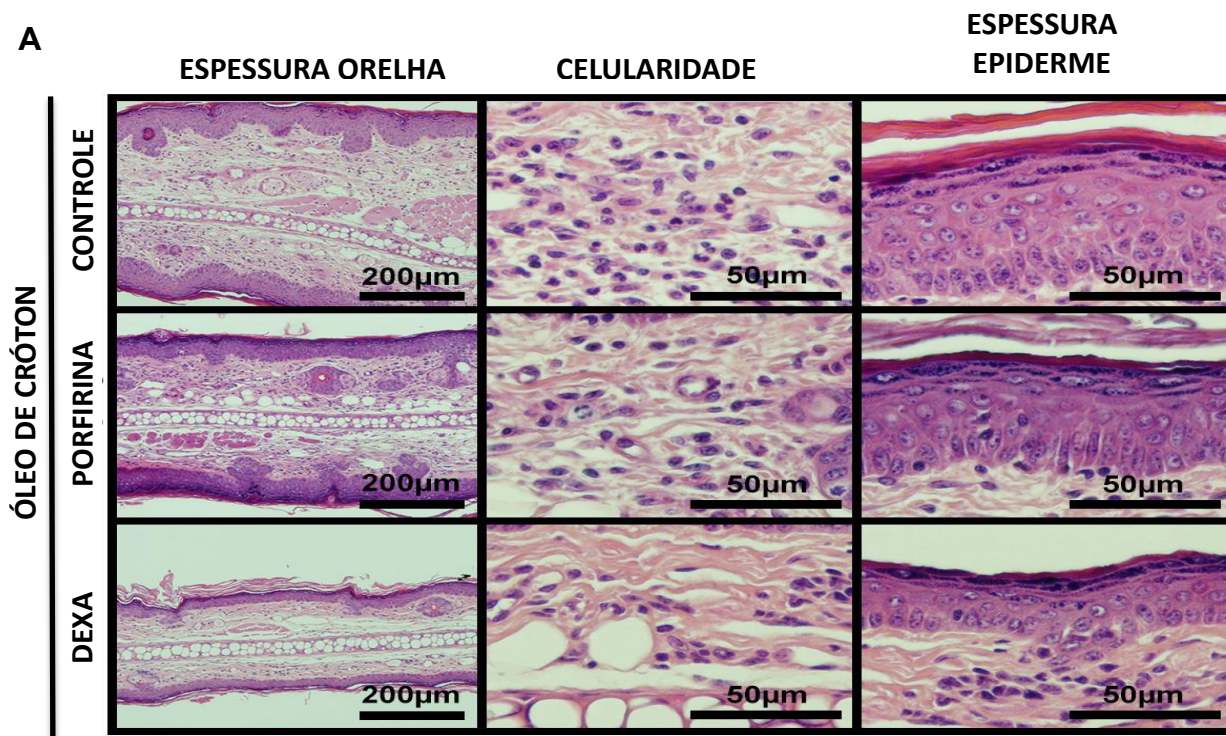
Conforme a Figura 15, observou-se que, após o tratamento com Di-*cis*-Py+ na dose de 0,1mg/orelha sem fotoativação não ocorreu alteração na espessura da orelha de forma semelhante ao grupo controle. Isso corrobora experimentos anteriores nos quais a Di-*cis*-Py+ necessita de fotoativação para apresentar atividade.



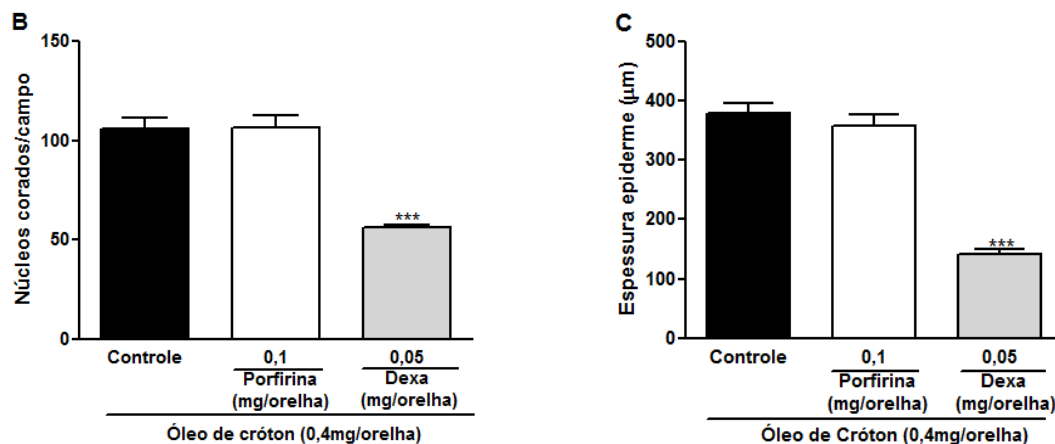
**Figura 15. Efeito da Di-*cis*-Py+ induzido por múltiplas aplicações de óleo de cróton.** O processo inflamatório crônico foi induzido com a aplicação tópica de óleo de cróton (0,4 mg/orelha) em dias alternados durante 9 dias. A Di-*cis*-Py+ (0,1mg/orelha) e a dexametasona (0,05 mg/orelha) foram aplicadas topicamente a partir do quinto dia (1 vez ao dia). A medida da espessura da orelha foi avaliada diariamente. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM (n=10). \*\*\*p < 0,001; representa o nível de significância em relação ao grupo controle.

As fotos representativas de corte histológico (Figura 16A) indicam que o modelo com múltiplas aplicações de óleo de cróton leva a um processo inflamatório, com espessamento acentuado da epiderme e na derme um intenso infiltrado inflamatório mononuclear dérmico.

Conforme as Figuras 16 B e C verifica-se de forma semelhante ao grupo controle o aumento da espessura da epiderme e celularidade, confirmando que a Di-*cis*-Py+ não apresenta atividade quando não recebe a fotoativação.







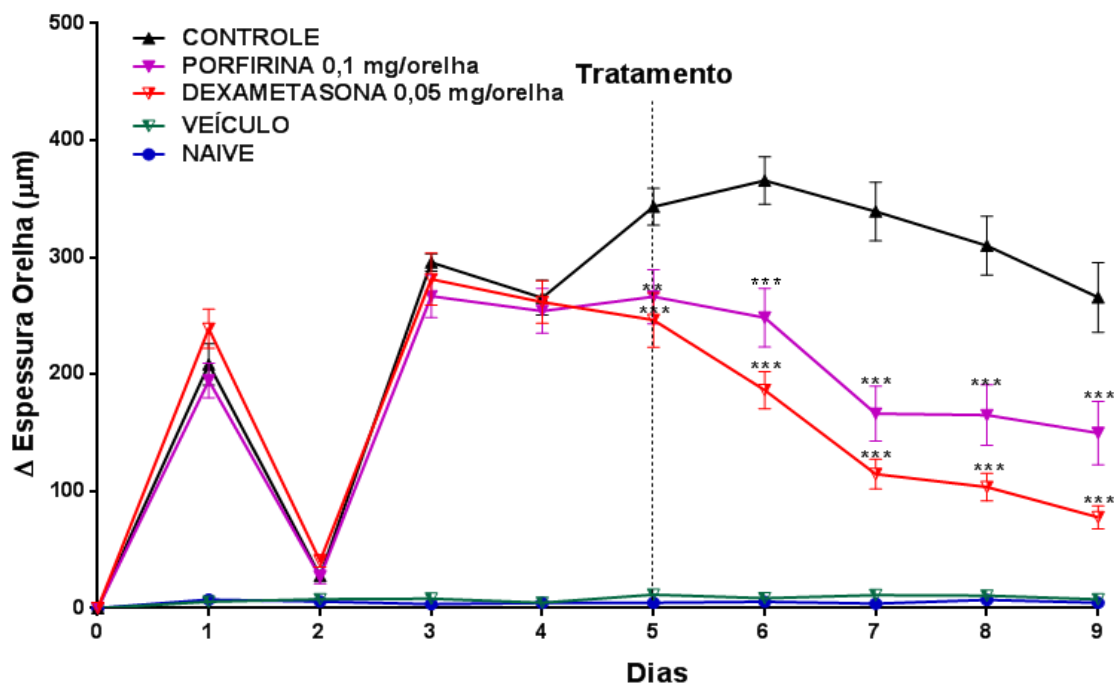
**Figura 16. Análise do efeito da Di-*cis*-Py+ sem fotoativação sobre alterações histológicas no modelo de indução de inflamação crônica mediado por aplicações múltiplas de óleo de cróton.** As amostras foram coletadas no 9<sup>o</sup> dia de experimento e processadas de acordo com o procedimento de histologia para coloração de hematoxilina-eosina (A). Fotos representativas foram tiradas a partir de lâminas coradas (aumento de 200-400x / escala 200-50µm) e analisadas. Avaliação da celularidade através do número total de núcleos corados com HE em células da derme (B). Espessura da epiderme avaliada em imagens coradas com HE (C). Barras representam a média ± EPM para (n = 6-10). Os símbolos indicam os níveis de significância para: \*\*\* P < 0,001 quando comparado ao grupo veículo.

### 5.3.2 Efeito da Di-*cis*-Py+ com fotoativação

Conforme descrito anteriormente, os animais receberam o mesmo tratamento, porém agora com incidência de luz. Neste caso a partir do 5<sup>o</sup> dia de experimento os animais foram tratados com a Di-*cis*-Py+ (0,1 mg/orelha) e Dexametasona (Dexa, 0,05 mg/orelha). Logo após os tratamentos, todos os grupos receberam a incidência de luz por 20 minutos no comprimento de onda entre 400 e 800 nm na intensidade de 100 mW/cm<sup>2</sup> uma vez ao dia até o final do experimento. O edema foi avaliado sempre 6 e 24 horas após a aplicação do Óleo de Cróton. Os grupos naive e veículo

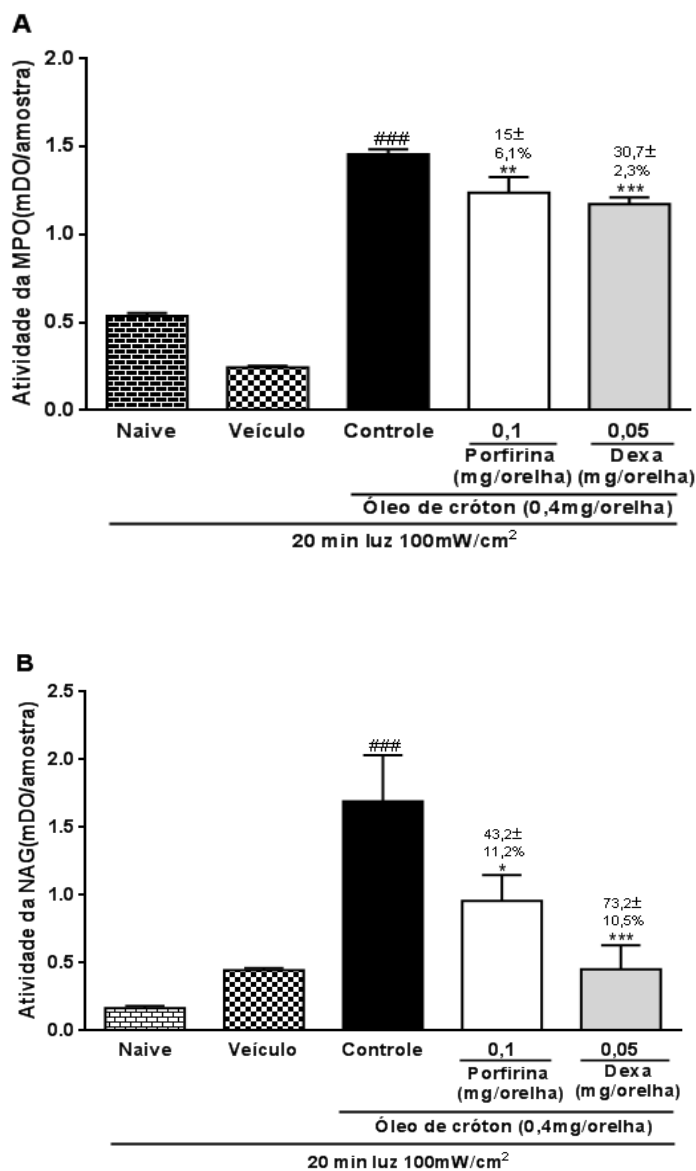
não receberam Óleo de Cróton; no entanto, o grupo veículo recebeu acetona (diluente dos tratamentos).

A Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, foi capaz de reduzir o edema pré-estabelecido pela múltipla aplicação de Óleo de Cróton, 6 horas após o primeiro dia de tratamento (5<sup>o</sup> dia de experimento), assim como a Dexametasona. Esta redução foi observada até o final do experimento, atingindo a redução máxima de  $50,9 \pm 6,9$  % ( $P < 0,001$ ) no terceiro dia de tratamento (7<sup>o</sup> dia de experimento) e  $43,6 \pm 10,2$ % ( $P < 0,001$ ) no último dia de tratamento (9<sup>o</sup> dia de experimento). Já a dexametasona reduziu  $70,8 \pm 10,2$  % ( $P < 0,001$ ) no último dia de tratamento (Figura 17).



**Figura 17. Efeito da Di-cis-Py+ no edema induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton.** O processo inflamatório crônico foi induzido com a aplicação tópica de óleo de cróton (0,4 mg/orelha) em dias alternados durante 9 dias. Di-cis-Py+ (0,1mg/orelha) e dexametasona (0,05 mg/orelha) foram aplicados topicamente, em seguida foi incidida a luz por 20 minutos no comprimento de onda entre 400 e 800 nm na intensidade de 100 mW/cm<sup>2</sup> em todos os grupos. O tratamento ocorreu durante 5 dias (1 vez ao dia) a partir do quinto dia do início da aplicação do óleo de cróton e a espessura da orelha medida diariamente. Os valores estão expressos como média ± EPM (n=10). \*\*\*p< 0,001; \*\*p< 0,01; ###p< 0,001 representam o nível de significância em relação ao controle e Naive que representa o grupo não tratado que recebeu somente a luz.

Da mesma forma que a MPO é expressa em neutrófilos ativados, a enzima NAG é expressa nos lisossomos de células mononucleares, como macrófagos ativados. Sua atividade pode ser quantificada indireta e colorimetricamente (DEAN, HYLTON *et al.*, 1979; SÁNCHEZ e MORENO, 1999).



**Figura 18. Efeito tópico da Di-*cis*-Py+ no modelo de indução de inflamação crônica mediado por aplicações múltiplas de óleo de cróton, e avaliação da atividade das enzimas MPO e NAG.** O óleo de cróton foi aplicado em dias alternados, durante nove dias. Os tratamentos com a Di-*cis*-Py+ (0,1 mg/orelha), dexametasona (0,05 mg/orelha) com incidência de luz por 20 minutos no comprimento de onda entre 400 e 800 nm, começaram no quinto dia de experimento, uma vez ao dia. A espessura da orelha foi medida diariamente. No último dia de experimento as amostras da orelha foram coletadas e homogeneizadas em HTAB. A partir do sobrenadante foram realizados os ensaios para as atividades enzimáticas da MPO (A) e NAG (B). Os valores estão expressos como média ± EPM (n=10). Símbolos indicam os níveis de significância para: \* P <0,05; \*\* P <0,01; \*\*\* P <0,001 quando comparado ao grupo controle; ### P <0,001 quando comparado ao grupo naive, não tratado.

A administração múltipla de óleo de cróton no modelo de edema crônico também promoveu o aumento da atividade das enzimas MPO e NAG, as quais são utilizadas como indicativo de migração celular para o foco inflamatório. O tratamento tópico com a Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, foi capaz de inibir a atividade da enzima MPO, apresentando inibição máxima de  $15 \pm 6,1\%$  ( $P < 0,01$ ) (0,1 mg/orelha), assim como a dexametasona a qual promoveu inibição de  $30,7 \pm 2,3\%$  ( $P < 0,001$ ) (Figura 18A).

Assim como a MPO, o tratamento tópico com a Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, foi capaz de inibir a atividade da enzima NAG apresentando inibição máxima de  $43,4 \pm 11,2\%$  ( $P < 0,05$ ) (0,1 mg/orelha), assim como a dexametasona a qual, promoveu inibição de  $73,2 \pm 10,5\%$  ( $P < 0,001$ ) (Figura 18B).

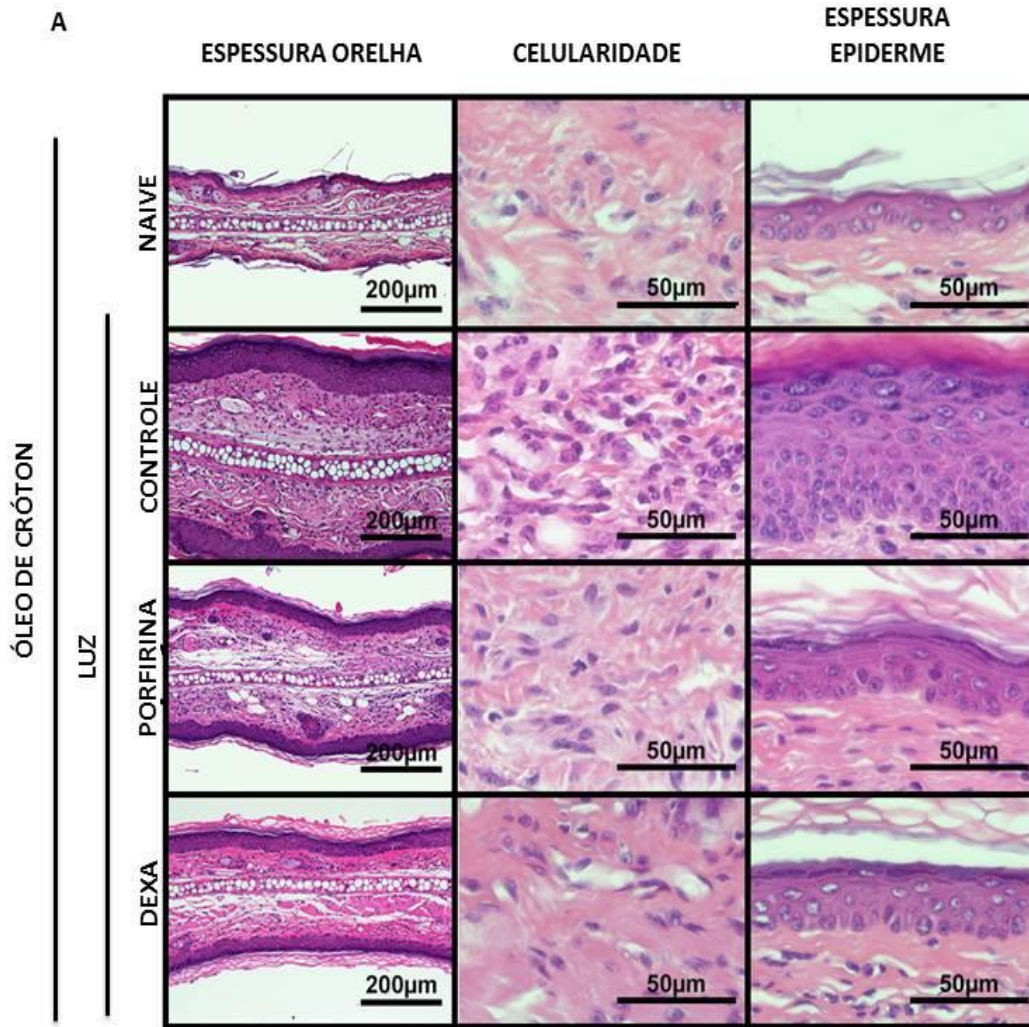
A hiperproliferação da epiderme é outra característica do modelo de edema de orelha induzido pela múltipla aplicação de óleo de cróton e esta relacionada com doenças de pele hiperproliferativas, como a psoríase.

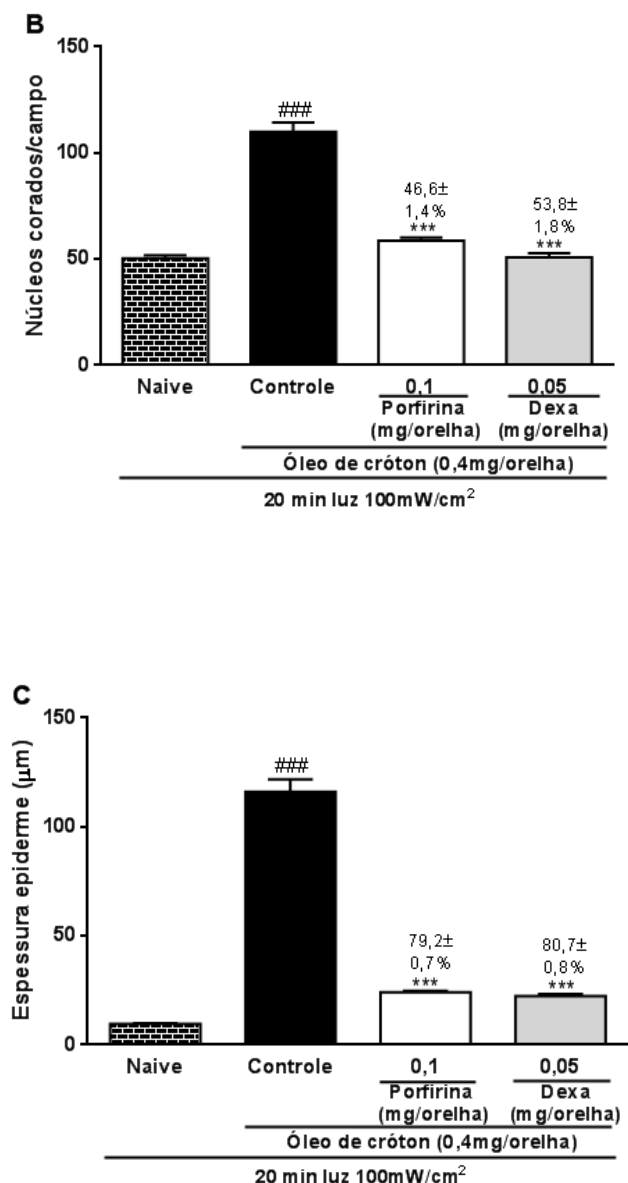
A análise através das fotos representativas do corte histológico, mostra o espessamento acentuado da epiderme e derme, infiltrado inflamatório mononuclear dérmico no grupo controle, a aplicação tópica de 0,1 mg/orelha de Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, foi capaz de reduzir o espessamento da epiderme, o infiltrado inflamatório dérmico chegando quase aos parâmetros do grupo que recebeu tratamento com a dexametasona (Figura 19A)

A aplicação tópica de 0,1 mg/orelha de Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, bem como de 0,05 mg/orelha de dexametasona, foram capazes de reduzir tanto o espessamento da epiderme quanto a celularidade.

De acordo com a Figura 19B a redução na celularidade foi de  $46,6 \pm 1,4\%$  ( $P < 0,001$ ) no grupo tratado com a porfirina Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, enquanto o grupo dexametasona reduziu em  $53,8 \pm 1,8\%$  ( $P < 0,001$ ).

A espessura da epiderme foi mensurada, de acordo com a Figura 19C, ocorre redução na espessura de  $79,2 \pm 0,7$  ( $P < 0,001$ ) no grupo tratado com a porfirina Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, já o grupo dexametasona reduziu a espessura em  $80,7 \pm 0,8\%$  ( $P < 0,001$ ).





**Figura 19. Imagens representativas da análise histológica do efeito da Di-*cis*-Py+ sobre alterações histológicas no modelo de indução de inflamação crônica mediado por aplicações múltiplas de óleo de cróton.** As amostras foram coletadas no 9<sup>o</sup> dia de experimento e processadas de acordo com o procedimento de histologia para coloração de hematoxilina-eosina (A). Fotos representativas foram tiradas a partir de lâminas coradas (aumento de 200-400x / escala 200-50µm) e analisadas. Avaliação da celularidade através do número total de núcleos corados com HE em células da derme (B). Espessura da epiderme avaliada em imagens coradas com HE (C). Barras representam a média ± EPM para (n = 6-10). Os símbolos indicam os níveis de significância para: \*\*\* P <0,001 quando comparado ao grupo veículo; ### P <0,001 quando comparado ao grupo naive, não tratado com a Porfirina.

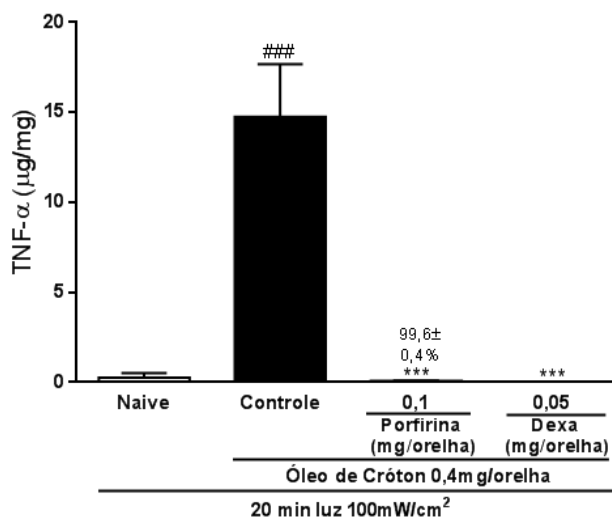


Através da contagem dos núcleos corados, verificam-se alterações no número de células nos grupos tratados com a Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, complementando os resultados observados nos ensaios de edema e atividade das enzimas MPO e NAG.

Outro parâmetro avaliado no modelo crônico para confirmar a ação antiinflamatória da Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, foi avaliar os níveis de citocinas pró- inflamatórias induzidas pela múltipla aplicação de Óleo de cróton que estão presentes no processo de Psoríase.

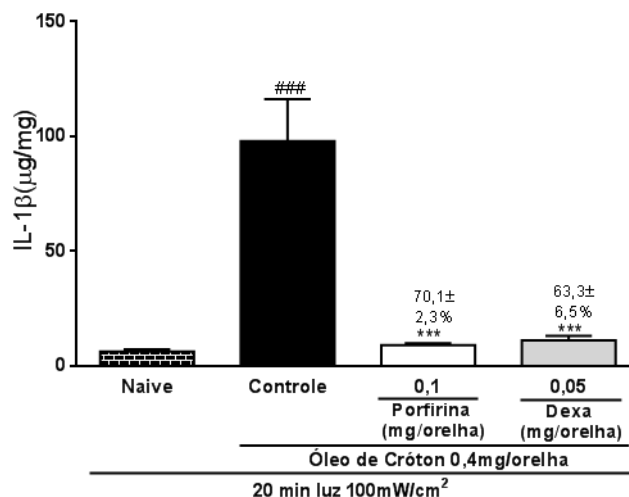
O tratamento tópico com a Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, inibiu os níveis das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6.

A Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, promoveu inibição da liberação de TNF- $\alpha$  em  $99,6 \pm 0,4\%$  ( $P < 0,001$ ) na dose de 0,1mg/orelha, assim como a dexametasona(0,05 mg/orelha) inibiu a níveis basais (Figura 20).



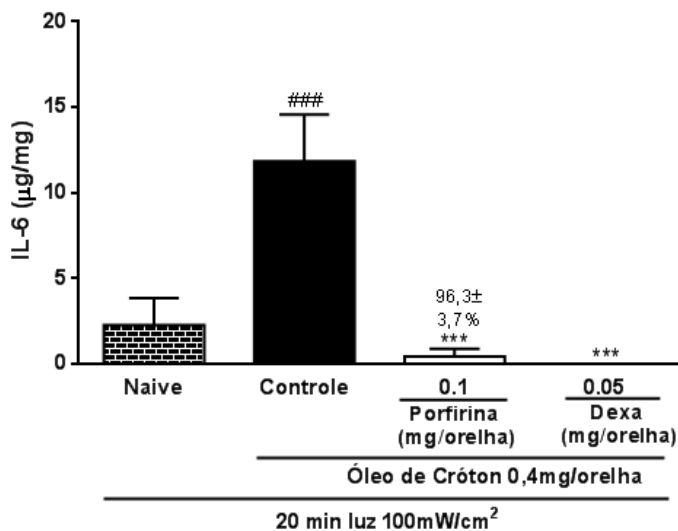
**Figura 20. Efeito da Di-*cis*-Py+ fotoativada sobre os níveis de TNF- $\alpha$  no modelo de inflamação induzido pela múltipla aplicação de Óleo de cróton.** O processo inflamatório foi induzido com a aplicação tópica de óleo de cróton (0,4 mg/orelha) em dias alternados durante 9 dias. Di-*cis*-Py+ (0,1mg/orelha) e dexametasona (0,05 mg/orelha) foram aplicados topicamente, em seguida foi incidida a luz por 20 minutos no comprimento de onda entre 400 e 800 nm na intensidade de 100 mW/cm<sup>2</sup> em todos os grupos. O tratamento ocorreu durante 5 dias (1 vez ao dia) a partir do quinto dia do início da aplicação do óleo de cróton e a espessura da orelha medida diariamente. No último dia de tratamento as amostras de tecido (6 mm) foram retiradas e utilizadas para a quantificação dos níveis de TNF- $\alpha$  por Kit ELISA. As barras representam a média  $\pm$  EPM (n=6). Os símbolos representam o índice de significância quando comparados com o grupo naive ###  $P < 0,00$  e com o grupo controle \*\*\*  $P < 0,001$ .

A inibição dos níveis de IL-1 $\beta$  foi de 70,1  $\pm$  2,5% ( $P < 0,001$ ) na dose 0,1 (mg/orelha) pela aplicação da Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, durante os 5 dias de tratamento, enquanto a dexametasona promoveu inibição de 63,3  $\pm$  6,5% ( $P < 0,001$ ) (0,05 mg/orelha) (Figura 21).



**Figura 21. Efeito da Di-*cis*-Py+ fotoativada sobre os níveis de IL-1β no modelo de inflamação induzido pela múltipla aplicação de Óleo de cróton.** O processo inflamatório crônico foi induzido com a aplicação tópica de óleo de cróton (0,4 mg/orelha) em dias alternados durante 9 dias. Di-*cis*-Py+ (0,1mg/orelha) e dexametasona (0,05 mg/orelha) foram aplicados topicamente, em seguida foi incidida a luz por 20 minutos no comprimento de onda entre 400 e 800 nm na intensidade de 100 mW/cm<sup>2</sup> em todos os grupos. O tratamento ocorreu durante 5 dias (1 vez ao dia) a partir do quinto dia do início da aplicação do óleo de cróton e a espessura da orelha medida diariamente. No último dia de tratamento as amostras de tecido (6 mm) foram retiradas e utilizadas para a quantificação dos níveis de IL-1β por ELISA. As barras representam a média ± EPM (n=6). Os símbolos representam o índice de significância quando comparados com o grupo naive ###  $P < 0,00$  e com o grupo controle \*\*\*  $P < 0,001$ .

De maneira semelhante, a inibição dos níveis de IL-6 foi de  $96,3 \pm 3,7\%$  ( $P < 0,001$ ) na dose 0,1 (mg/orelha) pela aplicação da Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, durante os 5 dias de tratamento, enquanto a dexametasona promoveu inibição a níveis basais (Figura 22).

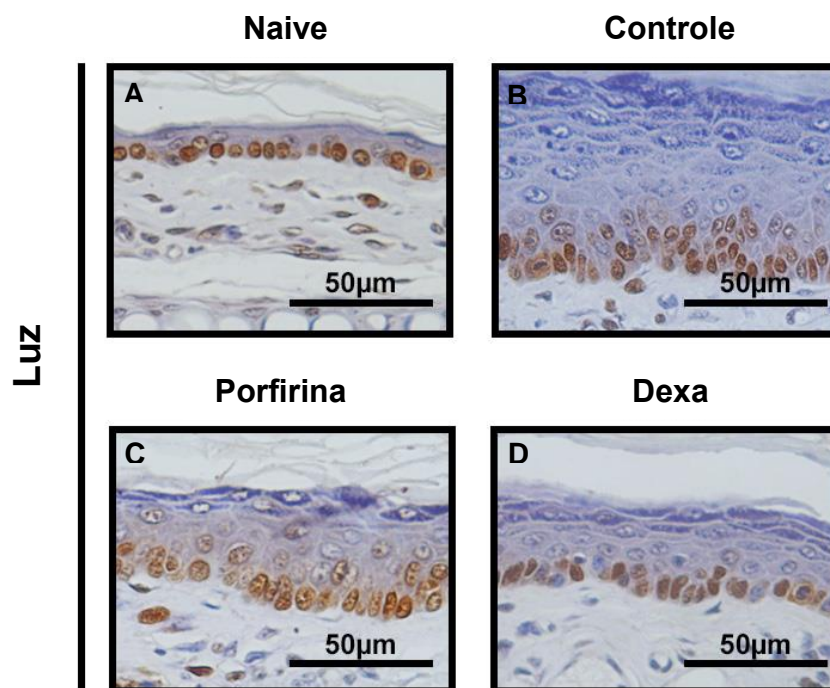


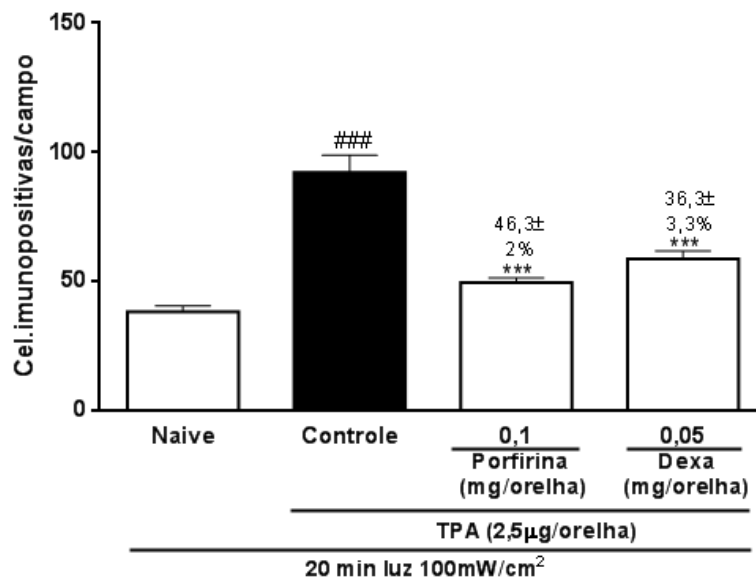
**Figura 22. Efeito da Di-*cis*-Py+ fotoativada sobre os níveis de IL-6 no modelo de inflamação induzido pela múltipla aplicação de Óleo de cróton** O processo inflamatório foi induzido com a aplicação tópica de óleo de cróton (0,4 mg/orelha) em dias alternados durante 9 dias. Di-*cis*-Py+ (0,1mg/orelha) e dexametasona (0,05 mg/orelha) foram aplicados topicamente, em seguida foi incidida a luz por 20 minutos no comprimento de onda entre 400 e 800 nm na intensidade de 100 mW/cm<sup>2</sup> em todos os grupos. O tratamento ocorreu durante 5 dias (1 vez ao dia) a partir do quinto dia do início da aplicação do óleo de cróton e a espessura da orelha medida diariamente (A). No último dia de tratamento as amostras de tecido (6 mm) foram retiradas e utilizadas para a quantificação dos níveis de IL-6 por ELISA. As barras representam a média ± EPM (n=6). Os símbolos representam o índice de significância quando comparados com o grupo naive ###  $P < 0,00$  e com o grupo controle \*\*\*  $P < 0,001$ .

Para confirmar que o efeito sobre a espessura da epiderme ocorre através da atividade antiproliferativa, os cortes histológicos foram submetidos à análise imunohistoquímica para a verificação do marcador de proliferação celular PCNA (Figura 23A).

A aplicação do óleo de cróton promoveu um aumento no número de células positivas para PCNA e esse aumento foi reduzido pela aplicação tópica de Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, assim como pela aplicação da dexametasona,

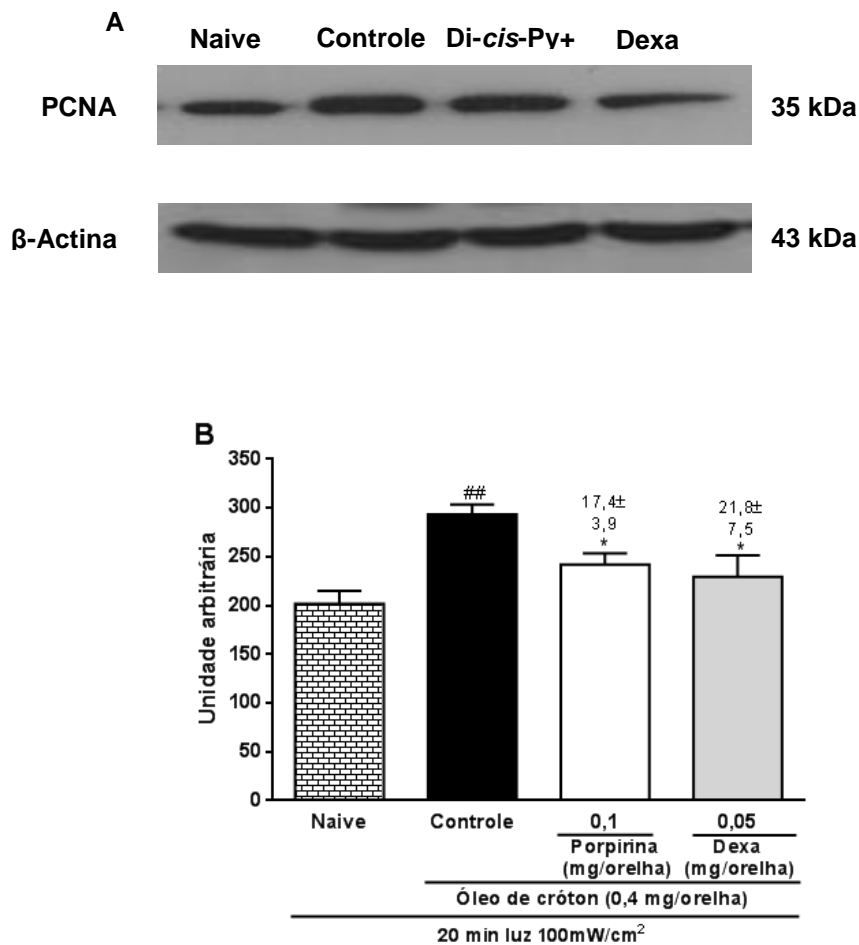
apresentando uma diminuição no número de células positivas para PCNA de  $46,3 \pm 2,0\%$  ( $P < 0,001$ ) e  $36,3 \pm 3,3\%$  ( $P < 0,001$ ), respectivamente (Figura 23B)





**Figura 23. Efeito da Di-*cis*-Py+ fotoativada (0,1 mg/orelha) sobre a expressão epidérmica de PCNA induzida pela aplicação múltipla de óleo de cróton.** A análise foi realizada através de imunohistoquímica e a quantificação realizada através da contagem das células positivas para PCNA com aumento de 400x em dez campos distintos de cada corte histológico de seis animais de cada grupo. As barras verticais representam a média ± EPM (n=6). Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle (C) ou naive (N), respectivamente.\*\*\*, ###  $P < 0,001$ .

Com o intuito de confirmar a redução proliferação celular após o tratamento da Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, a quantificação do PCNA foi realizada (Figura 24A). O grupo controle apresentou aumento dos níveis protéicos de PCNA os quais foram reduzidos no grupo que recebeu o tratamento com a Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, em  $17,4 \pm 3,9\%$  ( $P < 0,001$ ). Da mesma forma, o grupo dexametasona apresentou redução dos níveis de PCNA em  $21,8 \pm 7,5\%$  ( $P < 0,001$ ) (Figura 24B).



**Figura 24. Avaliação da proliferação dos níveis de antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) no modelo com múltipla aplicação de Óleo de cróton.** Homogenatos de orelhas induzidas com Óleo de cróton (controle) e tratadas com Di-cis-Py+ (0,1 mg/orelha) e dexametasona (0,05mg/kg). (A) Representação do níveis protéicos de PCNA (B) diagrama com quantificação de imunoblots. Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo naive (N) e grupo controle. ##  $P < 0,01$ , \*  $P < 0,05$ , respectivamente.

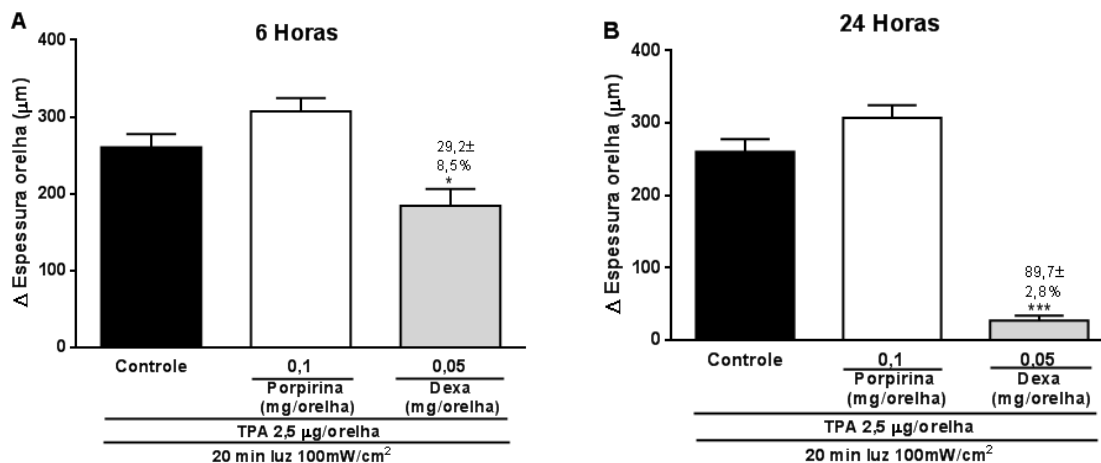
#### **5.4 Avaliação do possível efeito sistêmico da administração tópica de Di-*cis*-Py+, quando fotoativada.**

Após os resultados obtidos, mostrou-se interesse em verificar se ocorre uma possível ação sistêmica da Di-*cis*-Py+, quando fotoativada.

Porém conforme, Figura 25 A, após 6 horas do início do tratamento na orelha oposta à induzida com TPA, não ocorreu redução do edema conforme visto anteriormente em todos os tratamentos com Di-*cis*-Py+, quando fotoativada. Já o grupo dexametasona  $29,2 \pm 8,5\%$  pode-se verificar uma ação significativa quando comparado ao grupo controle

Após 24 horas (Figura 25B) do tratamento, verificou-se uma redução do edema significativa mais elevada do grupo dexametasona em  $89,7 \pm 2,8\%$  quando comparado ao grupo controle, o que não acontece com o grupo Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, mantendo o edema.

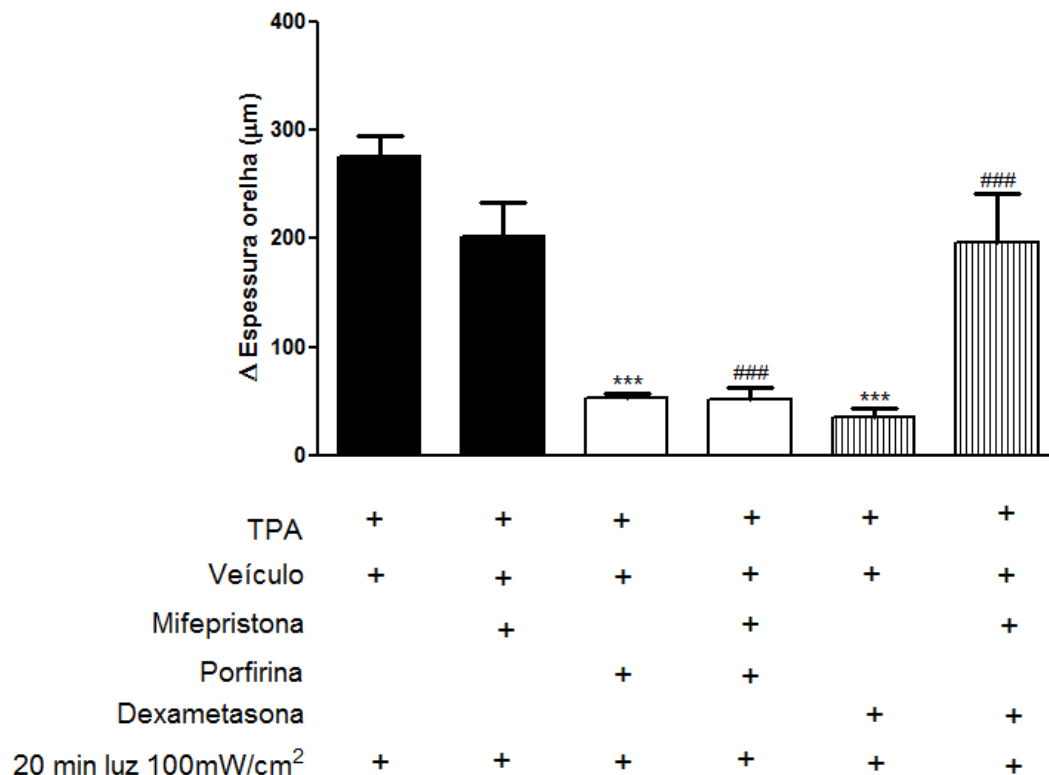




**Figura 25. Efeito da aplicação tópica de Di-*cis*-Py+ em orelha oposta no modelo de inflamação aguda induzida por TPA.** O grupo controle recebeu o agente flogístico (TPA 2,5μg/orelha) para indução do processo inflamatório. O tratamento com a dose de Di-*cis*-Py+ (0,1 mg/orelha) e dexametasona (0,05 mg/orelha) foram aplicados na orelha oposta à aplicação do agente flogístico, seguido pela incidência de luz por 20 minutos no comprimento de onda entre 400 e 800 nm, na intensidade de 100 mW/cm<sup>2</sup>. O edema na orelha foi medido 6 h (A) e 24 h (B) após a indução com o TPA. As barras representam a média ± EPM para (n = 6-10). Os símbolos indicam os níveis de significância para: \* P<0,05; \*\*\* P <0,001 quando comparado com o grupo controle.

### 5.5 Avaliação da interação da Di-*cis*-Py+ fotoativada com os receptores glicocorticoides.

Uma vez que as respostas verificadas até o momento com a Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, mostraram-se eficazes em todos os parâmetros de maneira semelhante à eficácia da dexametasona, tornou-se interessante investigar se a Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, estaria agindo por mecanismos parecidos com os dos glicocorticoides.



**Figura 26. Reversão da atividade antiedematogênica de Di-*cis*-Py+ fotoativada e dexametasona pela mifepristona.** A Di-*cis*-Py+ (0,1 mg/orelha) fotoativada e a dexametasona (0,05 mg/orelha) foram aplicados por via tópica imediatamente após o TPA. A mifepristona (50 mg/Kg, s.c.) foi administrada 30 minutos antes dos tratamentos. Veículo: polietilenoglicol 400, utilizado para a diluição da mifepristona. As barras verticais representam a média  $\pm$  EPM (n=7-10). O aumento da espessura da orelha foi verificado 6 horas após a aplicação do TPA. Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo TPA+Mifepristona ou aos grupos pré-tratados com mifepristona, respectivamente \*\*\*, ###  $P < 0,001$ .

Na tentativa de identificar um possível alvo do mecanismo de ação da Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, a mifepristona (antagonista dos receptores de glicocorticoides) foi administrada por via subcutânea nos animais, 30 minutos antes dos tratamentos. A aplicação tópica de TPA promoveu um aumento significativo na

espessura das orelhas dos animais, as quais não sofreram alteração com a administração do veículo (PEG 400) por via subcutânea.

Como observado na Figura 25, a aplicação tópica da Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, e da dexametasona inibiram a formação de edema em  $84,2 \pm 3,4\%$  ( $P < 0,001$ ) e  $42,8 \pm 14,8\%$  ( $P < 0,001$ ), respectivamente, sendo que o pré-tratamento com mifepristona foi capaz de inibir a resposta antiedematogênica somente da dexametasona, promovendo reversão total do efeito observado. Esse efeito não acontece com a Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, mostrando uma ação edematogênica semelhante à dexametasona, porém sua ação não ocorre através de receptores corticosteróides.

## 6 DISCUSSÃO

Psoríase é uma doença inflamatória crônica sendo conhecida como a mais prevalente das doenças autoimunes em humanos. Sua etiologia ainda é pouco compreendida; acredita-se que seja resultado de vários fatores complexos como fator genético, disfunção imune, meio ambiente e rompimento da barreira da pele (BELGE, BRUCK *et al.*, 2014; RAYCHAUDHURI, MAVERAKIS *et al.*, 2014).

O tratamento dos pacientes com psoríase é selecionado de acordo com o tipo e a gravidade do quadro. Quando ocorre um quadro leve, o tratamento consiste na aplicação de corticosteróides tópicos. Nos casos mais graves, um dos tratamentos é a irradiação com luz ultravioleta B (UVB), a qual tem efeito imunossupressor, afetando a proliferação e diferenciação de queratinócitos. Se não houver resposta terapêutica, outra opção é a luz UVA associada ao psoraleno (PUVA), que penetra mais profundamente que a radiação UVB. A maioria os pacientes com psoríase severa necessita de terapia oral com medicamentos sistêmicos. A primeira classe de medicamentos utilizados para o tratamento da psoríase por via oral são os imunossupressores como metotrexato e ciclosporina. Os agentes biológicos são os medicamentos mais recentes para psoríase, os quais interferem nas vias de patogênese da doença principalmente através da inibição na atividade de TNF- $\alpha$ , como Adalimumab, Infliximab e Etanercept (VILLASENOR-PARK, WHEELER *et al.*, 2012).

As opções terapêuticas são inúmeras e frequentes avanços têm sido feitos com tratamentos sistêmicos, terapias tópicas assim como também fototerapia e terapia

fotodinâmica. No entanto, todas as terapias existentes possuem limitações distintas. (BAKER, COLEMAN *et al.*, 2012; MARTHA-ESTRELLA GARCÍA-PÉREZ, 2012).

A fototerapia local tópica com PUVA (psoraleno e ultravioleta A) e UVB, bem como a terapia fotodinâmica têm sido cada vez mais utilizadas no tratamento local da psoríase. De acordo o trabalho de Almutawa *et.al.* 2015 no qual houve comparação de diferentes tratamentos, foi mostrado que a eficácia de pacientes com 77% nos pacientes tratados com PUVA, 61% nos pacientes tratados com UVB, e 22% nos tratamentos com TFD (ALMUTAWA, THALIB *et al.*, 2015). A terapia com PUVA tem ação anti-inflamatória e antiproliferativa com melhor estimativa no tratamento; no entanto menos tolerada do que fototerapia com UVB, e há mais evidências sobre seu potencial carcinogênico devido à modificação covalente do DNA celular, o que leva muitos pacientes a não concluírem o tratamento (RACZ e PRENS, 2015).

O tratamento com terapia fotodinâmica não induz modificação covalente no DNA celular, mas apresenta um potencial de promover efeitos genotóxicos pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), no entanto seu efeito é limitado ao local de ação, não produzindo fotoprodutos como na radiação UV, tendo um baixo risco de carcinogenicidade (FRITSCH, GOERZ *et al.*, 1998; MORTON, MCKENNA *et al.*, 2008).

Assim, a terapia fotodinâmica tem o potencial de atender muitas necessidades clínicas atuais. Embora ainda emergente, já é uma modalidade terapêutica bem sucedida e aprovada clinicamente para o tratamento de neoplasias e doenças

inflamatórias (AGOSTINIS, BERG *et al.*, 2011; LARISCH, VERWANGER *et al.*, 2014).

Um dos primeiros estudos que demonstraram a eficácia da terapia fotodinâmica no tratamento da psoríase foi realizado por Boehncke *et al.* 1994, onde demonstraram que a TFD com ALA (*ácido 5-aminolevulínico*) foi capaz de induzir os mesmos efeitos imunomoduladores daqueles induzidos por PUVA (BOEHNCKE, 1994). A Terapia Fotodinâmica já vem sendo utilizada em tratamentos e ensaios clínicos para o tratamento de psoríase (BISSONNETTE, *et al.* 2002; FRANSSON, *et al.*, 2005; SMITS, *et al.*, 2006), devido ao seu efeito não ser diretamente sobre o núcleo celular; sendo, assim, uma opção de tratamento mais segura do que os convencionais (REINHARD, *et al.* 2015).

Entre os compostos fotossensibilizadores utilizados para a TFD, as porfirinas e seus derivados metálicos desempenham um papel fundamental no metabolismo celular de diversos organismos. Além da sua ocorrência natural, uma grande variedade de porfirinas tem sido sintetizada para o uso clínico como agentes de contraste em tomografia de fluorescência, imagem radiológica, ressonância magnética nuclear e como fotossensibilizadores no tratamento de doenças através de terapia fotodinâmica (SUNSHINE, HOFRICHTER *et al.*, 1982; MORGAN; e DOLPHIN, 1987).

A toxicidade independente da incidência de luz de compostos fotossensibilizadores porfirínicos foi descrita por Mellish e colaboradores. Ao estudarem a citotoxicidade desses compostos *in vitro*, esses investigadores

mostraram que as maiores concentrações testadas foram capazes de causar toxicidade independente da fotoativação (MELLISH, COX *et al.*, 2002).

No presente estudo, os resultados de viabilidade celular com as concentrações mais elevadas (3 e 10  $\mu\text{M}$ ) de Di-*cis*-Py<sup>+</sup> sem fotoativação foram capazes de reduzir a viabilidade de células de linhagem HaCaT independente da fotoativação, levando à exclusão das concentrações que apresentam citotoxicidade no escuro, mantendo somente as concentrações que apresentaram citotoxicidade quando fotoativadas, visto que um fotossensibilizador para ser ideal, o mesmo não deve apresentar toxicidade no escuro (AGOSTINIS, *et al.* 2011).

As concentrações estudadas nos testes *in vitro* indicaram que a Di-*cis*-Py<sup>+</sup> não alterou a viabilidade celular da HaCaT quando não recebeu a fotoativação, mostrando ser uma molécula fotossensível eficaz nos tratamentos das células HaCaT somente após a fotoativação. Sendo assim é uma molécula promissora para estudos de redução da proliferação celular, assemelhando-se aos resultados obtidos por Sarrazy e colaboradores, no qual verificaram a diminuição da viabilidade de queratinócitos HaCaT após TFD com conjugado de porfirina-poliamina (SARRAZY, GARCIA *et al.*, 2011).

Os resultados do estudo *in vitro* corroboram outros trabalhos, nos quais os derivados porfirínicos necessitam de fotoativação para ter atividade fotossensibilizadora (LAMBRECHTS, AALDERS *et al.*, 2005; VALENTINA RAPOZZI, 2014).

A avaliação *in vitro* é uma ferramenta útil na triagem de compostos, ajudando no direcionamento da pesquisa e sendo capaz de mensurar efeitos tanto relacionados

com eficácia de um determinado produto quanto sua segurança. No entanto, modelos animais são necessários em um *screening* de compostos anti-psoriáticos, os quais devem mimetizar características clínicas, histológicas, celulares e moleculares da pele de pacientes com psoríase (SVENSSON, ROPKE *et al.*, 2012).

Dessa forma, a eficácia de compostos avaliados *in vitro* pode ser avaliada também em modelos tradicionais de inflamação cutânea *in vivo*, como o modelo de edema de orelha induzido por TPA (SVENSSON, ROPKE *et al.*, 2012).

O TPA é o principal éster de forbol do óleo de cróton o qual é extraído a partir da planta *Croton tiglium* L. pertencente à família *Euphorbiaceae*. Esse agente flogístico é capaz de provocar irritação e efeito vascular na pele, devido à ativação da proteína quinase C (PKC), a qual é responsável por uma série de eventos celulares que conduzem à inflamação, como o aumento de prostaglandinas e leucotrienos, resultando na formação de edema. O modelo experimental agudo induzido TPA promove quimiotaxia de leucócitos para o tecido, principalmente a migração de células polimorfonucleares (neutrófilos) (DE BERNARDIS, LEONARDI *et al.*, 1994; MURAKAWA, YAMAOKA *et al.*, 2006).

A infiltração dessas células pode ser inferida e indiretamente quantificada através da medida da atividade da enzima MPO; no entanto essa é somente uma das ferramentas úteis para avaliação do processo inflamatório, podendo ser refinada através da análise histológica, a qual avalia a celularidade no tecido afetado (MARQUEZ, DUNFORD *et al.*, 1990; MENDES, HORINOUCI *et al.*, 2012).

Os processos inflamatórios cutâneos representam a primeira linha de defesa do organismo contra patógenos, ocasionando uma intensa presença de infiltrado



leucocitário. Os polimorfonucleares, entre eles os neutrófilos, têm ação primordial na resposta inflamatória aguda (NEMETH e MOCSAI, 2012).

O sistema de defesa da pele frente a um agente estranho é composto de três mecanismos: barreira da pele, imunidade inata e a imunidade adquirida, onde esses mecanismos estão alinhados cronológicos, funcional e filogeneticamente. (TURVEY e BROIDE, 2010).

Cada camada tem papéis exclusivos para proteger o corpo contra agentes infecciosos específicos e perigos internos e/ou externos. O processo inflamatório surge como parte de um processo fisiológico de regeneração e proteção do organismo frente a um agente estranho. As doenças inflamatórias da pele são, originalmente, resultado dessas respostas protetoras e regeneradoras da pele contra infecção e agentes danosos ao organismo (DAINICHI, HANAKAWA *et al.*, 2014).

Além da indução dos prostanóides, o TPA pode levar à indução e expressão de diversos mediadores imunológicos como citocinas e quimiocinas (STANLEY, STEINER *et al.*, 1991; GÁBOR, 2003). As citocinas são pequenas moléculas, produzidas em células ativadas por agentes inflamatórios (BORISH e STEINKE, 2003; NEDOSZYTKO, SOKOLOWSKA-WOJDYLO *et al.*, 2014). Na pele estas são produzidas por células residentes, tais como queratinócitos, células de Langerhans, melanócitos, mastócitos, macrófagos e por células recrutadas dos infiltrados inflamatórios: neutrófilos, eosinófilos e linfócitos (BORISH e STEINKE, 2003; NEDOSZYTKO, SOKOLOWSKA-WOJDYLO *et al.*, 2014).

As citocinas controlam todas as fases da resposta imune, regulando os mecanismos da imunidade inata e adaptativa, alterando proliferação celular,

diferenciação e ativação de linfócitos B e T, assim como de NK, monócitos/macrófagos, granulócitos e queratinócitos. Influenciam, também, a função e migração de neutrófilos, mastócitos, basófilos e eosinófilos através da ativação de moléculas de adesão e ativação de síntese de fatores quimiotáticos (BORISH e STEINKE, 2003; NEDOSZYTKO, SOKOLOWSKA-WOJDYLO *et al.*, 2014).

Interleucina-1 e TNF- $\alpha$  são citocinas inflamatórias primárias produzidas durante a resposta celular a estímulos inflamatórios levando à ativação da célula e produção de citocinas inflamatórias secundárias como IL-6, IL-8, IL -12, IL-15, IL-17, IL-18. (BAGGIOLINI, 2001; GERARD e ROLLINS, 2001; BORISH e STEINKE, 2003; CHARO e RANSOHOFF, 2006; MABUCHI, CHANG *et al.*, 2012; NEDOSZYTKO, SOKOLOWSKA-WOJDYLO *et al.*, 2014).

No modelo de inflamação aguda induzida por TPA, há o aumento de alguns parâmetros inflamatórios assim como edema, MPO, infiltrado celular e citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . A porfirina Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, foi capaz de reduzir esses parâmetros assemelhando-se ao tratamento com dexametasona, mostrando ser uma molécula com atividade anti-inflamatória.

Uma vez que a Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, foi capaz de reduzir os parâmetros inflamatórios no modelo agudo. E, conseqüentemente, a melhora da resposta inflamatória. A análise histológica confirmou a possível ação anti-inflamatória com redução das células inflamatórias na epiderme quando comparada ao grupo controle, confirmando a ação anti-inflamatória da porfirina Di-*cis*-Py+ quando fotoativada.

Existem vários estudos a respeito da biossíntese e degradação de derivados porfirínicos, além de seus efeitos em tratamentos oncológicos, porém pouco se sabe sobre suas propriedades anti-inflamatórias, sugerindo um potencial modulatório dos derivados porfirínicos no processo inflamatório. Além disso, cada vez mais se observa o aumento de derivados porfirínicos em aplicação terapêutica, particularmente àquelas relacionadas com o processo inflamatório (JELIC, TATIC *et al.*, 2012).

O processo inflamatório é desencadeado por diversos tipos de insultos ao tecido. Se este processo for persistente, a fase inicialmente benéfica torna-se crônica, podendo gerar danos ao tecido. Alguns fatores contribuem para o processo inflamatório crônico, como o prolongamento da inflamação aguda, ativação do sistema imune adaptativo através de estímulo persistente, evoluindo para um processo crônico no qual células especializadas do sistema imune são recrutadas. O influxo de neutrófilos é substituído por componentes celulares que inclui fagócitos mononucleares e células T (ALLER, ARIAS *et al.*, 2007; POBER e SESSA, 2007; AOKI e NARUMIYA, 2012).

O modelo de edema induzido por múltiplas aplicações de óleo de cróton é bem conhecido. Por meio deste modelo podem ser avaliadas respostas inflamatórias da pele (DE YOUNG, KHEIFETS *et al.*, 1989; GÁBOR, 2003), auxiliando no melhor entendimento do possível papel da Di-*cis*-Py+ no processo inflamatório e hiperproliferativo.

No modelo de edema induzido por múltiplas aplicações de óleo de cróton, o pico de migração de leucócitos polimorfonucleares para o local inflamado é observado no

terceiro dia; já no quarto dia o perfil leucocitário se altera de acordo com o aumento no número de macrófagos, atingindo seu ápice no décimo dia. É possível também observar uma reação inflamatória prolongada caracterizada pela hiperplasia da epiderme e infiltração de células inflamatórias (RAHMAN, BHATIA *et al.*, 2008).

De forma semelhante à MPO, a qual é expressa nos neutrófilos, a enzima NAG é expressa nos lisossomos de linfócitos mononucleares, como macrófagos e monócitos (DEAN, HYLTON *et al.*, 1979; SÁNCHEZ e MORENO, 1999).

Nesse estudo, no modelo de inflamação induzido por múltiplas aplicações de óleo de cróton, foi possível observar o aumento de alguns parâmetros característicos do modelo, entre eles a espessura da orelha, atividade das enzimas MPO e NAG, as quais estão relacionadas com a infiltração de células polimorfo e mononucleares, respectivamente, para o local inflamado; porém o tratamento com a Di-*cis*-Py+ fotoativada reduziu a espessura da orelha e a atividade dessas enzimas, comprovando mais uma vez que o sucesso do tratamento com a Di-*cis*-Py+ pode estar relacionado com sua atividade anti-inflamatória.

A psoríase apresenta um infiltrado inflamatório dérmico com várias células imunológicas, uma pronunciada proliferação dos queratinócitos e células endoteliais que podem, por sua vez, desencadear a resposta inflamatória (HEYDENDAEL, SPULS *et al.*, 2003). É classificada como uma doença relacionada à autoimunidade, caracterizada por uma inflamação crônica na ausência de um agente infeccioso conhecido ou antígenos, sendo essa inflamação um denominador comum no processo da doença (DAVIDSON e DIAMOND, 2001, NEDOSZYTKO, SOKOLOWSKA-WOJDYLO *et al.*, 2014).

Nessa doença ocorre o aumento da expressão cutânea e sistêmica de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, a composição celular do infiltrado inflamatório no interior de placas psoriáticas, bem como a hiperproliferação de queratinócios, parecem ser influenciados por essas citocinas (RODRIGUEZ-CERDEIRA, MOLARES-VILA *et al.*, 2014).

Também é observado nas lesões psoriáticas um aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias: TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, IL-18 juntamente com a diminuição da concentração de citocinas anti-inflamatórias: IL-10 e IL-4. O TNF- $\alpha$ , IL-17 e IFN- $\gamma$  parecem desempenhar um papel-chave no desenvolvimento de lesões psoriáticas (KRUEGER e BOWCOCK, 2005; SHAW, KIMBER *et al.*, 2012; NEDOSZYTKO, SOKOLOWSKA-WOJDYLO *et al.*, 2014).

Nas lesões psoriáticas, a hiperproliferação e o defeito na diferenciação terminal de queratinócitos atrapalham na formação da barreira. A infiltração de células ativadas do sistema imune leva à inflamação, e a interação desses dois tipos celulares perpetua a doença (LOWES, BOWCOCK *et al.*, 2007; ROBERSON e BOWCOCK, 2010).

As células do sistema imune inato produzem citocinas-chave. Os queratinócitos produzem as citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ; as células T- NK produzem TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ; células dendríticas plasmocitóides produzem IFN- $\gamma$  e macrófagos produzem TNF- $\alpha$ . Essas citocinas produzidas em um primeiro momento são capazes de ativar células dendríticas mieloides, as quais apresentam antígenos e secretam mediadores como IL-12 e IL-23, levando à diferenciação das células T naive em células Th17 e Th1. Cada uma é responsável pela secreção de diferentes

mediadores. As células Th1 secretam TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ; já as células Th17 secretam IL-17A, IL-17F e IL-22. Todos esses mediadores são capazes de ativar queratinócitos e induzir a produção de peptídeos antimicrobianos, citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ ) e quimiocinas. Esses mediadores fazem *feedback* para o ciclo da psoríase e configuram o infiltrado inflamatório com a proliferação do queratinócitos (FRANK O. NESTLE, 2009; NESTLE, KAPLAN *et al.*, 2009).

Sabe-se que os queratinócitos psoriáticos são fonte de peptídeos antimicrobianos, os quais possuem, além da função antimicrobiana, função quimiotática e do controle da função imune, incluindo àquela das células dendríticas e células T (BUCHAU e GALLO, 2007).

O transporte das células T da derme para a epiderme é um evento fundamental no processo da psoríase. As células T psoriáticas secretam, predominantemente, IFN- $\gamma$  e IL-17. As células Th17 são especializadas na imunovigilância do epitélio e também secretam (além de IL-17) IL-22, uma citocina capaz de ligar efetores imunes adaptativos e desregulação epitelial na psoríase. IL-22 induz a proliferação de queratinócitos e produção de peptídeos antimicrobianos, além de quimiocinas (FRANK O. NESTLE, 2009).

A rede de citocinas na psoríase indica um papel central das citocinas pró-inflamatória, incluindo TNF- $\alpha$  (NICKOLOFF, XIN *et al.*, 2007). Esse fato pode ser comprovado pelo fato de a terapia anti-TNF ser usada no tratamento da psoríase com sucesso (REICH, NESTLE *et al.*, 2005).

Estudos tem revelado que lesões de psoríase apresentam anormalidade nas citocinas e, conseqüentemente, alteração na regulação do sistema imune

(NICKOLOFF e NESTLE, 2004). As citocinas são capazes de regular as reações imunes e inflamatórias e interagir com o sistema endócrino e nervoso. Como não são pré-formadas ou estocadas, elas são liberadas brevemente em eventos limitados, como resultado da ativação celular após síntese iniciada pela transcrição gênica (BROTAS; CUNHA; *et al.*, 2012).

Na psoríase, várias citocinas, entre elas IL-1 $\beta$  e IL-6, atuam em diferentes etapas e são de extrema importância para a regulação da diferenciação de células Th17 a partir de células T naive em seres humanos. (VELDHOEN, HOCKING *et al.*, 2006; NURIEVA, YANG *et al.*, 2007).

Embora haja baixa expressão de receptores para uma citocina em uma célula, sua afinidade é bastante alta, sendo capaz de desencadear vários efeitos biológicos, como diferenciação de linfócitos em células Th1, Th2 ou Th17, proliferação celular ou apoptose (BROTAS; CUNHA; *et al.*, 2012).

A IL-1 merece destaque nos processos inflamatórios. É conhecida como uma citocina primária, uma vez que pode iniciar, de forma independente, uma série de mecanismos capazes de desencadear inflamação (STEINHOFF e LUGER, 2005). Os queratinócitos são os maiores produtores de IL-1 na pele. Uma vez liberada, IL-1 pode estimular a angiogênese, aumentando a expressão de moléculas de adesão, ativar células T, induzir a síntese de outras citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$ , GM-CSF e promover a proliferação de queratinócitos, levando ao desenvolvimento de novas lesões de psoríase em alguns pacientes (BOYD e NELDNER, 1990; SANCHEZ, 2010). IL-1 pode regular 388 genes, incluindo àqueles associados com

proteólise, adesão celular, transdução de sinais e diferenciação epidérmica aberrante observada na psoríase (YANO, BANNO *et al.*, 2008).

De forma geral, IL-1 se refere a duas citocinas, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Embora possuam ações similares e se liguem ao mesmo receptor, elas são codificadas por genes diferentes (GABAY, LAMACCHIA *et al.*, 2010). IL-1 $\alpha$  é expressa como uma proteína intracelular e é liberada durante estresse mecânico ou qualquer evento que leve à inflamação local dos queratinócitos. IL-1 $\beta$  é sintetizada como uma molécula inativa e secretada no tecido vizinho ou corrente sanguínea após clivagem da caspase-1 (SANMIGUEL, OLARU *et al.*, 2009). A ativação local de linfócitos nos locais da injúria parece ser uma alteração central na psoríase e seu influxo precede a infiltração de neutrófilos. A interação entre células T e queratinócitos é importante na patogênese da doença por causa da secreção de citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento na pele psoriática (STEINHOFF e LUGER, 2005, BROTAS; CUNHA, *et al.*, 2012).

Outra citocina fundamental no processo da psoríase é a IL-6, uma citocina pertencente a uma grande família que consiste em uma glicoproteína de 21-26 kDa (KEITH, ALBERT *et al.*, 1994). Por ser uma citocina pleiotrópica, pode-se destacar a regulação da expressão de outras citocinas, proliferação e diferenciação celulares e inibição de crescimento tumoral, bem como a indução das proteínas de fase aguda nas reações inflamatórias. Ela está presente na pele normal humana e é imunologicamente detectada nos queratinócitos da camada basal, células endoteliais, fibroblastos e células mononucleares (CASTELLS-RODELLAS, CASTELL *et al.*, 1992). Também participa ativamente da regulação endógena de



diversos processos fisiológicos, induz a proliferação e a diferenciação de células mielóides, maturação de linfócitos B, a ativação e diferenciação de linfócitos T (ATAIE-KACHOIE, POURGHOLAMI *et al.*, 2013).

A IL-6 age como mitógeno autócrino na epiderme psoriática, atuando em sinergismo com IL-1 e TNF- $\alpha$ ; dessa forma, contribuindo para a hiperproliferação celular (CASTELLS-RODELLAS, CASTELL *et al.*, 1992; BROTAS, CUNHA *et al.*, 2012). Há aumento de níveis de IL-6 nas lesões psoriáticas quando comparado com pele de pacientes saudáveis (ALENIUS, ERIKSSON *et al.*, 2009).

IL-6 e TNF- $\alpha$  são redundantes em vários aspectos funcionais; ambos estimulam a produção de proteínas de fase aguda, aumentam a velocidade da sedimentação de eritrócitos e aumentam a proliferação de queratinócitos, os quais são observados nos pacientes com a forma pustular generalizada em pacientes com a forma eritrodérmica (NEUNER, URBANSKI *et al.*, 1991; BROTAS, CUNHA *et al.*, 2012). Além disso, essas duas citocinas encontradas em altas concentrações em pacientes com psoríase. TNF- $\alpha$  também é capaz de aumentar a ação de NF- $\kappa$ B (fator de transcrição nuclear de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8, ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina), através do aumento da degradação da sua proteína inibitória, a I- $\kappa$ B. Quando estimulado, aumenta a resposta inflamatória e inibe a apoptose de queratinócitos (GOTTLIEB, 2001).

O TNF- $\alpha$  é a citocina mais estudada por causa do aumento da sua expressão na pele e no soro de pacientes, além da sua eficácia terapêutica através de seus inibidores específicos (WOLLINA e KONRAD, 2002; BROTAS, CUNHA *et al.*, 2012). O bloqueio de citocinas, particularmente de TNF- $\alpha$ , em doenças imunoinflamatórias

tem levado a grandes avanços nos últimos anos na medicina (MOLLER e VILLIGER, 2006).

Monócitos e macrófagos são as principais células relacionadas com a produção de TNF- $\alpha$ , mas outras células imunes também são capazes de sintetizar TNF- $\alpha$ , como células NK, basófilos, eosinófilos, neutrófilos e linfócitos T e B, bem como células não relacionadas ao sistema imune, como astrócitos, células da glia, neurônios, osteoblastos, células musculares lisas e células tumorais (VASSALLI, 1992; BAZZONI e BEUTLER, 1996, BROTAS, CUNHA *et al.*, 2012).

Constitutivamente ou por estimulação o TNF- $\alpha$  pode ser produzido pela maioria das células da pele, como queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e outras células dendríticas, células T ativadas, macrófagos, fibroblastos e células endoteliais (CORDIALI-FEI, ARDIGO *et al.*, 2008). A transcrição do seu gene é precoce e imediata; assim, após um sinal ser dado, níveis de TNF rapidamente aumentam entre 15 e 30 minutos (SCHOTTELIUS, MOLDAWER *et al.*, 2004).

O TNF- $\alpha$  é um mediador primário em infecções, traumas e inflamação, bem como defesa do hospedeiro e homeostase tecidual. Dependendo da sua concentração, duração da exposição celular e presença de outros mediadores, sua rede de efeitos biológicos pode ser local ou sistêmica, benéfica ou prejudicial. Sua expressão e atividade são finamente reguladas em diferentes níveis, o que permite seu trabalho silencioso, mesmo na ausência de estimulação exógena. A principal função fisiológica do TNF- $\alpha$  é estimular o recrutamento de leucócitos para os locais de infecção através do aumento de moléculas de adesão nas células endoteliais, indução da síntese de IL-12 e IL-18, as quais são potentes citocinas que estimulam a

formação de IFN- $\gamma$  (essencial para eliminação de patógenos, especialmente os intracelulares) (NEUNER, URBANSKI *et al.*, 1991).

Polimorfismo do gene do TNF- $\alpha$ , bem como estímulo exógeno, podem estar relacionados com o agravamento ou início da doença (RENATA FERREIRA MAGALHÃES, BIRAL *et al.*, 2010). Com relação à psoríase, TNF- $\alpha$  possui diferentes efeitos em nível celular, os quais estão correlacionados com mecanismos patofisiológicos da doença. É capaz de aumentar a produção de várias citocinas pró-inflamatórias sintetizadas por linfócitos ativados ou queratinócitos, exercendo efeitos específicos para a psoríase.

TNF- $\alpha$  tem efeito direto no aumento de citoqueratina 6 através da estimulação do promotor gênico de fatores de transcrição em queratinócitos, construindo a hiperproliferação do epitélio. De forma semelhante a IL-1, nesse caso, estimula a síntese de mais citocinas e a expressão de citoqueratina-6, um marcador de queratinócitos ativados e hiperproliferados (NEUNER, URBANSKI *et al.*, 1991).

Dessa forma, existe uma correlação entre resposta clínica, histopatológica e imunológica através de mecanismos associados intimamente com citocinas na comunicação entre células residentes (queratinócitos e células endoteliais) e células infiltradas (linfócitos, neutrófilos, e células de Langerhans) na psoríase. Aumento da renovação celular e maturação incompleta de queratinócitos estão relacionados com hiperqueratose, cujos sintomas clínicos são o desenvolvimento de placas. Tanto IL-1 quanto IL-6 aumentam a proliferação de queratinócitos. O eritema secundário à proliferação vascular e infiltrado inflamatório são mediados por IL-1 e TNF- $\alpha$ , os

quais estimulam angiogênese (processo mantido por IL-22) (BROTAS; CUNHA, *et al.*, 2012).

No presente estudo, após a múltipla aplicação com óleo de cróton ocorre o aumento das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , a porfirina Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, foi capaz de reduzir os níveis dessas citocinas praticamente a níveis basais, igualando-se ao tratamento com a dexametasona; dessa forma ela pode ser capaz de interferir, reduzir ou até mesmo interromper o ciclo da patogênese da doença. Para que ocorra a regulação da diferenciação de células T naive em Th1 e Th17, é fundamental a presença das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6 (NOGRALES, ZABA *et al.*, 2008; NESTLE, DI MEGLIO *et al.*, 2009; NESTLE, KAPLAN *et al.*, 2009; CHIU, CHENG *et al.*, 2012).

As células Th17 são produtoras das citocinas IL-6, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 e TNF- $\alpha$ , as quais regulam o desenvolvimento de doenças auto-imunes, como a psoríase (DONG, 2008; KORN, BETTELLI *et al.*, 2009).

A IL-17 ativa os macrófagos ao quais produzem TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6. Além disso, aumenta a maturação das células dendríticas (PIETRZAK, ZALEWSKA *et al.*, 2008), interage com IFN- $\gamma$  para aumentar a síntese de citocinas pelos queratinócitos, como IL-6 e IL-8, aumentando o influxo de células T na pele, contribuindo para a manutenção da placa (KRUEGER, 2002; KRUEGER e BOWCOCK, 2005; DAS, JAIN *et al.*, 2009; LIMA, 2011).

A via de sinalização da IL-17 é composta por uma família de seis citocinas (IL-17A - IL-17F. Na psoríase IL-17A e IL-17F são expressas na pele. IL-17A induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias de vários tipos de células, incluindo células

epiteliais, regulando positivamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$  e IL-6 (KORN, BETTELLI *et al.*, 2009; LOWES, SUAREZ-FARINAS *et al.*, 2014).

Os queratinócitos são o principal alvo da IL-17A na psoríase. Constitutivamente os receptores de IL-17 são expressos na superfície dos queratinócitos por toda a epiderme. Tanto IL-17A quanto outras citocinas Th17 efetoras levam os queratinócitos à ativação e produção de mediadores inflamatórios criando, assim, um ciclo inflamatório com manutenção da lesão psoriática (NOGRALES, ZABA *et al.*, 2008).

Entre os efeitos da IL-17A está o aumento da expressão de peptídeos antimicrobianos, incluindo os  $\beta$ -defensina e S100A, os quais estimulam o sistema imune inato, hiperproliferação de queratinócitos com hiperproliferação epidérmica e uma perturbação da barreira da pele, ocasionando o aumento da expressão da queratina 17, redução da expressão de filagrina e alteração de genes envolvidos na adesão de células (NOGRALES, ZABA *et al.*, 2008; GUTOWSKA-OWSIK, SCHAUPP *et al.*, 2012).

Notavelmente, a IL-17A e TNF- $\alpha$  agem sinergicamente nos queratinócitos, aumentando ainda mais a produção de TNF- $\alpha$  e outros mediadores pró-inflamatórios, mantendo o ciclo inflamatório da psoríase (LYNDE, POULIN *et al.*, 2014).

A dinâmica do conhecimento das citocinas leva não somente à elucidação dos mecanismos de tratamentos tradicionais anti-psoriáticos, como também à elaboração de novos biológicos efetivos. Os primeiros fármacos anti-citocinas foram

registrados para o tratamento de doenças inflamatórias autoimunes, incluindo psoríase, mostrando maior eficácia que as terapias tradicionais (SINGRI, WEST *et al.*, 2002; SCHOTTELIUS, MOLDAWER *et al.*, 2004; NUMEROF e ASADULLAH, 2006).

O infiltrado dérmico observado na psoríase contém várias células do sistema imunológico, proliferação de células endoteliais dérmicas, responsáveis pela produção de citocinas, como resultado da resposta inflamatória (BELGE, *et al.* 2014).

Amostras histológicas de lesões psoriáticas caracterizam-se pelo espessamento da epiderme, taxa mitótica dos queratinócitos basais aumentada e subsequente incompleta cornificação, gerando paraqueratose e elevado infiltrado inflamatório dérmico. O infiltrado inflamatório é constituído principalmente por células dendríticas, macrófagos, e células T na derme; e neutrófilos, com algumas células T na epiderme (LOWES, BOWCOCK *et al.*, 2007; NESTLE, KAPLAN *et al.*, 2009; PERERA, G. K., DI MEGLIO, P. *et al.*, 2012).

Os resultados encontrados nesse estudo corroboram algumas características histológicas de lesões psoriáticas. No modelo de múltiplas aplicações de óleo de cróton pode-se observar aumento da espessura da orelha; na epiderme observa-se também aumento significativo da epiderme, em torno de 15 camadas celulares associada a uma hiperqueratose na superfície. O tecido conjuntivo apresenta aumento da celularidade equiparando-se aos cortes histológicos de lesões psoriáticas. No grupo que recebeu o tratamento com a Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, houve melhora em comparação ao grupo com redução da espessura e

do infiltrado celular, além de uma evidente melhora do grupo, quase de forma semelhante ao tratamento com dexametasona.

A hiperproliferação da epiderme alcançada no modelo de edema induzido por múltiplas aplicações de óleo de cróton pode ser uma ferramenta útil para estudar doenças de pele hiperproliferativas como a psoríase (ALBANESI, DE PITA *et al.*, 2007; NESTLE, KAPLAN *et al.*, 2009).

Através da análise de imunomarcção com PCNA nos grupos tratados com a Di-*cis*-Py+, foi confirmada que ocorreu redução das células em proliferação; esse parâmetro também foi visto com o ensaio de Western blot no qual ocorreu a redução da proteína PCNA, comprovando que a Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, além de reduzir vários parâmetros inflamatórios, também foi capaz de reduzir o processo de proliferação celular.

A atividade antiproliferativa de diversos agentes antipsoriáticos é alcançada através da capacidade de inibir a expressão do PCNA. A imunomarcção do PCNA é utilizada constantemente como ferramenta de identificação de substâncias com potencial antiproliferativo (LIN, LEU *et al.*, 2009).

Assim, a Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, apresenta um potencial para o desenvolvimento de um novo agente fotossensibilizador para o tratamento com TFD, uma vez que reduziu a expressão de PCNA na epiderme de camundongos. Associado aos efeitos anti-inflamatórios já descritos nesse trabalho, o efeito antiproliferativo pode ser indireto, já que a proliferação dos queratinócitos pode estar relacionada ao processo inflamatório, abrindo margem para a possibilidade do

emprego do Di-*cis*-Py+ como ferramenta terapêutica no tratamento da psoríase, assim como outros distúrbios inflamatórios e hiperproliferativos da pele.

Apesar da evolução a respeito da compreensão da psoríase, a cura ainda não foi encontrada. A psoríase é associada a um alto grau de morbidade e os tratamentos atuais apresentam efeitos colaterais graves, levando muitas vezes os pacientes à desistência dos mesmos (MARTHA-ESTRELLA GARCÍA-PÉREZ, 2012; RAYCHAUDHURI, MAVERAKIS *et al.*, 2014).

Para pacientes com quadros leves, o tratamento de escolha para a psoríase é a aplicação de corticosteroides tópicos. Os corticosteróides ainda são os agentes antiinflamatórios mais empregados no tratamento de doenças inflamatórias cutâneas, devido aos seus efeitos sobre a resposta imune e sua ação anti-inflamatória (SCHOEPE, SCHACKE *et al.*, 2006).

Apesar da sua eficácia anti-inflamatória, a utilização de corticosteróides como agentes terapêuticos é muitas vezes restringida, devido a dois grandes inconvenientes. Primeiro, o tratamento em longo prazo com corticosteróides é frequentemente acompanhado de efeitos adversos severos e muitas vezes irreversíveis, incluindo a atrofia cutânea, hipertricose, Síndrome de Cushing, diabetes mellitus, redistribuição da gordura corporal com aumento do peso corporal, osteoporose, aterosclerose, hipertensão, atrofia muscular, atrofia da epiderme e da derme, as quais levam ao aumento da permeabilidade da pele, perda de água transepidermica e, por sua vez, levam a alterações no processo de cicatrização. Outros efeitos adversos notáveis incluem o aumento do risco de infecção, efeitos indesejáveis sobre o sistema nervoso central (alterações de humor, depressão,



euforia) e efeitos sobre os olhos (glaucoma e catarata). (SCHACKE, DOCKE *et al.*, 2002; LOWENBERG, STAHN *et al.*, 2008; MCDONOUGH, CURTIS *et al.*, 2008; STAHN e BUTTGEREIT, 2008). Em segundo lugar, pode ocorrer resistência aos corticosteróides, limitando o sucesso de terapias que os utilizam como base (SCHOEPE, SCHACKE *et al.*, 2006; VANDEVYVER, DEJAGER *et al.*, 2013).

Os corticosteróides atuam praticamente sobre todos os órgãos e tecidos. Eles têm como mecanismo fundamental de atuação a transcrição gênica. O corticosteróide livre atravessa a membrana celular da célula-alvo por difusão passiva e, no citoplasma, liga-se a receptores proteicos específicos. Esse complexo corticosteróide-receptor sofre transformação estrutural, tornando-se capaz de penetrar no núcleo celular, no qual se liga a regiões promotoras de certos genes, denominadas elementos responsivos aos corticosteróides, induzindo a síntese não somente de proteínas anti-inflamatórias, como a lipocortina-1 e I-kB, mas também de proteínas que atuam no metabolismo sistêmico, sendo esse processo chamado de transativação (SONG, GOLD *et al.*, 2005; VANDEVYVER, DEJAGER *et al.*, 2013).

Os corticosteróides atuam também através do mecanismo genômico chamado de transrepressão, em que monômeros de moléculas de corticosteróides e receptores de corticosteróides interagem com fatores de transcrição como proteína ativadora 1 (AP-1) e NF-kB por interação proteína-proteína e promovem efeito inibitório de suas funções. Por essa via, a síntese de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-2 e prostaglandinas são reduzidas. Os estudos têm demonstrado que a maior parte dos efeitos clínicos ao se usar os corticosteróides, ou seja, o efeito antiinflamatório e imunossupressor são devido ao mecanismo de

transrepressão, enquanto grande parte dos efeitos adversos esta relacionada aos mecanismos de transativação (SONG, GOLD *et al.*, 2005; VANDEVYVER, DEJAGER *et al.*, 2013).

Em busca de verificar a possível interação da porfirina com os receptores de corticosteróides, os animais tratados com a Di-*cis*-Py+ e dexametasona foram pré-tratados com um antagonista do receptor de corticosteróides, a mifepristona, a qual compete com o corticosteróide por seu sítio de ligação com afinidade três vezes maior do que a da dexametasona (CASTINETTI, *et al.*, 2012, FLESERIU, BILLER *et al.*, 2012). Na pesquisa e desenvolvimento de medicamentos, a mifepristona é empregada como uma ferramenta farmacológica de eficácia bastante significativa para a identificação de compostos que atuem através dos receptores de corticosteróides (HORINOUCI, MENDES *et al.*, 2013).

Dessa maneira, o efeito anti-inflamatório da Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, não foi revertido; o pré-tratamento com a mifepristona indica que a ação anti-inflamatória vista até o momento da Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, não está ocorrendo através da ativação desses receptores.

Os corticosteróides estão entre as drogas anti-inflamatórias e imunossupressoras mais importantes e mais frequentemente utilizadas na clínica. Porém, o seu uso é ainda muitas vezes rejeitado pelos pacientes devido os efeitos adversos associados ao tratamento em longo prazo (LOWENBERG, STAHN *et al.*, 2008; STAHN e BUTTGEREIT, 2008; VANDEVYVER, DEJAGER *et al.*, 2013).

Já os fármacos anticitocinas representam um dos maiores avanços no tratamento de doenças inflamatórias crônicas graves nos últimos anos. No entanto,

esses fármacos são desenvolvidos através de engenharia recombinante, tendo um custo elevado e, conseqüentemente, limitando o seu uso (SIMMONS, 2006; WERTH, 2006).

Estudos sugerem que a terapia fotodinâmica pode ser uma alternativa bastante eficaz no tratamento da psoríase (KIM, WEST *et al.*, 2012). Ela pode alterar expressão de várias citocinas inflamatórias, aumentando ou diminuindo seus níveis e outros genes imunológicos importantes que estão envolvidos na indução desta resposta. Entre as citocinas cujas expressões foram relatadas como sendo moduladas pela TFD estão principalmente a IL6, IL10 e TNF- $\alpha$ , além da IL1- $\beta$ , IL-2, fator estimulante de colônia de granulócitos, fator de crescimento epidérmico e a modulação da expressão de vários genes envolvidos em adesão celular e apresentação de antígeno (KORBELIK e DOUGHERTY, 1999; WONG, TRACY *et al.*, 2003; CASTANO, HAMBLIN, 2005, CASTANO, MROZ *et al.*, 2006).

O conhecimento sobre a modulação do tratamento fotodinâmico pode ser útil para tratar diversos tipos de doenças. De acordo com estudo de Larisch e col. 2014, a TFD foi capaz de reduzir o nível da citocina IL-6 em fibroblastos, queratinócitos e células de carcinoma de células escamosas (LARISCH, VERWANGER *et al.*, 2014).

Numerosos estudos clínicos e pré-clínicos demonstraram que a terapia fotodinâmica pode influenciar a resposta imune adaptativa de maneiras diferentes; tanto na potencialização da imunidade adaptativa quanto na imunossupressão. O mecanismo preciso que leva à potencialização contra supressão ainda não é claro; no entanto, parece que o efeito de terapia fotodinâmica sobre o sistema imune

depende muito do tipo de tratamento, a área tratada e o tipo de fotossensibilizador (AGOSTINIS, *et al.*, 2011).

A resposta imune da pele frente ao tratamento com terapia fotodinâmica ainda parece ser complexo: pode ser devido ao efeito citotóxico direto ou pela indução da resposta adaptativa contra o estresse oxidativo gerado pelo próprio tratamento, reduzindo as propriedades imunoestimulantes dessas células (HAMBLIN, 2012).

Alguns estudos têm demonstrado que, durante o tratamento com terapia fotodinâmica, ocorre apoptose de leucócitos (ALLISON, *et al.*, 1994, HUNT, *et al.*, 1999, JIANG, *et al.*, 2002), devido ao acúmulo do fotossensibilizador em células imunes ativadas (HUNT, *et al.*, 1999, JIANG, *et al.*, 2002). Células T e B ativadas absorvem mais fotossensibilizador que as células T naive (HUNT, *et al.*, 1999, JIANG, *et al.*, 2002). Esta maior absorção pode ser devido à regulação positiva e aumento da rotatividade dos receptores das lipoproteínas de baixa densidade (ALLISON, *et al.*, 1994). Assim, as células T e B ativadas podem ser mais vulneráveis aos efeitos citotóxicos da terapia fotodinâmica, mesmo com tratamentos de baixa dose (HUNT, *et al.*, 2000).

Vários ensaios clínicos descreveram os benefícios da terapia fotodinâmica no tratamento da psoríase e descobriram que a apoptose de linfócitos T dentro das placas inflamatórias foi associada com a redução da infiltração de células inflamatórias na derme, a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, tal como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 e a normalização da proliferação de queratinócitos (BISSONNETTE, *et al.*, 2002; FRANSSON, *et al.*, 2005; SCHLEYER, 2006; SMITS, *et al.*, 2006; KIM, 2007).

Estudos também mostraram a eficácia do tratamento com a terapia fotodinâmica, reduzindo o processo inflamatório em modelos de artrite murina da encefalomielite e doença inflamatória do intestino (FAVRE, *et al.*, 2011, REINHARD, *et al.*, 2015), infecções em modelo animal de queimaduras e úlceras cutâneas (MORIMOTO, *et al.*, 2014, NAFEE, *et al.*, 2013). Como consequência, em humanos, o tratamento com terapia fotodinâmica já é utilizado em feridas crônicas (MORLEY, *et al.*, 2013, BROWN, *et al.*, 2013), periodontite (ALWAEELI, *et al.*, 2015, CAMPOS, *et al.*, 2013, CHONDROS, *et al.*, 2009, CHRISTODOULIDES, *et al.*, 2008) e acne vulgaris (ITOH, *et al.*, 2001, HONGCHARU, *et al.*, 2000, POLLOCK, *et al.*, 2004).

No tratamento com terapia fotodinâmica, um fotossensibilizador ideal deve ser um composto puro para permitir a análise de controle de qualidade com baixos custos de produção, além de boa estabilidade armazenada, deve ter um pico de alta absorção entre 600 e 800 nanômetros (nm), porque a absorção de fótons com comprimentos de onda maiores do que 800 nm não fornecem energia suficiente para excitar oxigênio para seu estado singlete e para formar um rendimento substancial de espécies reativas de oxigênio (AGOSTINIS, *et al.* 2011).

No presente estudo foi utilizada uma fonte de luz incandescente. Tanto os lasers quanto as fontes de luz incandescentes têm sido utilizados para TFD e mostraram eficácias similares (BRANCALEON, *et al.* 2002).

Na terapia fotodinâmica com Di-cis-Py<sup>+</sup> foi incidida luz no comprimento de onda entre 400 e 800 nm. A maioria dos estudos clínicos é realizada com luz no comprimento entre 625 e 633 nm, permitindo maior penetração na pele (KALKA, MERK *et al.*, 2000). Luz com comprimento de onda de 635 nm é capaz de penetrar

na pele em aproximadamente 6 mm, comparado com 1 a 2 mm do comprimento de onda entre 400-500 nm. A profundidade terapeuticamente efetiva, entretanto, parece estar próxima de 1- 3 mm, quando é utilizado o comprimento de onda de 635 nm. Isso se deve à capacidade de produção de uma reação fotodinâmica, a qual depende da dose de luz e, também, da quantidade de fotossensibilizador no tecido-alvo. A terapia fotodinâmica, com a combinação de porfirina e irradiação de luz visível 400-800 nm (maior comprimento de onda em relação à UVA) parece representar uma alternativa com menor risco cancerígeno, além de ter melhor penetração na pele (MORTON, 2004).

No tratamento de doenças cutâneas, a administração tópica de fármacos é muitas vezes a mais escolhida, pois geralmente evita os efeitos sistêmicos que estão associados aos fármacos por essa via. No entanto, a fraca penetração pela pele de alguns fotossensibilizadores como os derivados de hematoporfirinas (muito utilizados no caso de doenças de pele) faz com que sejam administrados por via sistêmica. Em alguns casos foram obtidos resultados terapêuticos promissores, como é o caso da aplicação tópica do fotossensibilizador ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) (BISSONNETTE e LUI, 1997). O 5-ALA não é um fotossensibilizador propriamente dito e sim, um precursor metabólico da protoporfirina IX (PpIX), que pode ser aplicado sistemicamente ou de forma tópica na pele, possuindo capacidade limitada de atravessar barreiras biológicas da pele, sendo essa penetração uma condição fundamental para a conversão do ALA em PpIX (KENNEDY, POTTIER *et al.*, 1990; KLOEK, AKKERMANS *et al.*, 1998; CALZAVARA-PINTON, ROSSI *et al.*, 2013).

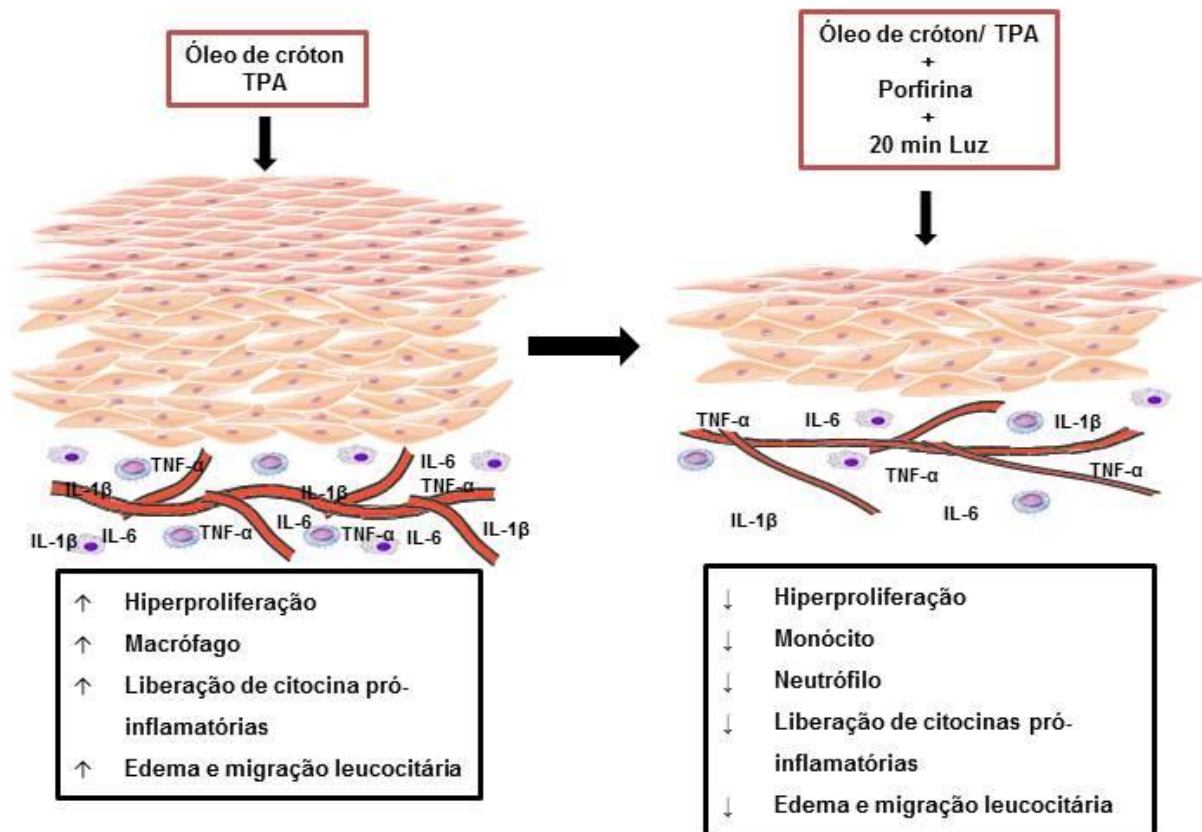
Uma das desvantagens do tratamento tópico com ALA é, devido a sua heterogeneidade, quando aplicado topicamente ocorre uma distribuição limitada e pouco homogênea da PpXI no tecido, havendo a necessidade de administrar doses razoavelmente altas de ALA por longos períodos de tempo (RADAKOVIC-FIJAN, BLECHA-THALHAMMER *et al.*, 2005).

No presente estudo a porfirina Di-*cis*-Py+ fotoativada, além de apresentar resultados promissores com ação anti-inflamatória, reduzir a proliferação celular e não atuar em receptores de corticosteroides, não apresentou ação sistêmica quando aplicada topicamente; mantendo assim a possibilidade de que essa porfirina tenha ação local, contribuindo ainda mais para sua escolha em tratamento tópicos de lesões de psoríase.

De acordo com estudo de Parise Jr e Buzaid, 2006 a terapia fotodinâmica é uma forma simples, factível, segura e efetiva para tratamento de lesões superficiais (JR. e BUZAID, 2006). Estudos indicam que o tratamento com TFD tem mostrado uma taxa de resposta clínica de 35 – 60%. A resposta máxima é normalmente observada após varias sessões com TFD (TANDON, *et al.* 2008). No presente estudo após 4 sessões de TFD com a porfirina Di-*cis*-Py+ ocorreu uma remissão de vários parâmetros inflamatórios e hiperproliferativos, concluindo que os resultados obtidos nesse estudo com a porfirina Di-*cis*-Py+, quando fotoativada, no comprimento de onda de 400-800 nm por 20 minutos, apresentou atividade anti-inflamatória tópica e antiproliferativa, podendo ser um candidato a fotossensibilizador para o tratamento tópico e localizado de doenças inflamatórias hiperproliferativas, entre elas a psoríase.

## 7 CONCLUSÃO

A porfirina Di-*cis*-Py<sup>+</sup> apresenta atividade fotossensibilizadora quando recebe a fotoativação, atuando topicamente em parâmetros inflamatórios agudos e outros pré-estabelecidos bem como apresenta atividade antiproliferativa não dependente de ligação aos receptores de corticosteroides.





## REFERÊNCIAS

- ABUABARA, K., J. WAN, *et al.* Variation in dermatologist beliefs about the safety and effectiveness of treatments for moderate to severe psoriasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.68, n.2, p.262-269. 2013.
- AFIFI, T., G. DE GANNES, *et al.* Topical therapies for psoriasis: evidence-based review. **Can Fam Physician**, v.51, p.519-25. 2005.
- AGOSTINIS, P., K. BERG, *et al.* Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA Cancer J Clin**, v.61, n.4, p.250-81. 2011.
- AHN, C. S., C. J. GUSTAFSON, *et al.* Cost effectiveness of biologic therapies for plaque psoriasis. **Am J Clin Dermatol**, v.14, n.4, p.315-26. 2013.
- ALBANESI, C., O. DE PITA, *et al.* Resident skin cells in psoriasis: a special look at the pathogenetic functions of keratinocytes. **Clin Dermatol**, v.25, n.6, p.581-8. 2007.
- ALENIUS, G. M., C. ERIKSSON, *et al.* Interleukin-6 and soluble interleukin-2 receptor alpha-markers of inflammation in patients with psoriatic arthritis? **Clin Exp Rheumatol**, v.27, n.1, p.120-3. 2009.
- ALLER, M. A., J. L. ARIAS, *et al.* The inflammatory response recapitulates phylogeny through trophic mechanisms to the injured tissue. **Med Hypotheses**, v.68, n.1, p.202-9. 2007.
- ALLISON, B.A, PRITCHARD, P.H. LEVY, J.G. Evidence for low-density lipoprotein receptor-mediated uptake of benzoporphyrin derivative. **Br J Cancer**, v.69, p. 833-9,1994.
- ALLISON, R. R. e K. MOGHISSI. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. **Clin Endosc**, v.46, n.1, p.24-9. 2013.
- ALMUTAWA, F., L. THALIB, *et al.* Efficacy of localized phototherapy and photodynamic therapy for psoriasis: a systematic review and meta-analysis. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, v.31, n.1, p.5-14. 2015.
- AOKI, T. e S. NARUMIYA. Prostaglandins and chronic inflammation. **Trends Pharmacol Sci**, v.33, n.6, p.304-11. 2012.
- ATAIE-KACHOIE, P., M. H. POURGHOLAMI, *et al.* Inhibition of the IL-6 signaling pathway: a strategy to combat chronic inflammatory diseases and cancer. **Cytokine Growth Factor Rev**, v.24, n.2, p.163-73. 2013.
- AYER, J. e H. S. YOUNG. Pimecrolimus for psoriasis. **Expert Opin Pharmacother**, v.14, n.6, p.767-74. 2013.

- BABILAS, P., S. SCHREML, *et al.* Photodynamic therapy in dermatology: state-of-the-art. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, v.26, n.3, p.118-32. 2010.
- BADER, M. J., H. STEPP, *et al.* Photodynamic therapy of bladder cancer - a phase I study using hexaminolevulinate (HAL). **Urol Oncol**, v.31, n.7, p.1178-83. 2013.
- BAGGIOLINI, M. Chemokines in pathology and medicine. **J Intern Med**, v.250, n.2, p.91-104. 2001.
- BAKER, E. L., C. I. COLEMAN, *et al.* Effect of Biologic Agents on Non-PASI Outcomes in Moderate-to-Severe Plaque Psoriasis: **Systematic Review and Meta-Analyses. Dermatol Ther (Heidelb)**, v.2, n.1, p.9. 2012.
- BASAVARAJ, K. H., M. A. NAVYA, *et al.* Stress and quality of life in psoriasis: an update. **Int J Dermatol**, v.50, n.7, p.783-92. 2011.
- BAZZONI, F., BEUTLER, B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. **N Engl J Med**. v.334, p. 1717-25. 1996.
- BELGE, K., J. BRUCK, *et al.* Advances in treating psoriasis. **F1000Prime Rep**, v.6, p.4. 2014.
- BERG, K., P. K. SELBO, *et al.* Porphyrin-related photosensitizers for cancer imaging and therapeutic applications. **Journal of Microscopy-Oxford**, v.218, p.133-147. 2005.
- BEYER, V. e S. E. WOLVERTON. Recent trends in systemic psoriasis treatment costs. **Arch Dermatol**, v.146, n.1, p.46-54. 2010.
- BIESAGA, M., K. PYRZYNSKA, *et al.* Porphyrins in analytical chemistry. A review. **Talanta**, v.51, n.2, p.209-24. 2000.
- BISSONNETTE, R. e H. LUI. Current status of photodynamic therapy in dermatology. **Dermatol Clin**, v.15, n.3, p.507-19. 1997.
- BISSONNETTE, R., TREMBLAY, J.F., JUZENAS, P., *et al.* Systemic photodynamic therapy with aminolevulinic acid induces apoptosis in lesional T lymphocytes of psoriatic plaques. **J Invest Dermatol**, v.19, p.77-83. 2002.
- BOEHNCKE, W. H. KONING, K., KAUFMANN, R., SCHEFFOLD, W., PRIIMMER, O., STERRY, W., Photodynamic therapy in psoriasis: suppression of cytokine production in vitro and recording of fluorescence modification during treatment in vivo. **Arch Dermatol Res**. v. 286, p. 300-3. 1994.
- BOEHNCKE, W. H., B. KIRBY, *et al.* New developments in our understanding of psoriatic arthritis and their impact on the diagnosis and clinical management of the disease. **J Eur Acad Dermatol Venereol** . 2013.
- BOLOGNIA, J. L., J. L. JORIZZO, *et al.* **Dermatology**. 2012

BORISH, L. C. e J. W. STEINKE. 2. Cytokines and chemokines. **J Allergy Clin Immunol**, v.111, n.2. 2003.

BOWCOCK, A. M. e J. G. KRUEGER. Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. **Nat Rev Immunol**, v.5, n.9, p.699-711. 2005.

BOYD, A. S. e K. H. NELDNER. The isomorphic response of Koebner. **Int J Dermatol**, v.29, n.6, p.401-10. 1990.

BRADLEY, P. P. *et al.* Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J Invest Dermatol**, v.78, n.3, p.206-9. 1982.

BRAGULLA, H. H. e D. G. HOMBERGER. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. **J Anat**, v.214, n.4, p.516-59. 2009.

BROTAS, A. M., J. M. CUNHA, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha and the cytokine network in psoriasis. **An Bras Dermatol**, v.87, n.5, p.673-81. 2012.

BUCHAU, A. S. e R. L. GALLO. Innate immunity and antimicrobial defense systems in psoriasis. **Clin Dermatol**, v.25, n.6, p.616-24. 2007.

CALZAVARA-PINTON, P., M. T. ROSSI, *et al.* Photodynamic antifungal chemotherapy. **Photochem Photobiol**, v.88, n.3, p.512-22. 2012.

CALZAVARA-PINTON, P. G., M. T. ROSSI, *et al.* A retrospective analysis of real-life practice of off-label photodynamic therapy using methyl aminolevulinate (MAL-PDT) in 20 Italian dermatology departments. Part 1: inflammatory and aesthetic indications. **Photochem Photobiol Sci**, v.12, n.1, p.148-57. 2013.

CARRASCOSA, J. M., J. L. LÓPEZ-ESTEBARANZ, *et al.* Narrowband UV-B, Monochromatic Excimer Laser, and Photodynamic Therapy in Psoriasis: A Consensus Statement of the Spanish Psoriasis Group. **Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)**, v.102, n.3, p.175-186. 2011.

CASTANO, A. P., T. N. DEMIDOVA, *et al.* Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.1, n.4, p.279-293. 2004.

CASTANO, A. P., HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two – cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. **Photodiagnosis Photodyn Ther** 2005;2:2.

CASTANO, A. P., T. N. DEMIDOVA, *et al.* Mechanisms in photodynamic therapy: Part three—Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.2, n.2, p.91-106. 2005.

- CASTANO, A. P., P. MROZ, *et al.* Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. **Nat Rev Cancer**, v.6, n.7, p.535-45. 2006.
- CASTELLS-RODELLAS, A., J. V. CASTELL, *et al.* Interleukin-6 in normal skin and psoriasis. **Acta Derm Venereol**, v.72, n.3, p.165-8. 1992.
- CASTINETTI, F.; BRUE, T.; CONTE-DEVOLX, B. The use of the glucocorticoid receptor antagonist mifepristone in Cushing's syndrome. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v. 19, n. 4, p. 295-9, 2012.
- CHARO, I. F. e R. M. RANSOHOFF. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. **N Engl J Med**, v.354, n.6, p.610-21. 2006.
- CHATTERJEE, D. K., L. S. FONG, *et al.* Nanoparticles in photodynamic therapy: an emerging paradigm. **Adv Drug Deliv Rev**, v.60, n.15, p.1627-37. 2008.
- CHIU, H.-Y., Y.-P. CHENG, *et al.* T helper type 17 in psoriasis: From basic immunology to clinical practice. **Dermatologica Sinica**, v.30, n.4, p.136-141. 2012.
- COHEN, S. N., S. E. BARON, *et al.* Guidance on the diagnosis and clinical management of psoriasis. **Clin Exp Dermatol**, v.37, p.13-8. 2012.
- COPPELLOTTI, O., C. FABRIS, *et al.* Porphyrin photosensitised processes in the prevention and treatment of water- and vector-borne diseases. **Curr Med Chem**, v.19, n.6, p.808-19. 2012.
- CORDIALI-FEI, P., M. ARDIGO, *et al.* Serum cytokines and bioumoral immunological characterization of psoriatic patients in long term etanercept treatment. **Int J Immunopathol Pharmacol**, v.21, n.3, p.643-9. 2008.
- DAINICHI, T., S. HANAKAWA, *et al.* Classification of inflammatory skin diseases: a proposal based on the disorders of the three-layered defense systems, barrier, innate immunity and acquired immunity. **J Dermatol Sci**, v.76, n.2, p.81-9. 2014.
- DANIELL, M. D. e J. S. HILL. A history of photodynamic therapy. **Aust N Z J Surg**, v.61, n.5, May, p.340-8. 1991.
- DARLENSKI, R. e J. W. FLUHR. Photodynamic therapy in dermatology: past, present, and future. **J Biomed Opt**, v.18, n.6, p.061208. 2013.
- DAS, R. P., A. K. JAIN, *et al.* Current concepts in the pathogenesis of psoriasis. **Indian J Dermatol**, v.54, n.1, p.7-12. 2009.
- DAVIDSON, A. e B. DIAMOND. Autoimmune diseases. **N Engl J Med**, v.345, n.5, p.340-50. 2001.
- DE BERNARDIS, E., G. LEONARDI, *et al.* Protective effects of papaverine salicylate in mouse ear dermatitis and PAF-induced rat paw oedema. **Agents Actions**, v.42, n.1-2, p.29-33. 1994.

DE VRY, C. G., M. VALDEZ, *et al.* Topical application of a novel immunomodulatory peptide, RDP58, reduces skin inflammation in the phorbol ester-induced dermatitis model. **J Invest Dermatol**, v.125, n.3, p.473-81. 2005.

DE YOUNG, L. M., J. B. KHEIFETS, *et al.* Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents Actions**, v.26, n.3-4, p.335-41. 1989.

DEAN, R. T., W. HYLTON, *et al.* Lysosomal enzyme secretion by macrophages during intracellular storage of particles. **Biochim Biophys Acta**, v.584, n.1, p.57-65. 1979.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Departamento de Ciência e Tecnologia, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos estratégicos. Fortalecendo a pesquisa clínica no Brasil: a importância de registrar os ensaios clínicos. **Revista de Saúde Pública**, v. 45, n. 2. 2011.

DONG, C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. **Nat Rev Immunol**, v.8, n.5, p.337-348. 2008.

EINSPAHR, J. G., M. J. XU, *et al.* Reproducibility and expression of skin biomarkers in sun-damaged skin and actinic keratoses. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v.15, n.10, p.1841-8. 2006.

FAVRE, L., BORLE, F., VELIN, D. *et al.* Low dose endoluminal photodynamic therapy improves murine T cell-mediated colitis. **Endoscopy**, v. 43. p. 604-16. 2011.

FEINGOLD, K. R. e C. GRUNFELD. Psoriasis: it's more than just the skin. **J Lipid Res**, v.53, n.8, p.1427-9. 2012.

FILIP, A. G., S. CLICHICI, *et al.* Possible in vivo mechanisms involved in photodynamic therapy using tetrapyrrolic macrocycles. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.44, n.1, p.53-61. 2011.

FIRESTEIN, G. S. The T cell cometh: interplay between adaptive immunity and cytokine networks in rheumatoid arthritis. **J Clin Invest**, v.114, n.4, p.471-4. 2004.

FLESERIU, M., B. M. BILLER, *et al.* Mifepristone, a glucocorticoid receptor antagonist, produces clinical and metabolic benefits in patients with Cushing's syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**, v.97, n.6, p.2039-49. 2012.

FRANK O. NESTLE, D. H. K., JONATHAN BARKER. Mechanisms of Disease Psoriasis. **The New England Journal of Medicine**. 2009.

FRANSSON, J. ROS, A.M. Clinical and immunohistochemical evaluation of psoriatic plaques treated with topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, v. 21, p. 326-32. 2005.

FREINKEL, R. K. e D. WOODLEY. The biology of the skin. New York: **Parthenon Pub. Group**. 2001. 432 p. p.

- FRITSCH, C., G. GOERZ, *et al.* Photodynamic therapy in dermatology. **Arch Dermatol**, v.134, n.2, p.207-14. 1998.
- FU, M. e G. WANG. Keratin 17 as a therapeutic target for the treatment of psoriasis. **J Dermatol Sci**, v.67, n.3, p.161-5. 2012.
- FUNK, J., T. LANGELAND, *et al.* Psoriasis induced by interferon-alpha. **Br J Dermatol**, v.125, n.5, p.463-5. 1991.
- GABAY, C., C. LAMACCHIA, *et al.* IL-1 pathways in inflammation and human diseases. **Nat Rev Rheumatol**, v.6, n.4, p.232-41. 2010.
- GABOR, M. Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications. **Budapest: Akadémiai Kiadó**, p.24-37. 2000.
- GÁBOR, M. Models of Acute Inflammation in the Ear. **Methods in molecular biology**, v.225, p.129-137. 2003.
- GARCIA-PEREZ, M. E., T. STEVANOVIC, *et al.* New therapies under development for psoriasis treatment. **Curr Opin Pediatr**, v.25, n.4, p.480-7. 2013.
- GERARD, C. e B. J. ROLLINS. Chemokines and disease. **Nat Immunol**, v.2, n.2, p.108-15. 2001.
- GNIADDECKI, R. Regulation of Keratinocyte Proliferation. **General Pharmacology: The Vascular System**, v.30, n.5, p.619-622. 1998.
- GOLDSMITH, L. A., KATZ, S. I., GILCHEREST, B. A., PALLER, A.S., LEFFELL. D. J., WOLFF. K. **Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine**, Eighth Edition, 2 Volume. 2012
- GOTTLIEB, A. B. Psoriasis. Immunopathology and immunomodulation. **Dermatol Clin**, v.19, n.4, p.649-57, viii. 2001.
- GRIFFITHS, C. E. e J. N. BARKER. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. **Lancet**, v.370, p.263-71. 2007.
- GROEBER, F., M. HOLEITER, *et al.* Skin tissue engineering--in vivo and in vitro applications. **Adv Drug Deliv Rev**, v.63, n.4-5, p.352-66. 2011.
- GUTOWSKA-OWSIK, D., A. L. SCHAUPP, *et al.* IL-17 downregulates filaggrin and affects keratinocyte expression of genes associated with cellular adhesion. **Exp Dermatol**, v.21, n.2, p.104-10. 2012.
- HAMBLIN, M.R. Antimicrobial photodynamic therapy and photodynamic inactivation, or killing bugs with dyes and light – a symposium-in-print. **Photochem Photobiol**. v. 88, p. 496-8. 2012.
- HEYDENDAEL, V. M., P. I. SPULS, *et al.* Methotrexate versus cyclosporine in moderate-to-severe chronic plaque psoriasis. **N Engl J Med**, v.349, n.7, p.658-65. 2003.

HONIGSMANN, H. History of phototherapy in dermatology. **Photochem Photobiol Sci**, v.12, n.1, p.16-21. 2013.

HORINOUCI, C. D., D. A. MENDES, *et al.* Combretum leprosum Mart. (Combretaceae): potential as an antiproliferative and anti-inflammatory agent. **J Ethnopharmacol**, v.145, n.1, p.311-9. 2013.

HUNT, D.W., JIANG, H., GRANVILLE, D.J., *et al.* Consequences of the photodynamic treatment of resting and activated peripheral T lymphocytes. **Immunopharmacology**. v.41, p. 31-44. 1999.

HUNT, D.W., CHAN, A.H. Influence of photodynamic therapy on immunological aspects of disease – an update. **Expert Opin Investig Drugs**. v. 9, p. 807-17. 2000.

IRLA, N., A. A. NAVARINI, *et al.* Alitretinoin abrogates innate inflammation in palmoplantar pustular psoriasis. **Br J Dermatol**, v.167, n.5, p.1170-4. 2012.

JACOBSON, C. C., S. KUMAR, *et al.* Latitude and psoriasis prevalence. **J Am Acad Dermatol**, v.65, n.4, p.870-3. 2011.

JELIC, D., I. TATIC, *et al.* Porphyrins as new endogenous anti-inflammatory agents. **Eur J Pharmacol**, v.691, n.1-3, p.251-60. 2012.

JIANG, H., GRANVILLE, D.J., NORTH, J.R., *et al.* Selective action of the photosensitizer QLT0074 on activated human T lymphocytes. **Photochem Photobiol**. v.76, p. 224-31. 2002.

JIN, L. e G. WANG. Keratin 17: A Critical Player in the Pathogenesis of Psoriasis. **Med Res Rev**, 2013.

JOSEFSEN, L. B. e R. W. BOYLE. Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. **Met Based Drugs**, v.2008, p.276109. 2008.

JR., O. P. e A. C. BUZAID. Terapia Fotodinâmica - Uma nova opção no tratamento dos carcinomas superficiais de cabeça e pescoço. **Revista Brasileira de Cirurgia da Cabeça e Pescoço**, v.35, n.2, p.4. 2006.

KALKA, K., H. MERK, *et al.* Photodynamic therapy in dermatology. **J Am Acad Dermatol**, v.42, n.3, p.389-413, 2000.

KANITAKIS, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. **Eur J Dermatol**, v.12, n.4, p.390-9, 2002.

KEITH, J. C., JR., L. ALBERT, *et al.* IL-11, a pleiotropic cytokine: exciting new effects of IL-11 on gastrointestinal mucosal biology. **Stem Cells**, v.12 Suppl 1, p.79-89; discussion 89-90. 1994.

KENNEDY, J. C., R. H. POTTIER, *et al.* Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. **J Photochem Photobiol B**, v.6, n.1-2, p.143-8. 1990.

- KIM, J.K., KANG, H.Y., LEE, E.S., et.al. Topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy for intractable palmoplantar psoriasis. **J Dermatol**. v. 34, p. 37-40. 2007.
- KIM, I. H., C. E. WEST, *et al.* Comparative efficacy of biologics in psoriasis: a review. **Am J Clin Dermatol**, v.13, n.6, p.365-74. 2012.
- KLEINPENNING, M.M., SMITS, T., EWALDS, E., et.al. Heterogeneity of fluorescence in psoriasis after application of 5-aminolaevulinic acid: an immunohistochemical study. **Br J Dermatol**. v. 155, p. 539-45. 2006.
- KLOEK, J., W. AKKERMANS, *et al.* Derivatives of 5-Aminolevulinic Acid for Photodynamic Therapy: Enzymatic Conversion into Protoporphyrin. **Photochemistry and Photobiology**, v.67, n.1, p.4. 1998.
- KORBELIK, M. e G. J. DOUGHERTY. Photodynamic therapy-mediated immune response against subcutaneous mouse tumors. **Cancer Res**, v.59, n.8, p.1941-6. 1999.
- KORN, T., E. BETTELLI, *et al.* IL-17 and Th17 Cells. **Annu Rev Immunol**, v.27, p.485-517. 2009.
- KOSTER, M. I. e D. R. ROOP. Genetic pathways required for epidermal morphogenesis. **Eur J Cell Biol**, v.83, n.11-12, p.625-9. 2004.
- KRUEGER, G. e C. N. ELLIS. Psoriasis--recent advances in understanding its pathogenesis and treatment. **J Am Acad Dermatol**, v.53, n.1, p.S94-100. 2005.
- KRUEGER, J. G. The immunologic basis for the treatment of psoriasis with new biologic agents. **J Am Acad Dermatol**, v.46, n.1, p.1-23; quiz 23-6. 2002.
- KRUEGER, J. G. e A. BOWCOCK. Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. **Ann Rheum Dis**, v.64 Suppl 2, p.ii30-6. 2005.
- LAMBRECHTS, S. A., M. C. AALDERS, *et al.* Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49, n.5, p.2026-34. 2005.
- LAPOLLA, W., B. A. YENTZER, *et al.* A review of phototherapy protocols for psoriasis treatment. **J Am Acad Dermatol**, v.64, n.5, p.936-49. 2011.
- LARISCH, P., T. VERWANGER, *et al.* The interrelation between a pro-inflammatory milieu and fluorescence diagnosis or photodynamic therapy of human skin cell lines. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v.11, n.2, p.91-103. 2014.
- LIMA, E. D. A. L. M. D. A. Reviewing concepts in the immunopathogenesis of psoriasis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.86, n.6. 2011.
- LIMA EDE, A. e A. LIMA MDE. Reviewing concepts in the immunopathogenesis of psoriasis. **An Bras Dermatol**, v.86, n.6, p.1151-8. 2011.



LIN, Y. K., Y. L. LEU, *et al.* Anti-psoriatic effects of indigo naturalis on the proliferation and differentiation of keratinocytes with indirubin as the active component. **J Dermatol Sci**, v.54, n.3, p.168-74. 2009.

LJUBOJEVIC, S., J. LIPOZENCIC, *et al.* Pemphigus vulgaris: a review of treatment over a 19-year period. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v.16, n.6, p.599-603. 2002.

LOWENBERG, M., C. STAHN, *et al.* Novel insights into mechanisms of glucocorticoid action and the development of new glucocorticoid receptor ligands. **Steroids**, v.73, n.9-1, p.1025-9. 2008.

LOWES, M. A., A. M. BOWCOCK, *et al.* Pathogenesis and therapy of psoriasis. **Nature**, v.445, n.7130, p.866-73. 2007.

LOWES, M. A., M. SUAREZ-FARINAS, *et al.* Immunology of psoriasis. **Annu Rev Immunol**, v.32, p.227-55. 2014.

LYNDE, C. W., Y. POULIN, *et al.* Interleukin 17A: Toward a new understanding of psoriasis pathogenesis. **J Am Acad Dermatol**, v.71, n.1, p.141-150. 2014.

MABUCHI, T., T. W. CHANG, *et al.* Chemokine receptors in the pathogenesis and therapy of psoriasis. **J Dermatol Sci**, v.65, n.1, p.4-11. 2012.

MARQUEZ, L. A., H. B. DUNFORD, *et al.* Kinetic studies on the reaction of compound II of myeloperoxidase with ascorbic acid. Role of ascorbic acid in myeloperoxidase function. **J Biol Chem**, v.265, n.10, p.5666-70. 1990.

MARTHA-ESTRELLA GARCÍA-PÉREZ, J. J. A. R. P. Antipsoriatic Drug Development. **Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery**, v.6, p.3-21. 2012.

MASON, A. R., J. M. MASON, *et al.* Topical treatments for chronic plaque psoriasis of the scalp: a systematic review. **Br J Dermatol**, v.169, n.3, p.519-27. 2013.

MCDONOUGH, A. K., J. R. CURTIS, *et al.* The epidemiology of glucocorticoid-associated adverse events. **Curr Opin Rheumatol**, v.20, n.2, p.131-7. 2008.

MELLISH, K. J., R. D. COX, *et al.* In vitro photodynamic activity of a series of methylene blue analogues. **Photochem Photobiol**, v.75, n.4, p.392-7. 2002.

MENDES, D. A., C. D. HORINOUCI, *et al.* In vivo participation of nitric oxide in hyperproliferative epidermal phenomena in mice. **Eur J Pharmacol**, v.687, n.1-3, p.1-8. 2012.

MIHELLER, P., L. S. KISS, *et al.* Methotrexate: Should We Start Using it in Clinical Practice? **Curr Drug Targets**, v.14, n.12, p.1480-9. 2013.

MOLLER, B. e P. M. VILLIGER. Inhibition of IL-1, IL-6, and TNF-alpha in immune-mediated inflammatory diseases. **Springer Semin Immunopathol**, v.27, n.4, p.391-408. 2006.

- MORGAN, B. e D. DOLPHIN. Synthesis and Structure of Biomimetic Porphyrins In: (Ed.). **Synthesis and Structure of Biomimetic Porphyrins**. 1987.
- MORTON, C. A. Photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer--and more? **Arch Dermatol**, v.140, n.1, p.116-20. 2004.
- MORTON, C. A., K. E. MCKENNA, *et al.* Guidelines for topical photodynamic therapy: update. **Br J Dermatol**, v.159, n.6, p.1245-66. 2008.
- MUMOLI, N., J. VITALE, *et al.* Erythrodermic psoriasis. **QJM**, 2013.
- MURAKAWA, M., K. YAMAOKA, *et al.* Involvement of tumor necrosis factor (TNF)-alpha in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. **Biochem Pharmacol**, v.71, n.9, p.1331-6. 2006.
- NEDOSZYTKO, B., M. SOKOLOWSKA-WOJDYLO, *et al.* Chemokines and cytokines network in the pathogenesis of the inflammatory skin diseases: atopic dermatitis, psoriasis and skin mastocytosis. **Postepy Dermatol Alergol**, v.31, n.2, p.84-91. 2014.
- NEMETH, T. e A. MOCSAI. The role of neutrophils in autoimmune diseases. **Immunol Lett**, v.143, n.1, p.9-19. 2012.
- NESTLE, F. O., P. DI MEGLIO, *et al.* Skin immune sentinels in health and disease. **Nat Rev Immunol**, v.9, n.10, p.679-91. 2009.
- NESTLE, F. O., D. H. KAPLAN, *et al.* Psoriasis. **N Engl J Med**, v.361, n.5, p.496-509. 2009.
- NEUNER, P., A. URBANSKI, *et al.* Increased IL-6 production by monocytes and keratinocytes in patients with psoriasis. **J Invest Dermatol**, v.97, n.1, p.27-33. 1991.
- NICKOLOFF, B. J. e F. O. NESTLE. Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. **J Clin Invest**, v.113, n.12, p.1664-75. 2004.
- NICKOLOFF, B. J., H. XIN, *et al.* The cytokine and chemokine network in psoriasis. **Clin Dermatol**, v.25, n.6, p.568-73. 2007.
- NOGRALES, K. E., L. C. ZABA, *et al.* Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. **Br J Dermatol**, v.159, n.5, p.1092-102. 2008.
- NOKES, B., M. APEL, *et al.* Aminolevulinic acid (ALA): photodynamic detection and potential therapeutic applications. **J Surg Res**, v.181, n.2, p.262-71. 2013.
- NUMEROF, R. P. e K. ASADULLAH. Cytokine and anti-cytokine therapies for psoriasis and atopic dermatitis. **BioDrugs**, v.20, n.2, p.93-103. 2006.
- NURIEVA, R., X. O. YANG, *et al.* Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. **Nature**, v.448, n.7152, p.480-3. 2007.

ORTONNE, J. P. Aetiology and pathogenesis of psoriasis. **Br J Dermatol**, v.135, p.1-5. 1996.

OTUKI, M. F., R. C. REIS, *et al.* Patient-reported outcomes in psoriasis research and practice. **Br J Dermatol**, v.165, n.6, p.1361-2. 2011.

OTUKI, M. F., F. VIEIRA-LIMA, *et al.* Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and alpha-amyrin pentacyclic triterpene. **Eur J Pharmacol**, v.507, n.1-3, p.253-9. 2005.

PALFREEMAN, A. C., K. E. MCNAMEE, *et al.* New developments in the management of psoriasis and psoriatic arthritis: a focus on apremilast. **Drug Des Devel Ther**, v.7, p.201-10. 2013.

PENG, C. L., P. S. LAI, *et al.* The synthesis and photodynamic properties of meso-substituted, cationic porphyrin derivatives in HeLa cells. **Dyes and Pigments**, v.84, n.1, p.140-147. 2010.

PERERA, G. K., P. DI MEGLIO, *et al.* Psoriasis. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v.7, n.1, p.385-422. 2012.

PERERA, G. K., P. DI MEGLIO, *et al.* Psoriasis. **Annu Rev Pathol**, v.7, p.385-422. 2012.

PIETRZAK, A. T., A. ZALEWSKA, *et al.* Cytokines and anticytokines in psoriasis. **Clin Chim Acta**, v.394, n.1-2, p.7-21. 2008.

PINTO, N. B., T. C. MORAIS, *et al.* Topical anti-inflammatory potential of Physalin E from *Physalis angulata* on experimental dermatitis in mice. **Phytomedicine**, v.17, n.10, p.740-3. 2010.

POBER, J. S. e W. C. SESSA. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nat Rev Immunol**, v.7, n.10, p.803-15. 2007.

PROKSCH, E., J. M. BRANDNER, *et al.* The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, v.17, n.12, p.1063-1072. 2008.

RACZ, E. e E. P. PRENS. Phototherapy and photochemotherapy for psoriasis. **Dermatol Clin**, v.33, n.1, p.79-89. 2015.

RADAKOVIC-FIJAN, S., U. BLECHA-THALHAMMER, *et al.* Topical aminolaevulinic acid-based photodynamic therapy as a treatment option for psoriasis? Results of a randomized, observer-blinded study. **Br J Dermatol**, v.152, n.2, p.279-83. 2005.

RAHMAN, S., K. BHATIA, *et al.* Topically applied vitamin E prevents massive cutaneous inflammatory and oxidative stress responses induced by double application of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) in mice. **Chem Biol Interact**, v.172, n.3, p.195-205. 2008.

RAUT, A. S., R. H. PRABHU, *et al.* Psoriasis clinical implications and treatment: a review. **Crit Rev Ther Drug Carrier Syst**, v.30, n.3, p.183-216. 2013.

RAYCHAUDHURI, S. K., E. MAVERAKIS, *et al.* Diagnosis and classification of psoriasis. **Autoimmun Rev**, v.13, n.4-5, p.490-5. 2014.

RECIO, M. C., R. M. GINER, *et al.* In vivo activity of pseudoguaianolide sesquiterpene lactones in acute and chronic inflammation. **Life Sci**, v.66, n.26, p.2509-18. 2000.

REDIGHIERI, I. P., C. MAIA TDE, *et al.* Erythrodermic psoriasis with regression after prophylaxis with isoniazid and antidepressant therapy: case report. **An Bras Dermatol**, v.86, n.4, p.S141-3. 2011.

REICH, K. The concept of psoriasis as a systemic inflammation: implications for disease management. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v.26, p.3-11. 2012.

REICH, K., F. O. NESTLE, *et al.* Infliximab induction and maintenance therapy for moderate-to-severe psoriasis: a phase III, multicentre, double-blind trial. **Lancet**, v.366, n.9494, p.1367-74. 2005.

RENATA FERREIRA MAGALHÃES, A. C. BIRAL, *et al.* Human leukocyte antigen (HLA) and single nucleotide polymorphisms (SNPs) tumor necrosis factor (TNF)-alpha -238 and -308 as genetic markers of susceptibility to psoriasis and severity of the disease in a long-term follow-up Brazilian study. **International Journal of Dermatology**, v.49, p.7. 2010.

REINHARD, A., BRESSENOT, A., DASSONNEVILLE, R., *et al.* Photodynamic therapy relieves colitis and prevents colitis-associated carcinogenesis. **Inflamm Bowel Dis**. 2015; In press

ROBERSON, E. D. e A. M. BOWCOCK. Psoriasis genetics: breaking the barrier. **Trends Genet**, v.26, n.9, p.415-23. 2010.

RODRIGUEZ-CERDEIRA, C., A. MOLARES-VILA, *et al.* Study on Certain Biomarkers of Inflammation in Psoriasis Through "OMICS" Platforms. **Open Biochem J**, v.8, p.21-34. 2014.

ROZENBLIT, M. e M. LEBWOHL. New biologics for psoriasis and psoriatic arthritis. **Dermatol Ther**, v.22, n.1, p.56-60. 2009.

RUSSELL-JONES, R., A. M. POWELL, *et al.* The chances of a patient with melanoma developing in transit disease are doubled by undergoing sentinel lymph node biopsy (SLNB). **Eur J Surg Oncol**, v.31, n.2, p.210-1. 2005.

SANCHEZ, A. P. G. Imunopatogênese da psoríase Anais Brasileiro de Dermatologia, v.85, n.5, p.3. 2010.

SANCHEZ, T. e J. J. MORENO. Role of leukocyte influx in tissue prostaglandin H synthase-2 overexpression induced by phorbol ester and arachidonic acid in skin. **Biochem Pharmacol**, v.58, n.5, p.877-9. 1999.

SÁNCHEZ, T. e J. J. MORENO. Role of leukocyte influx in tissue prostaglandin H synthase-2 overexpression induced by phorbol ester and arachidonic acid in skin. **Biochemical Pharmacology**, v.58, p.877-879. 1999.

SANMIGUEL, J. C., F. OLARU, *et al.* Interleukin-1 regulates keratinocyte expression of T cell targeting chemokines through interleukin-1 receptor associated kinase-1 (IRAK1) dependent and independent pathways. **Cell Signal**, v.21, n.5, p.685-94. 2009.

SARRAZY, V., G. GARCIA, *et al.* Photodynamic effects of porphyrin-polyamine conjugates in human breast cancer and keratinocyte cell lines. **J Photochem Photobiol B**, v.103, n.3, p.201-6. 2011.

SCHACKE, H., W. D. DOCKE, *et al.* Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacol Ther**, v.96, n.1, p.23-43. 2002.

SCHLEYER, V., RADA KOVIC-FIJAN, S., *et al.* Disappointing results and low tolerability of photodynamic therapy with topical 5-aminolaevulinic acid in psoriasis. A randomized, double-blind phase I/II study. **J Eur Acad Dermatol Venereol**. v. 20, p. 823-8. 2006.

SCHOEPE, S., H. SCHACKE, *et al.* Glucocorticoid therapy-induced skin atrophy. **Exp Dermatol**, v.15, n.6, p.406-20. 2006.

SCHOTTELIUS, A. J., L. L. MOLDAWER, *et al.* Biology of tumor necrosis factor- $\alpha$ - implications for psoriasis. **Exp Dermatol**, v.13, n.4, p.193-222. 2004.

SERRA, V. V., A. ZAMARRON, *et al.* New porphyrin amino acid conjugates: synthesis and photodynamic effect in human epithelial cells. **Bioorg Med Chem**, v.18, n.16, p.6170-8. 2010.

SHAW, F. L., I. KIMBER, *et al.* No impairment of monocyte-derived Langerhans cell phenotype or function in early-onset psoriasis. **Clin Exp Dermatol**, v.37, n.1, p.40-7. 2012.

SILVA, E. R. D., E. P. D. SANTOS, *et al.* Terapia fotodinâmica no tratamento do câncer de pele: conceitos, utilizações e limitações. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.90, n.3, p.16. 2009.

SIMPLICIO, F. I., F. MAIONCHI, *et al.* Terapia Fotodinâmica: Aspectos Farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova**, v.25, n.5, p.6. 2002.

SINGRI, P., D. P. WEST, *et al.* Biologic therapy for psoriasis: the new therapeutic frontier. **Arch Dermatol**, v.138, n.5, p.657-63. 2002.

SKINNER, R. Role of topical therapies in the management of cutaneous disease. **J Cutan Med Surg**, v.8 Suppl 3, p.22-31. 2004.

SLOMP, A.M. Síntese e avaliação das propriedades fotodinâmicas da meso-tetraarilporfirinas em queratinócitos humanos (HaCaT). **Dissertação de Mestrado**, UFPR, 2012.

SMITS, T., KLEINPENNING, M.M., VAN ERP, E.P., et.al. A placebo-controlled randomized study on the clinical effectiveness, immunohistochemical changes and protoporphyrin IX accumulation in fractionated 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy in patients with psoriasis. **Br J Dermatol**.v.155, p. 429-36. 2006.

SONG, I. H., R. GOLD, *et al.* New Glucocorticoids on the Horizon: Repress, Don't Activate! **J Rheumatol**, v.32, n.6, p.1199-1207. 2005.

STAHN, C. e F. BUTTGEREIT. Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. **Nat Clin Pract Rheumatol**, v.4, n.10, p.525-33. 2008.

STANLEY, P. L., S. STEINER, *et al.* Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Skin Pharmacol**, v.4, n.4, p.262-71. 1991.

STEINHOFF, M., LUGER, T.A., The skin cytokine network. In: Bos JD, editor. Skin Immune System. **Cutaneous Immunology and Clinical Immunodermatology**. 3rd ed. Boca Raton, Florida: CRC Press; p.349-72, 2005.

STROWD, L. C., B. A. YENTZER, *et al.* Increasing use of more potent treatments for psoriasis. **J Am Acad Dermatol**, v.60, n.3, p.478-81. 2009.

SUN, X. e W. N. LEUNG. Photodynamic therapy with pyropheophorbide-a methyl ester in human lung carcinoma cancer cell: efficacy, localization and apoptosis. **Photochem Photobiol**, v.75, n.6, p.644-51. 2002.

SUNSHINE, H. R., J. HOFRICHTER, *et al.* Oxygen binding by sickle cell hemoglobin polymers. **J Mol Biol**, v.158, n.2, p.251-73. 1982.

SVENSSON, L., M. A. ROPKE, *et al.* Psoriasis drug discovery: methods for evaluation of potential drug candidates. **Expert Opin Drug Discov**, v.7, n.1, p.49-61. 2012.

TADA, H., O. SHIHO, *et al.* An improved colorimetric assay for interleukin 2. **J Immunol Methods**, v.93, n.2, p.157-65. 1986.

TAYLOR, M. N. e M. L. GONZALEZ. The practicalities of photodynamic therapy in acne vulgaris. **British Journal of Dermatology**, v.160, n.6, p.1140-1148. 2009.

TONEL, G. e C. CONRAD. Interplay between keratinocytes and immune cells--recent insights into psoriasis pathogenesis. **Int J Biochem Cell Biol**, v.41, n.5, p.963-8. 2009.

TOREZAN, L. Terapia fotodinâmica em dermatologia princípios. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.84, n.5, p.445-59. 2009.

TRÉMEZAYGUES, L. e J. REICHRATH. Vitamin D analogs in the treatment of psoriasis. **Dermato-Endocrinology**, v.3, n.3, p.6. 2011.

TURVEY, S. E. e D. H. BROIDE. Innate immunity. **J Allergy Clin Immunol**, v.125, n.2, p.S24-32. 2010.

VALENTINA RAPOZZI, S. Z., MARINA ZACCHIGNA, EMILIA DELLA PIETRA, SUSANNA COGOI, LUIGI E XODO. Anticancer activity of cationic porphyrins in melanoma tumour-bearing mice and mechanistic in vitro studies. **Molecular Cancer**, v.13, n.75, p.17. 2014.

VANDEVYVER, S., L. DEJAGER, *et al.* New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: an emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation. **Endocrinology**, v.154, n.3, p.993-1007. 2013.

VASSALLI, P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. **Annu Rev Immunol**, v.10, p.411-52, 1992.

VELDHOEN, M., R. J. HOCKING, *et al.* TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. **Immunity**, v.24, n.2, p.179-89. 2006.

VILLASENOR-PARK, J., D. WHEELER, *et al.* Psoriasis: evolving treatment for a complex disease. **Cleve Clin J Med**, v.79, n.6, p.413-23. 2012.

WILLIAMS, H. C. Clinical practice. Atopic dermatitis. **N Engl J Med**, v.352, n.22, p.2314-24. 2005.

WOHLRAB, J., G. FIEDLER, *et al.* Recommendations for detection of individual risk for comorbidities in patients with psoriasis. **Arch Dermatol Res**, v.305, n.2, p.91-8. 2013.

WOLLINA, U. e H. KONRAD. Treatment of recalcitrant psoriatic arthritis with anti-tumor necrosis factor-alpha antibody. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v.16, n.2, p.127-9. 2002.

WONG, T., L. HSU, *et al.* Phototherapy in psoriasis: a review of mechanisms of action. **J Cutan Med Surg**, v.17, n.1, p.6-12. 2013.

WONG, T. W., E. TRACY, *et al.* Photodynamic therapy mediates immediate loss of cellular responsiveness to cytokines and growth factors. **Cancer Res**, v.63, n.13, p.3812-8. 2003.

YANO, S., T. BANNO, *et al.* Transcriptional responses of human epidermal keratinocytes to cytokine interleukin-1. **J Cell Physiol**, v.214, n.1, p.1-13. 2008.

YANO, S., S. HIROHARA, *et al.* Current states and future views in photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v.12, n.1, p.46-67. 2011.