

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Celular

ROSÁLIA CATARINA DA SILVA

**REDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO PSORIÁSICA EM CAMUNDONGOS Δ dbIGATA-1
OU TRATADOS COM EVASINA-4**

BELO HORIZONTE, 2017

ROSÁLIA CATARINA DA SILVA

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

**REDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO PSORIÁSICA EM CAMUNDONGOS Δ dbIGATA-1
OU TRATADOS COM EVASINA-4**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Biologia Celular.
Orientador: Dr. Flávio Almeida Amaral

Mai de 2017

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

Orientador: Dr. Flávio Almeida Amaral

Agência financiadora: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico -CNPq; Fundação de Amparo à Pesquisa de MG - FAPEMIG.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Flávio Almeida Amaral, por me receber no laboratório, me orientar e por todo o aprendizado e paciência. Ao professor Mauro Martins Teixeira, por também me receber no laboratório, pelas discussões e sugestões para o trabalho. Ao grupo Imunofarmacologia pela receptividade, colaboração, aprendizado e muita amizade. Em especial à algumas pessoas que tiveram participação mais direta no trabalho: Luana, Rebeca, Nathália, Carol, Izabela e Puebla.

Ao professor Wagner Luiz Tafuri, a professora Milene Alvarenga Rachid e suas equipes por toda ajuda com as histologias. Ao Adriano Alves por todo suporte, conhecimento e paciência com análise das lâminas.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular pela oportunidade e pelo conhecimento prestado. Aos professores e colegas das disciplinas pelo conhecimento e aprendizado compartilhado. Aos funcionários da secretaria Rhuanna, Carol e Paula, por toda paciência, atenção e disponibilidade.

Agradeço às agências de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico -CNPq; Fundação de Amparo à Pesquisa de MG - FAPEMIG; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Capes pelo apoio financeiro.

Agradeço a minha família por todo apoio, incentivo e compreensão ao longo da minha trajetória acadêmica. Às gerações da república porteira, que se tornam um segundo lar. Aos amigos de fora do ICB e os aqui conquistados, por todo carinho e amizade.

Sem vocês teria sido bem mais difícil. Obrigada!

Resumo: A psoríase é uma doença inflamatória crônica da pele que afeta 2-3% da população mundial. Esta doença tem definição etiológica incompleta e é caracterizada pela proliferação e diferenciação desregulada de queratinócitos, angiogênese dérmica e infiltrado inflamatório. As primeiras alterações na psoríase são guiadas pela produção de IL-23 pelas células dendríticas da derme, citocina que atua nas células $T\gamma\delta$ e promove a liberação de IL-22 e IL-17. Estas citocinas juntamente a produção de IFN- γ e TNF, levam à proliferação dos queratinócitos, bem como a produção de outras citocinas, quimiocinas e adenosina monofosfato, fatores que levam à amplificação da resposta inflamatória. O infiltrado inflamatório é composto principalmente por neutrófilos, mas relatos da literatura descrevem que ocorre infiltrado de eosinófilos e a liberação dos seus grânulos nas lesões psoriasiformes, além do aumento desses leucócitos no sangue de pacientes com psoríase. Porém, as funções dos eosinófilos na psoríase não estão muito bem estabelecidas. **Objetivo:** Investigar o papel dos eosinófilos na inflamação psoriasiforme induzida por Imiquimode em camundongos. **Material e métodos:** Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c selvagens e camundongos deficientes em eosinófilos (Δ dblGATA-1). A psoríase experimental foi induzida através do tratamento tópico com Imiquimode (IMQ) no dorso dos animais por 4 dias consecutivos. Ainda, um grupo de camundongos selvagens foram tratados com Evasina-4, uma proteína ligante de CCL11, quimiocina importante para o recrutamento de eosinófilos. A análise da inflamação e dano tecidual foram realizadas por meio de escore clínico, imagens histológicas e ensaios enzimáticos. **Resultados:** O uso tópico de IMQ no dorso dos animais selvagens induz um aumento da atividade de peroxidase eosinofílica na lesão, a qual apresenta intensa descamação, eritema e acúmulo de neutrófilos (atividade de mieloperoxidase), células associadas com a inflamação psoriásica. Animais Δ dblGATA-1 desenvolvem lesões bem menores quando comparados com os animais selvagens, demonstrado por menor escore clínico (descamação e eritema) e histopatológico (acantose, paraqueratose e hiperqueratose) e infiltrado inflamatório. Além disso, o tratamento com uma proteína ligante de CCL11 foi eficaz em reduzir as lesões psoriasiformes em relação ao grupo tratado com veículo após a aplicação de IMQ. **Conclusão:** Neste estudo, demonstramos que os eosinófilos têm importante participação no desenvolvimento das lesões cutâneas em um modelo experimental de psoríase. O bloqueio do recrutamento e da atividade de eosinófilos mostra-se eficaz na redução de parâmetros clínicos e inflamatórios da lesão psoriásica, abrindo novas possibilidades investigativas, principalmente no aprofundamento dos mecanismos envolvidos nesse contexto.

ABSTRACT

Psoriasis is a chronic inflammatory skin disease that affects 2-3% of the world's population. This disease has incomplete etiologic definition and is characterized by the unregulated proliferation and differentiation of keratinocytes, dermal angiogenesis and inflammatory infiltrate. Early changes in psoriasis are guided by the production of IL-23 by dendritic cells of the dermis that acts on T γ δ cells and promotes the release of IL-22 and IL-17. Together, these cytokines stimulate the production of IFN- γ and TNF that induce the proliferation of keratinocytes and the production of other cytokines, chemokines and adenosine monophosphate, factors that have important role in the amplification of the inflammatory response. The inflammatory infiltrate is composed mainly by neutrophils, but reports from the literature also describe the presence of eosinophils and their granules in the psoriasiform lesions and in the blood of patients with psoriasis. However, the role of eosinophils in psoriasis is not very well established. **Objective:** We aimed to investigate the role of eosinophils in Imiquimod (IMQ)-induced psoriasis inflammation in mice. **Material and methods:** Wild-type mice BALB/c and eosinophil deficient mice (Δ dblGATA-1) were used. Experimental psoriasis was induced by topical application of IMQ on the back of animals for 4 consecutive days. In addition, a group of wild-type mice were treated with Evasin-4, a CCL11-binding protein, chemokine important for eosinophil recruitment. The analysis of inflammation and tissue damage were performed through clinical score, histological images, and enzymatic assays. **Results:** The topical use of IMQ on the back of wild-type animals induces an increase in eosinophil peroxidase activity in the lesion, which has intense scaling, erythema and neutrophil accumulation (myeloperoxidase activity), cells that are associated with psoriatic inflammation. Δ dblGATA-1 animals develop reduced skin lesions when compared to wild-type animals, as shown by lower clinical (scaling and erythema) and histopathological (acanthosis, parakeratosis and hyperkeratosis) scores and reduced inflammatory infiltrate. In addition, treatment with a Evasin-4 was effective in reducing the psoriasiform lesions in comparison to vehicle-treated group after IMQ application. **Conclusion:** In this study, we demonstrated that eosinophils have an important role in the development of cutaneous lesions in an experimental model of psoriasis. The absence or reduced presence of eosinophil is effective in reducing the clinical and inflammatory parameters of the psoriatic lesion, opening up new investigative possibilities, mainly in the deepening of the mechanisms involved in this context.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Protocolo de indução à psoríase.....	26
Figura 2: Avaliação dos parâmetros clínicos em animais WT.....	32
Figura 3: Avaliação dos parâmetros histológicos em animais WT.....	34
Figura 4: Fluxo sanguíneo pela técnica de laser doppler em animais WT.....	36
Figura 5: Avaliação do influxo de eosinófilos e neutrófilos nas lesões psoriasiforme.....	37
Figura 6: Avaliação dos efeitos sistêmicos da psoríase.....	38
Figura 7: Avaliação dos parâmetros clínicos em animais Δ dbIGATA-1.....	39
Figura 8: Análise histopatológica em animais Δ dbIGATA-1.	41
Figura 9: Fluxo sanguíneo em animais Δ dbIGATA-1.....	42
Figura 10: Atividade de mieloperoxidase em animais Δ dbIGATA-1.....	43
Figura 11: Avaliação dos efeitos sistêmicos Δ dbIGATA-1	44
Figura 12: Avaliação de parâmetros clínicos em animais tratados com Evasina-4.	45
Figura 13: Avaliação histopatológica em animais tratados com Evasina-4.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Definição dos parâmetros histopatológicos avaliados na pele.....	29
---	----

ABREVIações

AMP - monofosfato de adenosina

cAMP - Peptídeo antimicrobiano de catelicidina humana

ELISA- Ensaio Imunoenzimático Ligado à Enzima

EPO - Peroxidase eosinofílica

GATA 1 - Fator de transcrição de diferenciação de eosinófilos

HE- Hematoxilina e eosina

IFN- γ - Interferon-gama

IMQ - Imiquimode

ILCs - Células linfóides inatas

MAPKs - Proteína-quinases ativadas por mitógenos

MPO - Mieloperoxidase

NF- κ B - Fator nuclear kappa B

PASI - Índice de Gravidade da Psoríase por Área

TNF - Fator de necrose tumoral

TLR - Receptor do tipo Toll

WT - Animais do tipo selvagem

Δ dbIGATA-1- Animais deficientes em eosinófilos

SUMÁRIO

1.1 Estrutura da pele	10
1.2 Psoríase - Considerações gerais	11
1.3 Resposta inflamatória na psoríase	13
1.5 Eosinófilos	17
2.1 Objetivos específicos	24
- Padronizar o modelo de psoríase induzida por Imiquimode e avaliar os parâmetros clínicos, histopatológicos e inflamatórios na psoríase induzida por Imiquimode	24
- Avaliar o papel dos eosinófilos no desenvolvimento da psoríase experimental em camundongos deficientes em eosinófilos (Δ dblGATA-1).	24
- Avaliar os efeitos do tratamento com Evasina-4 no desenvolvimento da lesão psoriasiforme induzida por IMQ em animais selvagens.	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Animais	24
3.2 Indução da psoríase experimental	25
3.3 Tratamento com Evasina-4	26
3.4 Escore clínico da doença	26
3.5 Atividade da mieloperoxidase (MPO)	27
3.6 Atividade peroxidase eosinofílica (EPO)	27
3.7 Análise histológica	28
3.8 Imagem de perfusão por Laser Doppler	29
3.9 Avaliação da massa esplênica	29
3.10 Análise estatística	30
4. RESULTADOS	31
4.1 Padronização do modelo experimental de psoríase induzida por IMQ	31
4.1.1 Avaliação dos parâmetros clínicos e morfológicos na pele psoriasiforme.	31
4.1.2 Avaliação dos parâmetros inflamatórios nas lesões psoriasiformes	35
4.1.3 Avaliação dos efeitos sistêmicos da psoríase experimental	37
4.2 Eosinófilos têm um papel importante na lesão psoriasiforme induzida por IMQ	38
4.2.1 Avaliação dos parâmetros clínicos e morfológicos em animais ΔdblGATA-1	38
4.2.3 Efeitos sistêmicos da psoríase experimental	43
4.3 Evasina-4 como estratégia terapêutica para o tratamento das lesões psoriasiformes	44
4.3.1 Avaliação dos parâmetros clínicos e morfológicos	44
5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	54
ANEXO 1	65

1. INTRODUÇÃO

1.1 Estrutura da pele

A pele é a linha de frente na defesa do corpo, formada por três grandes segmentos de tecido. A epiderme, composta principalmente de queratinócitos, mas com uma população integrante de células dendríticas, denominadas células de Langerhans, linfócitos T $\gamma\delta$ (HAVRAN; JAMESONET; 2010) e células linfoides inatas (ILCs) (SALIMI; OGG, 2014). A derme é composta em maior parte por tecido conjuntivo com presença de vasos sanguíneos e diferentes tipos celulares, incluindo leucócitos, além de associação com folículos pilosos, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas (LOWES; FARINAS; KRUEGER; 2014. MACNEIL, 2007)

A epiderme humana é um epitélio estratificado que segue um programa de proliferação e diferenciação fortemente regulado com uma delicada interação de renovação e diferenciação de células estaminais para manter a homeostase dos tecidos. É formada por queratinócitos que sofrem diferenciação progressiva, em que as células proliferativas (camada basal) se diferenciam em queratinócitos espinhosos (camada espinhosa) e depois granulares (camada granular) (Figura 2)(NOSKE et al., 2016). Os queratinócitos da camada granular expressam várias moléculas associadas à imunidade inata, como os peptídeos antimicrobianos (AMPs) incluindo S100A7 (psoriasina), S100A8 (calgranulina A), S100A9 (calgranulina B), lipocalina 2, β -defensina e catelicidina (CAMP / LL-37) (SORENSEn, et al.) Com maior diferenciação, os queratinócitos granulares sofrem transição para corneócitos e perdem seus núcleos, mas ganham uma estrutura de membrana de proteína denominada envelope cornificado, dentre o qual muitas camadas de lipídios são depositadas (estrato córneo) (NESTLE et al., 2009). . Efetivamente, a camada cornificada cria uma barreira física para a perda de água

para fora, bem como à penetração de microrganismos para dentro. (LOWES; FARINAS; KRUEGER; 2014. NESTLE et al., 2009).

O tecido conectivo da pele, a derme, fornece suporte estrutural para os vasos, apêndices e epiderme, que são vitais para a função da pele. A integridade estrutural e a função da derme dependem principalmente da sua matriz extracelular, que é composta principalmente por fibrilas de colágeno tipo I. O colágeno tipo I é a proteína estrutural mais abundante na pele (FISHER et al., 2009). Em sua composição celular, a derme é constituída por fibroblastos, células endoteliais, pericitos, células dendríticas, macrófagos, terminações nervosas, células musculares lisas (NESTLE et al., 2009) e telócitos que são células intersticiais envolvidas na homeostase da pele (MANOLE; GHERGHICEANU; SIMIONESCU; 2015). (LOWES; FARINAS; KRUEGER; 2014).

1.2 Psoríase - Considerações gerais

A psoríase é uma doença inflamatória crônica da pele que afeta 2-3% da população mundial (HYE- LIN HA et al, 2014). É uma desordem comum da pele e está associada a fatores físicos e psicológicos. Ainda há muitos desafios relacionados à psoríase, visto que é uma doença com elevada taxa de prevalência, cronicidade, desfiguração, incapacidade e comorbidade associada (BOEHNCKE; SCHON; 2015). É caracterizada por episódios recorrentes de placas cutâneas vermelhas, escamosas, que se desenvolvem na pele aparentemente normal (HYE- LIN HA et al, 2014).

Esta doença tem definição etiológica incompleta e é caracterizada pela proliferação e diferenciação desregulada de queratinócitos, angiogênese dérmica e infiltração de células do sistema imune. O desenvolvimento da psoríase envolve uma intrincada interação de fatores genéticos e ambientais. Foram identificados múltiplos

loci de genes de susceptibilidade, incluindo genes que codificam proteínas envolvidas na diferenciação e função dos queratinócitos, bem como proteínas envolvidas em respostas inflamatórias (HYE- LIN HA et al, 2014).

A psoríase é classificada em cinco tipos (BOEHNCKE et al. 2015):

- Psoríase em placas, também conhecida como psoríase vulgar. É a forma mais comum da doença e ocorre em cerca de 90% dos casos. As lesões típicas são as placas eritematosas monomórficas, claramente demarcadas, cobertas por escamas lamelares prateadas. As placas podem apresentar quantidades e tamanhos variados.

- A psoríase invertida é uma variação que ocorre de acordo com o sítio da psoríase, áreas de flexão e intertriginosas. Geralmente aparecem desprovidas de escamas devido ao atrito e umidade nestes locais. A sebo psoríase é resultado da ocorrência simultânea da psoríase e dermatite seborréica e tipicamente ocorre na face, couro cabeludo e pele pre-esternal.

- Gutata (gota) ou psoríase eruptiva é caracterizada por manchas escamosas em forma de lágrima.

- A psoríase pustulosa é caracterizada por pústulas aglutinadas brancas, formadas por bolhas de pus não infeccioso. Pode ocorrer na palma da mão e parte inferior dos pés, psoríase palmoplantar, ou psoríase pustulosa generalizada, uma forma rara e grave de psoríase.

- Psoríase eritrodérmica é uma forma rara, porém grave da doença. Qualquer forma de psoríase pode se tornar eritrodérmica.

O cenário inflamatório leva a alterações histopatológicas que são características marcantes em quase todos os tipos de células cutâneas nas lesões psoriásicas. Em contraste com a pele normal, a pele psoriásica apresenta acantose epidérmica, espessamento de camadas viáveis; hiperqueratose, maior produção de queratina; e paraqueratose, retenção do núcleo na camada córnea da epiderme. Também pode ser observado um alongamento da epiderme para a derme formando cristas epidérmicas entre as papilas dérmicas. Na derme, vasos sanguíneos aparecem mais dilatados e contorcidos (BOEHNCKE, et al 2015).

A psoríase está associada ao aumento no desenvolvimento de outras doenças crônicas, bem como comorbidades graves, como síndrome metabólica e doença cardiovascular, provavelmente refletindo um componente inflamatório sistêmico da doença. Dentre as doenças comórbidas, incluem artrite psoriásica, asma, ansiedade e depressão, doença hepática gordurosa não alcoólica, doença de Crohn e linfoma (HYE- LIN HA et al, 2014. BOEHNCKE; SCHON; 2015).

1.3 Resposta inflamatória na psoríase

A psoríase pode ser provocada por gatilhos não específicos, como trauma leve (arranhões, *piercings* e tatuagens), queimaduras solares, ou irritantes químicos. Os fármacos sistêmicos tais como os β bloqueadores, o lítio, os antipalúdicos e os agentes antiinflamatórios não esteróides podem exacerbar a doença. A psoríase pode ser desencadeada ou agravada por fatores de risco ocupacionais que prejudicam a função da barreira cutânea (MAHLER et al 2014).

As lesões cutâneas da psoríase se originaram das interações desreguladas de componentes inatos e adaptativos do sistema imunológico com células cutâneas (BOEHNCKE; SCHON; 2015). As primeiras alterações na psoríase são guiadas pela grande produção de interleucina 23 (IL-23) pelas células dendríticas, em sua maior

parte estimuladas pelas fibras nervosas sensoriais TRPV1⁺Nav1.8⁺ (RIOL BLANCO, et al., 2014). A IL-23, por sua vez, atua nos receptores de IL-23 das células T $\gamma\delta$ e promove a liberação de interleucina 22 (IL-22) (BONIFACE et al 2007) e interleucina 17 (IL-17) (KRYCEK et al 2008). A produção dessas citocinas precede a migração de leucócitos, como neutrófilos, monócitos e linfócitos para o tecido. IL-17 e IL-22, juntamente com outras citocinas como, interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF), levam a proliferação dos queratinócitos, bem como a produção de outras citocinas, quimiocinas e adenosina monofosfato, fatores que levam a auto-amplificação da doença agindo nas células dendríticas, linfócitos T e neutrófilos (BOEHNCKE; SCHON; 2015. LOWES; FARINAS; KRUEGER; 2014. RIOL BLANCO, et al., 2014).

As células dendríticas residentes da epiderme (células de Langerhans) e da derme (DDCs) são essenciais para o desenvolvimento da psoríase e produção de IL-23, sendo que a ausência das DDCs apresentam maior impacto na produção de IL-23 (RIOL BLANCO et al, 2014). A ativação de células T residentes na pele via IL23 e IL12 leva à produção de IFN- γ , IL-17 e IL-22 (LEW et al 2004). Isto pode levar à produção de quimiocinas seletivas para determinados tipos de leucócitos que então amplificam as respostas efetoras direcionadas. Desta forma, a ativação Th1, com a produção aumentada de IFN- γ , induz a síntese de quimiocinas como CXCL9, CXCL10 e CXCL11 que podem recrutar mais células Th1 (LEW et al 2004). Do mesmo modo, a ativação de células T produtoras de IL-17, que conduz à liberação de IL-17, ativa a síntese de CCL20, CXCL1, CXCL2 e CXCL8, levando ao recrutamento de mais células T produtoras de IL-17 e neutrófilos para a pele. A IL-17 é também um forte indutor para síntese de AMPs (adenosina monofosfato) em queratinócitos. A ativação de células Th22 resulta num aumento da produção de IL-22, que pode induzir hiperplasia nos queratinócitos. Isto induz um gatilho para uma

via de crescimento epidérmico regenerativo o que leva a um crescimento mais rápido dos queratinócitos, com subsequente liberação dessas células na superfície (NOGRALES, et al 2008).

A interleucina 17, na pele psoriática, é produzida por células T CD4⁺, células T CD8⁺ epidérmicas, neutrófilos, mastócitos e macrófagos. Seu mecanismo de ação com sinalização mediada por CIKS [ligação a I κ B quinase e proteína quinase ativada por estresse, também conhecida como "Act1" (NF- κ Bativador 1)] em queratinócitos é essencial para o microabscessoneutrofílico e contribui para a hiperproliferação e diferenciação atenuada dos queratinócitos, pelo menos em parte através de efeitos diretos. Por outro lado, a sinalização mediada por citocinas IL-17/CIKS em células que não queratinócitos, particularmente em fibroblastos dérmicos, promove a infiltração celular e leva a acumulação de células T $\gamma\delta$ produtoras de IL-17 na pele. Assim, a sinalização mediada por CIKS é central no desenvolvimento de características cutâneas e epidérmicas da psoríase, induzindo doenças distintas através de efeitos específicos em células alvo (HYE- LIN HA et al, 2014).

Na psoríase os níveis de IL-22 se mostram aumentados, provavelmente como resultado dos níveis de IL-23 e IL-6 também aumentados. A IL-22 atua sinergicamente com IL-17 para aumentar a expressão de peptídeos antimicrobianos que estão elevados na psoríase. Mais significativamente, ela medeia acantose epidérmica e diferenciação anormal dos queratinócitos que são achados patológicos chave na psoríase. A produção de IL-22 é comumente atribuída às células Th17. Aproximadamente 40% das células T auxiliares produtoras de IL-22 na psoríase são células Th17. No entanto, pouca sobreposição entre células T que expressam IL-17, e as que expressam IL-22, em pele normal ou psoriásica é observado. A maioria das células IL-22⁺ são produtoras únicas que não co-expressam IL-17 ou IFN γ (NOGRALES, et al 2008; 2010).

Além das citocinas mencionadas acima, interleucina 36 (IL-36), membro da família da IL-1, também tem importante papel na patogênese da psoríase. Estudos de expressão gênica demonstraram que IL-36 α e IL-36 γ são supra reguladas em lesões psoriáticas cutâneas e existe uma forte correlação entre a expressão de IL-36 α e IL-36 γ em lesões psoriáticas humanas com a expressão de outras citocinas, incluindo IL-17, IL-23, TNF e IFN- γ , sugerindo que um ciclo positivo de expressões de genes pode ocorrer na psoríase. IL-36 α e IL-36 γ tem um receptor comum e a sua ligação a esse receptor leva a liberação de fatores de transcrição, como factor nuclear kappa B (NF- κ B) e proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) (CARRIER, et al 2011).

Os neutrófilos são os primeiros tipos de células presentes nas placas psoriáticas e uma das fontes celulares predominantes de citocina pró-inflamatória IL-17, os neutrófilos também desempenham um papel importante nas comorbidades da psoríase, como a aterosclerótica (LANGLEY, et al 1977). Além disso, marcadores de neutrófilos incluindo os níveis séricos de MPO (mieloperoxidase), S100A8/ A9 (calprotectina) e NE-1 (elastaseneutrofílica 1) aparecem significativamente maiores em pacientes com psoríase (HALEY, et al 2015).

1.4 Modelo experimental

Um dos modelos de lesão psoriasiforme mais aceitos na literatura é induzido pela aplicação tópica do creme Imiquimode (IMQ) no dorso depilado dos animais (VAN-DER-FITS, et al., 2009). IMQ é um ligante de TLR7 e TLR8 e um potente ativador imune, usado para o tratamento tópico de verrugas perianais causadas pelo vírus do papiloma humano (BEUTNER, et al 1997). Também é indicado para o tratamento de outras anomalias cutâneas associadas ao vírus como pré-lesões

cutâneas cancerosas, queratoses actínicas e carcinomas basocelulares superficiais. O uso de IMQ pode exacerbar a psoríase em pacientes com psoríase controlada durante o tratamento tópico de queratoses actínicas e carcinomas basocelulares superficiais. A exacerbação da psoríase induzida por IMQ ocorre tanto na área tratada como também em locais distantes da pele tratada (GILLIET, et al 2004).

A aplicação tópica de IMQ induz inflamação na pele de camundongos que se assemelha em vários aspectos à psoríase humana. Essa inflamação é mediada pelas citocinas IL-23 / IL-17 e ativação de DCs, levando ao quadro patológico característico da psoríase (HYE- LIN HA et al, 2014; LOWES; FARINAS; KRUEGER; 2014).

1.5 Eosinófilos

Os eosinófilos são granulócitos associados à defesa do hospedeiro contra helmintos parasitários, à patogênese das condições alérgicas e, mais recentemente relatado, às respostas imunorreguladoras (MUNIZ; WELLER; NEVES, 2012). São leucócitos pleiotrópicos multifuncionais envolvidos na propagação de diversas respostas inflamatórias (HOGAN et al., 2008).

Os eosinófilos apresentam níveis relativamente baixos no sangue, aproximadamente 1-3% dos glóbulos brancos. Também ocorrem fora da medula óssea e dos vasos sanguíneos: na medula e na junção entre o córtex a medula do timo, no trato gastrointestinal inferior, ovário, útero, baço e linfonodos. Em condições alérgicas, são encontradas no pulmão, pele e esófago. Os eosinófilos persistem na circulação de 8 a 12 horas e podem sobreviver nos tecidos entre 8 e 12 dias na ausência de estímulo (YOUNG B, et al 2006). Os eosinófilos são distinguidos com base em suas características morfológicas, apresentam núcleo bilobado e grânulos citoplasmáticos que se coram em rosa, apresentam cerca de 12 a 17 µm de diâmetro (UHM; KIM; CHUNG, 2012)

Os eosinófilos são produzidos na medula óssea a partir de células-tronco pluripotenciais que se diferenciam em um precursor híbrido com propriedades compartilhadas de basófilos e eosinófilos e, em seguida, em uma linhagem com mais características de eosinófilos. A especificação da linhagem de eosinófilos é ordenada pela interação de pelo menos três classes de fatores de transcrição, incluindo GATA-1 (Família de fatores de transcrição contendo duas sequências de dedo de zinco e se ligam à sequência (A/T)GATA(A/G) (MCNAGNY et al. 2002) do DNA, especificamente expresso em leucócitos), PU.1 (um membro da família ETS, que reconhece uma sequência rica em purinas) (NERLOV, et al 1998a) e membros C/EBP (CCAAT /família de proteínas de ligação ao intensificador) (NERLOV, et al 1998b). Destes fatores de transcrição, o GATA-1 é o mais importante na diferenciação dos eosinófilos, e sua deleção direcionada é capaz de eliminar a linhagem específica de eosinófilos. Três citocinas são particularmente importantes no desenvolvimento dos eosinófilos: IL-3, IL-5 e GM-CSF (fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos), (LOPEZ, et al 1986. ROTHENBERG et al. 1988) sendo a IL-5 é a mais específica da linhagem e responsável pela diferenciação seletiva dos eosinófilos (ROTHENBERG; HOGAN, 2006).

O recrutamento de eosinófilos para os tecidos é mediado pela interação de componentes como citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão e seus respectivos receptores (BLACHARD et al 2009). O recrutamento para locais inflamatórios envolve marginação, rolamento ao longo das células endoteliais, adesão ao endotélio, diapedese transendotelial e quimiotaxia (ZHU et al. 2013). A pré ativação dos eosinófilos é o resultado dos efeitos de numerosos mediadores inflamatórios, incluindo citocinas e TLRs que são receptores que desempenham papéis cruciais no sistema imune inato, reconhecendo padrões moleculares associados ou não a patógenos (KOENDERMAN et al. 2013). O rolamento é

primeiramente mediado por moléculas de adesão, tais como selectinas. No processo de rolamento, há a ativação de uma outra família de moléculas de adesão, as integrinas, as quais tem afinidade maior com as integrinas das células endoteliais (GIEMBYCY et al. 1999). As moléculas de adesão de células endoteliais, como a molécula de adesão celular vascular VCAM-1, ativam-se para formar passagens entre as células permitindo a diapedese. O recrutamento principalmente governada por quimiocinas, particularmente a família das eotaxinas (ZHU et al. 2013).

A migração dos eosinófilos envolve uma série de moléculas, algumas participam de forma indireta no recrutamento, como as citocinas, em particular as produzidas por linfócitos Th2 e células endoteliais como IL-4, IL-5 e IL-13 (HORIE et al 1997); e de forma direta apenas as quimiocinas participam do recrutamento, por exemplo, CCL5 e as eotaxinas (CCL11, CCL24 e CCL26 - em humanos) (ZIMMERMANN et al 2003) e outras moléculas recentemente identificadas, por exemplo, as quitinase ácidas de mamíferos (ZHU et al 2004). A IL-5 modula o recrutamento dos eosinófilos enquanto as eotaxinas participam seletivamente na recrutamento (ROTHENBERG; HOGAN, 2006). A IL-5 regula o crescimento, a diferenciação, a ativação e a sobrevivência dos eosinófilos mantendo um sinal essencial para a expansão e mobilização dos eosinófilos da medula óssea para o tecido (COLLINS et al 1995. HOGAN et al., 2008). No pulmão após exposição a alérgenos a IL- 5 se mostra importante no recrutamento dos eosinófilos, porém, a ausência de IL-5 não foi capaz de eliminar a migração dos eosinófilos para o pulmão (HOGAN et al., 2008). O recrutamento de eosinófilos gastrointestinais é regulado pela expressão constitutiva de CCL11, como demonstrado pela diminuição acentuada desta população de células em camundongos deficientes em CCL11. A importância da CCL11 na regulação do nível basal de eosinófilos é reforçada pela observação de que os camundongos com a deleção de CCR3 também têm uma

deficiência em eosinófilos gastrointestinais (HUMBLES et al 2002). A CCL11 também é importante em condições homeostáticas. Eosinófilos residentes do timo e glândula mamária são mantidos pela CCL11 produzidas no tecido (ROTHENBERG; HOGAN, 2006).

Os eosinófilos secretam uma matriz de proteínas catiônicas de grânulos citotóxicos, proteína básica principal (MBP), proteína catiônica eosinofílica (ECP), peroxidase eosinofílica (EPO) e neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN) que são capazes de causar lesão tecidual e disfunção. Os grânulos de eosinófilos contêm um cristalóide composto de MBP-1/2 e uma matriz composta de ECP, EDN, e EPO (ROTHENBERG; HOGAN, 2006). Além disso, esses grânulos contêm uma diversidade de citocinas pré-formadas, quimiocinas, enzimas e fatores de crescimento, incluindo IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 e IL-13, IFN γ , TNF, NGF, GM-CSF, TGF α , (CCL5), (CCL11), oncogene- α ligado ao crescimento e peptídeo de ativação neutrofílica epitelial 78/CXCL5 (MUNIZ; WELLER; NEVES, 2012).

As proteínas MBP, EPO e ECP são tóxicas para uma variedade de tecidos, como já foi demonstrado em coração, cérebro e epitélio brônquico. ECP e EDN são ribonucleases e já foi demonstrado possuir atividade antiviral, a ECP provoca poros tóxicos seletivos aos íons não sensíveis à voltagem nas membranas das células alvo, facilitando possivelmente a entrada de outras moléculas citotóxicas (ROTHENBERG; HOGAN, 2006).

Além de secretar uma variedade de moléculas, os eosinófilos humanos ativados podem sofrer morte celular com formação de armadilhas de DNA extracelular (ETosis) em resposta a imunoglobulinas (IgG, IgA), citocinas com fator ativador de plaquetas, ionóforo de cálcio ou acetato de miristato de forbol e se desenvolve em 120 minutos com uma forma reduzida de NADP (NADPH) oxidase-

dependente. Os grânulos de eosinófilos libertados com EETose, que ainda retém proteínas de grânulos cationicoseosinofílicos, podem ser secretados após a estimulação com a quimiocina CCL11. A formação de EETose têm sido documentada em diversas doenças, incluindo dermatite atópica, alergia nasal, e com a gravidade da urticária (UEKI et al., 2012).

Os eosinófilos estão envolvidos em vários processos inflamatórios (Efraim, et al. 2013). Dentre eles é bem reportado o papel na resposta do hospedeiro às infecções causadas por vírus, fungos e bactérias, bem como parasitas. Os eosinófilos secretam ribonucleases, EDN e ECP, que possuem efeitos antivirais (BYSTROM, AMIN, BISHOP-BAILEY, 2011). Além disso, os eosinófilos expressam receptores superficiais e intracelulares tais como TLRs e ligantes de TLR. Os eosinófilos parecem reagir aos fungos ambientais e patogênicos por uma variedade de mecanismos incluindo a morte dependente do contato, a libertação de grânulos citotóxicos, proteínas e produção de mediadores pró-inflamatórios. Nas interações com organismos bacterianos, os eosinófilos são capazes de fagocitar, libertar as suas proteínas granulares e produzir armadilhas extracelulares de DNA mitocondrial (SHAMRI et al. 2011. RAVIN; LOY, 2015).

Níveis elevados de proteínas presentes nos grânulos dos eosinófilos, como a proteína básica maior (MBP), foram encontrados no líquido de lavagem broncoalveolar (BAL) de pacientes com asma e evidências indicam que a alta de produtos da degranulação têm contribuído para o desenvolvimento de hiperreatividade das vias aéreas (AHR) na asma. Utilizando um modelo experimental de asma, pesquisadores demonstraram que bloquear o recrutamento de eosinófilos para tecido pode ser uma estratégia terapêutica interessante. Neste estudo, foi utilizada uma molécula isolada da saliva de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* e que é um ligante natural das quimiocinas CCL5 e CCL11, que são de importância

fundamental no recrutamento dos eosinófilos, denominada Evasina-4. (HAJNICKA et al., 2005. FRAUENSCHUH et al 2007. VIEIRA et al., 2009; ROTHENBERG; HOGAN, 2006). Assim, o tratamento com Evasina-4 se mostrou eficiente em reduzir o influxo de eosinófilos para a cavidade pleural tanto induzida por CCL11 como por antígeno em animais sensibilizados, melhorando o quadro clínico dessa doença (ALESSANDRI, 2007). Ainda utilizando um modelo experimental de asma, a indução da morte por apoptose de eosinófilos por H₂O₂ estimulou o início da resolução da inflamação tecidual, melhorando, conseqüentemente, houve uma redução significativa dos danos teciduais neste modelo (REIS et al., 2015). Assim, a interferência direta no recrutamento ou viabilidade de eosinófilos pode ser útil como terapia neste contexto de doença.

Existe uma ampla gama de doenças da pele que são caracterizadas por infiltrado e ou degranulação de eosinófilos, essas manifestações são conhecidas como doenças eosinofílicas da pele ou dermatoses eosinofílicas. Dentre as dermatoses eosinofílicas mais comuns encontram-se as alergias, incluindo erupção de drogas alérgicas, urticária, dermatite de contato alérgica, dermatite atópica e eczema, bem como prurigos. Outros distúrbios frequentemente vistos associados à eosinofilia da pele incluem infestações parasitárias, mordidas de artrópodes, vasculite urticariana e doenças de pele auto-imunes, tais como dermatite herpetiforme e penfigóide bolhoso (LONG et al., 2015),

Além destas doenças de pele comuns e bem caracterizadas, existem vários tipos raros de dermatoses eosinofílicas de origem desconhecida. Em cada uma dessas raras dermatoses a infiltração do eosinófilo afeta camadas específicas do tecido ou estruturas anexas da pele, tais como a derme, a gordura subcutânea, a fáscia, os folículos e os vasos cutâneos e é considerada como um componente central implicado nos mecanismos patogênicos. Alguns exemplos típicos são celulite

eosinofílica, granuloma faciale, foliculite pustulosa eosinofílica, vasculite eosinofílica cutânea recorrente e fascíte eosinofílica (LONG et al., 2015).

Estudos em pacientes com psoríase mostraram um aumento dos eosinófilos tanto no sangue como nas áreas de lesões da pele (MANSUR; GÖKTAY; YAŞAR, 2008). LUNDIN (1989), realizou análise em biópsias de pacientes psoriásicos e usando marcadores para eosinófilos ativados e secreção de grânulos demonstrou que a concentração de proteína catiônica eosinofílica está aumentada no fluido de lesões em pacientes com doença aguda e progressiva, demonstrando assim a presença e ativação dos eosinófilos nas lesões psoriásicas. Porém, ainda não está estabelecido o papel dos eosinófilos na lesão psoriásica. Assim, estudos mais detalhados ainda são necessários para melhor caracterização do papel dessas células no desenvolvimento e lesões da psoríase.

2. OBJETIVOS

Investigar o papel dos eosinófilos na inflamação psoriasiforme induzida por Imiquimode em camundongos.

2.1 Objetivos específicos

- Padronizar o modelo de psoríase induzida por Imiquimode e avaliar os parâmetros clínicos, histopatológicos e inflamatórios na psoríase induzida por Imiquimode
- Avaliar o papel dos eosinófilos no desenvolvimento da psoríase experimental em camundongos deficientes em eosinófilos (Δ dbIGATA-1).
- Avaliar os efeitos do tratamento com Evasina-4 no desenvolvimento da lesão psoriasiforme induzida por IMQ em animais selvagens.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados camundongos fêmeas com idade entre 8 e 11 semanas da linhagem BALB/c obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais. Foram utilizados, ainda, camundongos deficientes em eosinófilos (Δ dbIGATA-1) (YU et al. 2002) doados pelo Dr. A. Humbles (Harvard, Boston, MA) para o Dr. Mauro Martins Teixeira (Imunofarmacologia ICB-UFMG) . Os camundongos foram mantidos no biotério pertencente ao Laboratório de Imunofarmacologia até o fim dos experimentos.

Todos os experimentos realizados com os animais estão dentro das normas do Comitê de Ética e Experimentação Animal da UFMG conforme protocolo nº. 424 /

2015.

3.2 Indução da psoríase experimental

A indução da psoríase foi realizada como descrito previamente na literatura (Van der Fits et al., 2009). Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal (i.p) com xilazina (4mg/kg; Dopaser®) e ketamina (60mg/kg; Vetanarcol®) diluídos em salina. Os animais tiveram o dorso depilado com maquina para corte de cabelos (Philips) de uso humano, e para remoção total dos pelos foi aplicado creme de depilação para peles delicadas (Veet). Essa depilação foi seguida de um intervalo de descanso de 3 dias, seguidos de 4 (1-4) dias consecutivos de indução da psoríase com uso tópico de Imiquimode –Ixium (FQM - Farmoquímica S/A), resultando em uma dose diária de 3,125 mg do composto ativo (VAN-DER-FITS, et al., 2009). Foram utilizados 6 animais por grupo. No quinto dia após o início da aplicação do composto, os animais foram eutanasiados e os tecidos coletados para as análises (Figura 1). Sendo padronizado a coleta dividindo o dorso em 4 quadrantes e cada quadrante destinado a um tipo de ensaio: superior esquerdo (ELISA), superior direito (MPO/EPO), inferior esquerdo (histologia) e inferior direito (PCR).

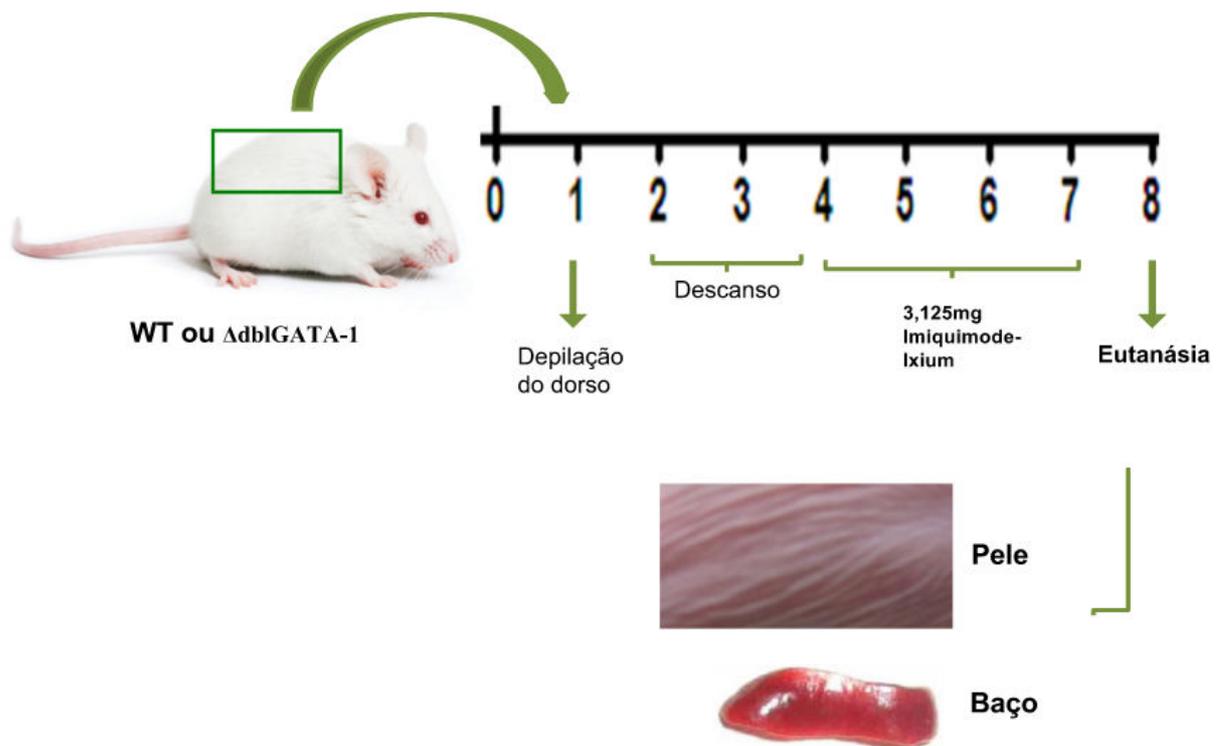


Figura 1: Protocolo de indução à psoríase. Previamente à indução da doença, os animais foram depilados no dorso (dia 1) e deixados sem manipulação por três dias (período de descanso). A partir do dia 4, foi realizada uma aplicação tópica de Imiquimode (Ixium) em toda a área depilada e de modo homogêneo durante 4 dias consecutivos. (dias 4-7), sendo uma aplicação ao dia. A eutanásia foi realizada no dia 8 para as análises.

3.3 Tratamento com Evasina-4

Animais BALB/c selvagem (WT) foram tratados com Evasina-4 diariamente (1 ou 3 μ g por animal com peso médio de 25g) em 100 μ L de PBS via subcutânea. Os animais receberam o tratamento 1 hora antes do uso do Imiquimode no primeiro dia e de 12 em 12 horas durante o tempo restante de indução da doença.

3.4 Escore clínico da doença

Os animais foram avaliados quanto ao nível de descamação e avermelhamento da pele e classificados segundo escala PASI - Índice de Gravidade da Psoríase por Área, adaptado apenas para os escores de descamação e eritema

onde:

0 = Ausente; 1 = Leve; 2 = Moderado; 3 = Grave e 4 = Muito grave

3.5 Atividade da mieloperoxidase (MPO)

Para avaliar o acúmulo de neutrófilos na pele, foi utilizado o método de quantificação da atividade de mieloperoxidase. Para a realização desse ensaio, um fragmento da pele do dorso dos camundongos foi pesado (100 mg), suspenso a 1 mL de Buffer 1 (NaCl 0,1 M {5,84 g/L}, Na₃PO₄ 0,02 M {3,12 g/L} e Na₂EDTA 0,015 M {5,58 g/L}) gelado e submetido à homogeneização seguida de centrifugação (4° C por 10 min a 10.000 rpm). O sobrenadante foi desprezado e o componente residual (pellet) ressuspendido em 1 mL de NaCl 0,2% gelado e 1 mL de NaCl 1,6% com glicose 5% gelada para cada 100 mg de tecido e homogeneizado. Foi realizada nova centrifugação a 4° C por 10 min a 10.000 rpm. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 1 mL de Buffer 2 (Na₃PO₄ 0,05 M {7,8 g/L} e HETAB 0,5% p/v {5g/L}) e homogeneizado por 30 segundos. As amostras foram congeladas e descongeladas seguidamente (3 vezes) em nitrogênio líquido, submetidas novamente à centrifugação a 4° C por 15 min a 10.000 rpm e os sobrenadantes coletados para ensaio de MPO. A atividade de mieloperoxidase (MPO) das amostras foi determinada através de leitor de ELISA (450 nm) usando tetrametilbenzidina (1,6 mM) e H₂O₂ (0,5 mM). Os resultados foram expressos de acordo com absorbância.

3.6 Atividade peroxidase eosinofílica (EPO)

Para avaliar o acúmulo de eosinófilos na pele, foi utilizado o método de quantificação da atividade de peroxidase eosinofílica. Para a realização desse ensaio, um fragmento da pele do dorso dos camundongos foi pesado (100mg), suspenso em 1 mL de Buffer 1 (NaCl 0,1 M {5,84 g/L}, Na₃PO₄ 0,02 M {3,12 g/L},

Na₂ EDTA 0,015 M {5,58 g/L}) gelado e submetido à homogeneização e centrifugação (4° C por 10 min a 10.000 rpm). O sobrenadante foi desprezado e o componente residual (pellet) ressuspendido em 1mL de NaCl 0,2 % gelado e 1 mL de NaCl 1,6 % com glicose 5 % gelada para cada 100mg de tecido. Foi realizada nova centrifugação a 4° C por 10 min a 10.000 rpm. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 1 mL de HTAB 0,5 % e homogeneizado por 30 segundos. As amostras foram congeladas e descongeladas seguidamente (3 vezes) em nitrogênio líquido, submetidas novamente à centrifugação a 4° C por 15 min a 10.000 rpm e os sobrenadantes coletados para ensaio de EPO. A atividade de peroxidase eosinofílica (EPO) das amostras foi determinada através de leitor de ELISA (492 nm) usando dicloridrato de o-fenilenodiamina (OPD) em tampão Tris-HCL (75 mM) acrescido de H₂O₂ (0,5 mM). Os resultados foram expressos de acordo com a absorbância.

3.7 Análise histológica

O tecido do dorso foi coletado e acondicionado em cassetes para histologia, permaneceram por 48 horas em solução de formol tamponado 10 %. O tecido foi desidratado com passagens subsequentes em etanol em diferentes concentrações (80 %, 90 %, absoluto 1 e 2 – 30 minutos cada), xilol (1 e 2 – 20 a 30 minutos cada) e incluído em parafina. Foram realizados cortes de 5 µm em micrótomo e confecção das lâminas. O corte foi corado com Hematoxilina de Harris (20 segundos) e Eosina (8 segundos). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico e foram observados os seguintes parâmetros: acantose, hiperqueratose, paraqueratose, pústulas espongiformes de Kogoj, microabscesso de Munro, hiperemia, infiltrado inflamatório na derme e pérola córnea (Tabela 1). Cada parâmetro foi avaliado e quantificado de 0 a 4, onde 0 = ausente; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = grave e 4 = muito grave. Podendo totalizar até 32.

Tabela 1: Definição dos parâmetros histopatológicos avaliados na pele	
Definição	Nomenclatura
Espessamento da camada espinhosa da epiderme	Acantose
Maior produção de queratina	Hiperqueratose
Maior presença de leucócitos na derme	Infiltrado inflamatório na derme
Retenção do núcleo na camada córnea da epiderme	Paraqueratose
Acúmulo de neutrófilos na camada espinhosa da epiderme	Pústulas espongiformes de Kogoj
Acúmulo de neutrófilos na camada mais externa da epiderme	Microabscesso de Munro
Aumento do volume sanguíneo com dilatação dos vasos	Hiperemia
São formações de queratina condensada entre agrupamentos de células	Pérola córnea

3.8 Imagem de perfusão por Laser Doppler

Os animais foram anestesiados previamente com quetamina/xilazina (xilazina e cetamina na proporção de 7,5: 10 (0,1 mL/ 100 g de peso do animal via i.p.) e posteriormente, a região de interesse foi escaneada por um laser (830 nm) nos tempos de 2, 4 dias de uso do IMQ. Os resultados foram obtidos a partir da avaliação das imagens obtidas pelo Laser Doppler (MoorLDPI-2, Inglaterra).

3.9 Avaliação da massa esplênica

Os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical após 4 dias

consecutivos de uso tópico com Imiquimode. Durante a necropsia, o baço dos animais foi retirado e pesado.

3.10 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como a média \pm erro da média por grupo de 6 animais. Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o teste t não paramétrico ou a análise de variância a um critério (ANOVA ONE-WAY), seguido de comparações múltiplas de Tukey. Os níveis de significância foram estabelecidos em $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Padronização do modelo experimental de psoríase induzida por IMQ

4.1.1 Avaliação dos parâmetros clínicos e morfológicos na pele psoriasiforme.

Para a padronização do modelo foram usados animais da linhagem BALB/c selvagens (WT) fêmeas e machos. Durante os experimentos os machos apresentaram variações comportamentais agressivas, com a ocorrência de brigas entre si, o que gerava extensas lesões no dorso e impossibilitando o uso desses animais nos experimentos posteriores. Por ser o local de indução da psoríase em nosso modelo, os experimentos se seguiram apenas com as fêmeas. Para verificação do melhor tempo de indução da psoríase, foi realizado um acompanhando dos sinais clínicos da lesão psoriasiforme (descamação e eritema) no dorso do primeiro ao sexto dia após o início da aplicação de Imiquimode. A partir do terceiro dia de aplicação do Imiquimode já é possível detectar esses sinais, que se estendem até o último dia avaliado (Figura 2A, B). A partir do quinto dia de aplicação do Imiquimode, não era possível observar uma piora do quadro clínico da lesão, ou seja, já foi atingido um platô. Apesar de não significativo, os valores começaram a reduzir em relação ao tempo anterior. Ainda, foram retiradas fotos ilustrativas desses momentos, que representam o grupo sem doença (Figura 2C, F) e com Imiquimode nos dias 3 (Figura 2D) e 5 (Figura 2E, G). Desta forma, estabelecemos para os próximos experimentos a aplicação de Imiquimode por 4 dias consecutivos e com as análises feitas no quinto dia do experimento.

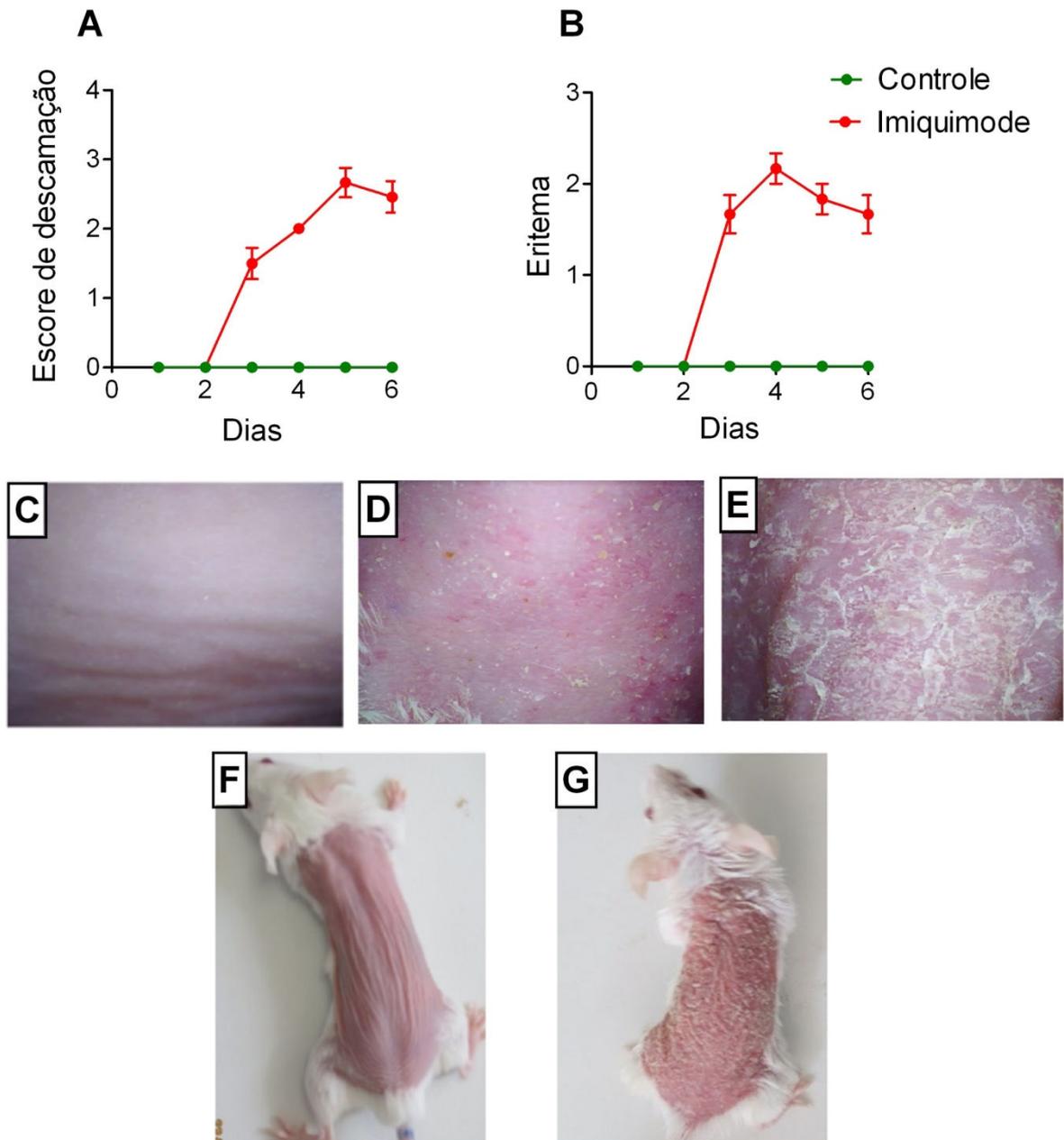


Figura 2: Avaliação dos parâmetros clínicos associados à lesão psoriasiforme em animais selvagens. Cinética do escore de descamação (A) e eritema (B) no dorso dos camundongos após a aplicação de IMQ (3,125 mg/dia) ou veículo. Foto ampliada do dorso de um animal do grupo controle (C) e do grupo tratado com IMQ, evidenciando áreas de eritema no dia 3 (E) e placas psoriásicas no dia 5 (E). Foto ilustrativa e comparativa do dorso de camundongos após o 4º dia de aplicação de IMQ (F) em relação ao grupo controle (G). Os resultados estão expressos com média dos valores obtidos \pm erro padrão da média. * para $p < 0.05$, $n = 6$. Resultado representativo de pelo menos 3 experimentos.

Os padrões histopatológicos da psoríase também foram avaliados em nosso

modelo. Após a aplicação do Imiquimode, é possível identificar um aumento da espessura da epiderme, paraqueratose, destruição da derme, aumento no infiltrado inflamatório na derme e epiderme, formado principalmente por neutrófilos, e hiperemia (Figura 3). Também foi possível observar o aparecimento de pérolas córneas na epiderme (Figura 3E) que são formações de queratina condensada entre agrupamentos de células. Não foi possível observar acúmulos de neutrófilos na camada espinhosa da epiderme, denominados microabscessos de Munro ou na camada córnea da epiderme, denominada pústula espongiiforme de Kogoj.

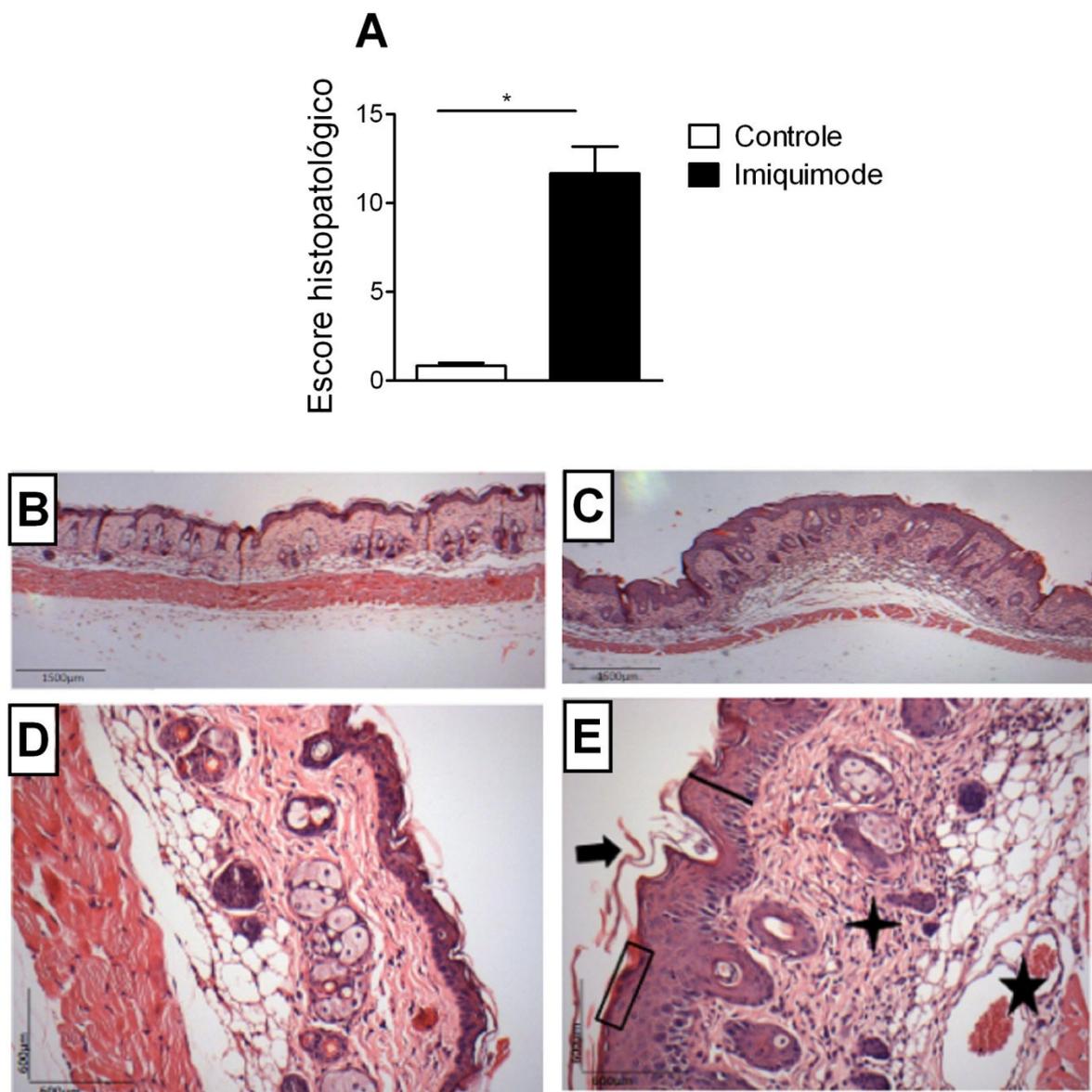


Figura 3: Avaliação dos parâmetros histológicos associados à lesão psoriasiforme em animais selvagens. Soma dos parâmetros histopatológicos do dorso dos animais avaliados no quinto dia após a aplicação de IMQ (4 dias de IMQ, 3,125 mg/dia) ou veículo. Foto representativa do grupo controle aumento de 5x (A) e aumento de 20x (C) , grupo IMQ aumento de 5x (B) e aumento de 20x (D). Acantose (traço), descamação (seta grossa), infiltrado inflamatório (estrela de 4 pontas), hiperemia (estrela de 5 pontas) e paraqueratose (área em destaque). Os resultados estão expressos com média dos valores obtidos \pm erro padrão da média. * para $p < 0.05$, $n = 6$. Resultado representativo de 2 experimento. Cortes em HE.

4.1.2 Avaliação dos parâmetros inflamatórios nas lesões psoriasiformes

Através da técnica de Doppler, que permite avaliar o fluxo sanguíneo, foi possível identificar um aumento do desse fluxo no dorso dos animais com lesão psoriasiforme após a aplicação do Imiquimode quando comparados aos animais controle. Os resultados do doppler podem indicar hiperemia ou angiogênese. Como o tempo de indução do modelo é relativamente agudo e, ainda, como foi possível identificar importante vasodilatação nos cortes histológicos, acreditamos que esses resultados obtidos com a técnica do Doppler sugerem se tratar de um fenômeno de vasodilatação.

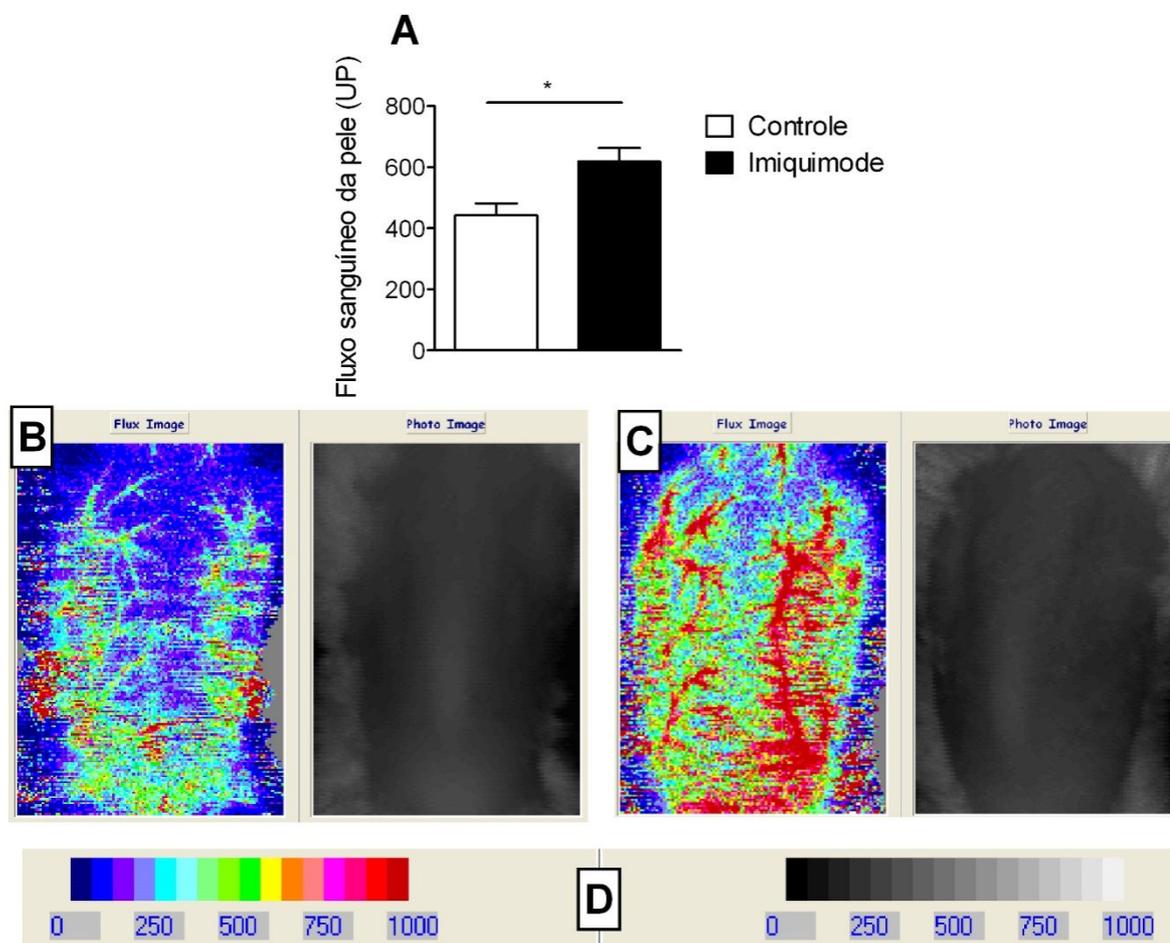


Figura 4: Avaliação da circulação sanguínea nas lesões psoríase induzidas por Imiquimode. Avaliação do fluxo sanguíneo no dorso dos animais após 4 dias de IMQ (3,125 mg/dia) (A). Imagens representativas obtidas pela técnica de Doppler e foto do dorso indicando local analisado. Em (B) grupo controle e (C) grupo Imiquimode. A escala de cores (D) codificam o fluxo sanguíneo nas imagens de perfusão por laser Doppler: quanto maior a intensidade em vermelho, maior é o fluxo e quanto maior a intensidade em azul, menor é o fluxo. Os resultados estão expressos com média dos valores obtidos \pm erro padrão da média. * para $p < 0.05$, $n = 6$. Resultado representativo de 3 experimentos.

Para avaliar o infiltrado inflamatório nas lesões psoríase, foram dosadas as atividades das enzimas peroxidase eosinofílica (Figura 5A), que indica a presença

de eosinófilos e mieloperoxidase (Figura 5B), uma forma indireta para avaliar o influxo de neutrófilos no tecido. A presença de neutrófilos nos tecidos é um importante parâmetro inflamatório na psoríase (LANGLEY, et al 1977). Foi observado maior absorvância tanto para EPO como para MPO, indicando um aumento de eosinófilos e neutrófilos no tecido.

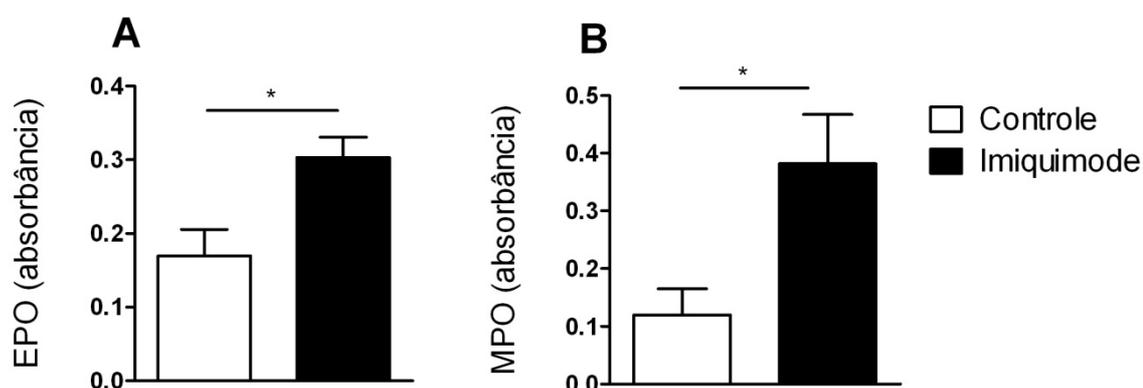


Figura 5: Avaliação do influxo de eosinófilos e neutrófilos nas lesões psoriasiformes.

No quinto dia após a aplicação de Imiquimode (3,125 mg/dia por 4 dias consecutivos) ou veículo, os animais foram eutanasiados e um fragmento da pele foi retirado para a realização dos ensaios enzimáticos de peroxidase eosinofílica (A) e mieloperoxidase (B). Os resultados estão expressos com média dos valores obtidos \pm erro padrão da média. * para $p < 0.05$, $n = 6$. Resultado representativo de pelo menos 3 experimentos.

4.1.3 Avaliação dos efeitos sistêmicos da psoríase experimental

Como forma de avaliar se o uso tópico do Imiquimode causava alterações sistêmicas, avaliamos o peso do baço dos animais, conforme já descrito anteriormente (Van der Fits et al., 2009). Aqui, os animais que receberam Imiquimode apresentaram um aumento significativo da massa do baço quando comparados ao grupo controle (Figura 6).

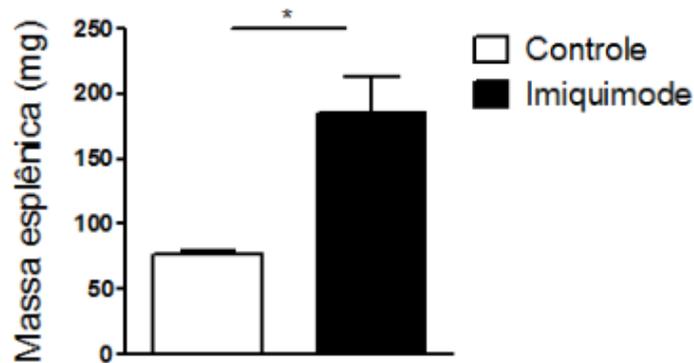


Figura 6: Avaliação da massa do baço induzida pelo uso tópico de Imiquimode No quinto dia após a aplicação de Imiquimode (3,125 mg/dia por 4 dias consecutivos) ou veículo, os animais foram eutanasiados e o baço removido para a pesagem. Os resultados estão expressos com média dos valores obtidos \pm erro padrão da média. * para $p < 0.05$, $n=6$. Resultado representativo de pelo menos 3 experimentos.

4.2 Eosinófilos têm um papel importante na lesão psoriasiforme induzida por IMQ

Após a padronização do modelo, fomos investigar o papel dos eosinófilos na lesão psoriasiforme induzida por Imiquimode em camundongos. Para isso, foram utilizadas duas estratégias: uso de animais que não apresentam diferenciação das células progenitoras em eosinófilos ($\Delta dbiGATA-1$) e um tratamento com uma molécula ligante da quimiocina CCL11, a Evasina-4. Primeiramente, apresentaremos os resultados com animais $\Delta dbiGATA-1$ e a comparação com animais WT.

4.2.1 Avaliação dos parâmetros clínicos e morfológicos em animais $\Delta dbiGATA-1$

Os animais $\Delta dbiGATA-1$ se mostraram suscetíveis ao creme Imiquimode e desenvolveram as lesões psoriásicas, porém com diferenças no estabelecimento da doença em relação aos animais selvagens. Os animais $\Delta dbiGATA-1$ apresentaram a doença de forma mais branda (Figura 7), como pode ser observado no menor score

clínico de descamação (Figura 7A) e menor eritema (Figura 7B) quando comparados ao grupo de animais WT. As fotos retiradas dos dorsos desses animais representam esses achados (Figura 7C e D).

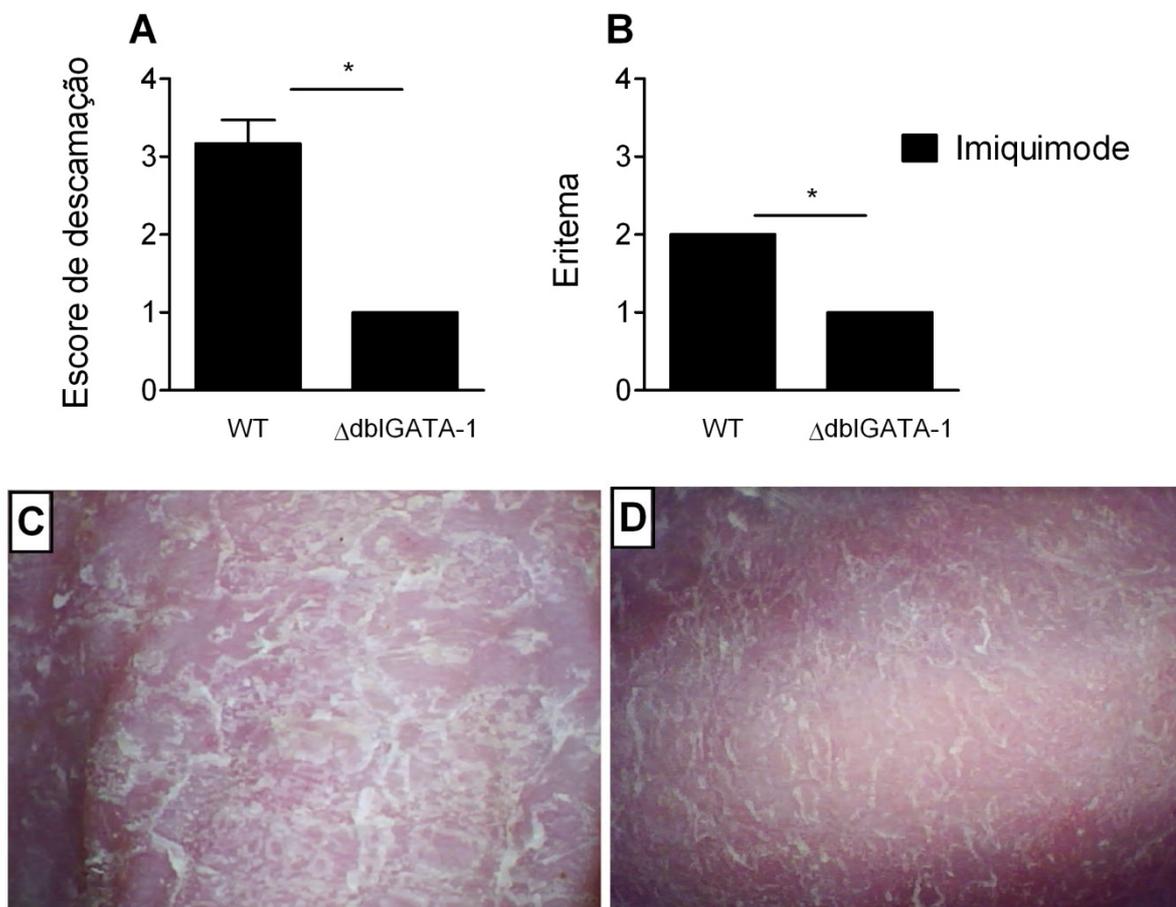


Figura 7: Avaliação dos parâmetros clínicos nas lesões psoriasiforme em animais Δ dbiGATA-1 e selvagens. No quinto dia após a aplicação de Imiquimode (3,125 mg/dia por 4 dias consecutivos) ou veículo foi realizada a análise dos escores clínicos de descamação (A) e eritema (B). Imagens representativas do dorso dos animais dos grupos WT (C) e Δ dbiGATA-1(D), evidenciando as placas psoriásicas.. Os resultados estão expressos com média dos valores obtidos \pm erro padrão da média. * para $p < 0.05$, $n=6$. Resultado representativo de pelo menos 3 experimentos.

Ainda, os animais Δ dbiGATA-1 apresentaram menor escore histopatológico quando comparados aos animais WT (Figura 8). Os animais Δ dbiGATA-1 apresentaram menor espessamento da epiderme, pouca ou nenhuma destruição na derme e menor infiltrado inflamatório. O aparecimento de pérola corna se

manteve similar aos animais WT e não foi possível observar microabscessos de Munro e pústula espongiforme de Kogoj tanto no grupo WT como Δ dblGATA-1 que receberam Imiquimode.

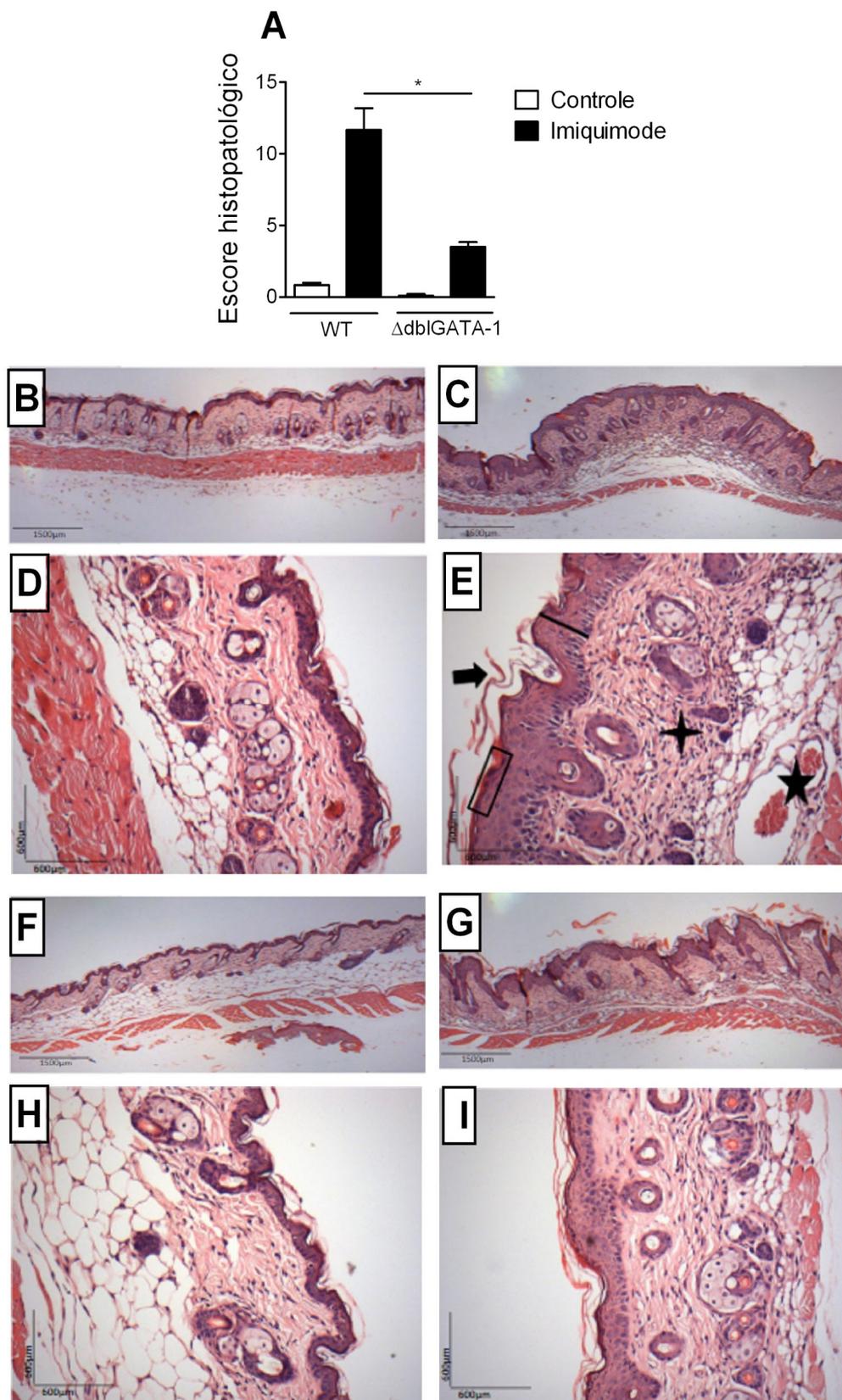


Figura 8: Análise histopatológica das lesões psoriasiforme em animais Δ dbIGATA-1 e selvagens. No quinto dia após a aplicação de Imiquimode (3,125 mg/dia por 4 dias consecutivos) ou veículo os animais foram eutanasiados e um fragmento de pele foi dissecado para as análises histopatológicas. Soma dos parâmetros histopatológicos (A). Grupo WT controle, aumento de 5x (B) e aumento de 20x em (D). Grupo WT IMQ, aumento de 5 x (C) e aumento de 20x em (E). Grupo Δ dbIGATA-1 controle aumento de 5x (F) e aumento de 20X (H). Grupo Δ dbIGATA-1 IMQ aumento de 5x (G) e aumento de 20x (I). Acanthose (traço), descamação (seta grossa), infiltrado inflamatório (estrela de 4 pontas), hiperemia (estrela de 5 pontas) e paraqueratose (área em destaque). Cortes em HE. Os resultados estão expressos com média dos valores obtidos \pm erro padrão da média. * para $p < 0.05$, $n = 6$. Resultado de

um experimento.

4.2.2 Avaliação de parâmetros inflamatórios em animais

A aplicação de Imiquimode induziu um aumento significativo do fluxo sanguíneo nos animais WT e Δ dbiGATA-1 (Figura 9) quando comparados aos seus grupos controle, porém não foi observada diferença entre os grupos WT e Δ dbiGATA-1 tratados com Imiquimode.

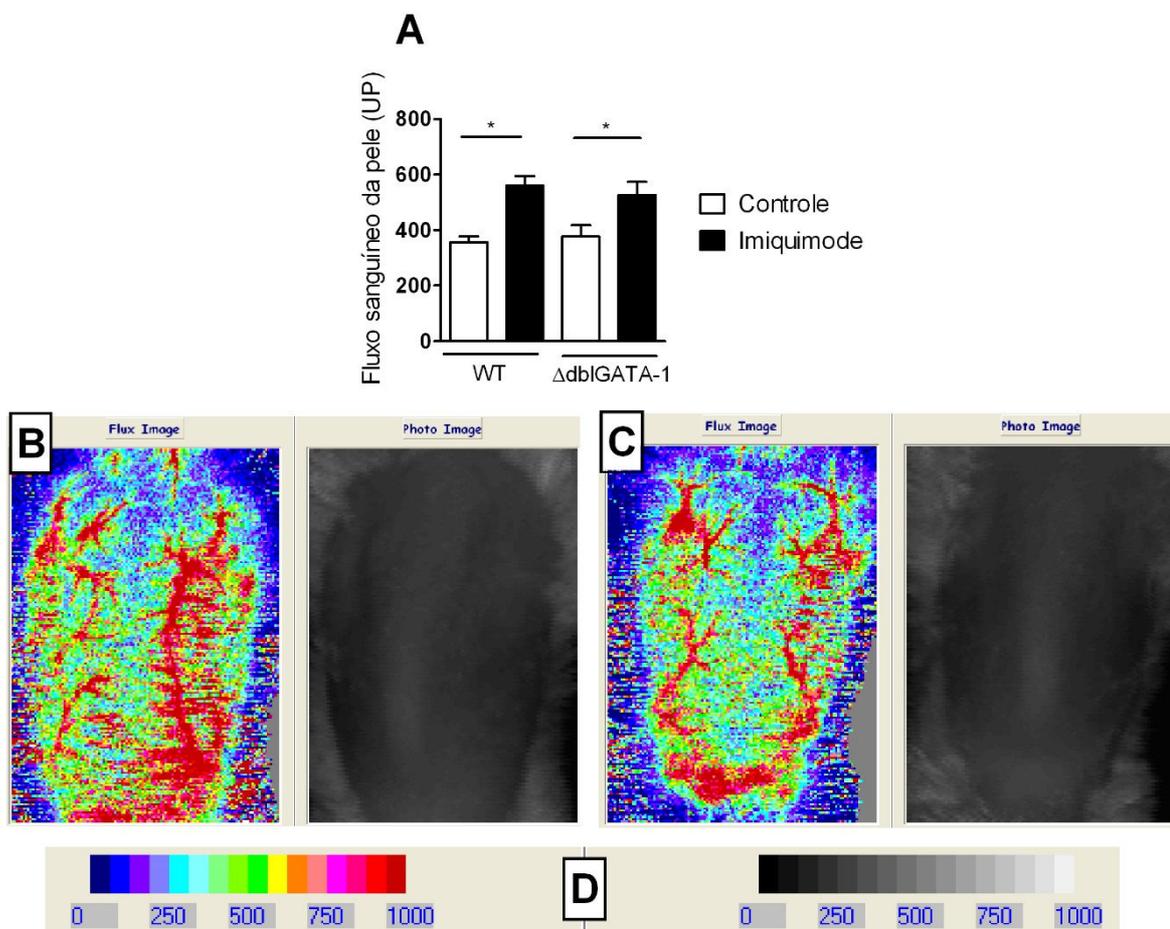


Figura 9: Análise do fluxo sanguíneo nas lesões psoriasiformes em animais Δ dbiGATA-1

1 Avaliação do fluxo sanguíneo no dorso dos animais após 4 dias de IMQ (3,125 mg/dia) (A). Imagens representativas da técnica de Doppler e fotos das áreas analisadas, WT controle (B), WT IMQ (C), Δ dbiGATA-1 controle (D), Δ dbiGATA-1 IMQ (E) e em (F) escala de cores que codificam o fluxo sanguíneo nas imagens de perfusão por laser Doppler, quanto mais intenso for a coloração vermelha, maior é o fluxo e quanto mais intenso for a coloração azul, menor é o fluxo. Os resultados estão expressos com média dos valores obtidos \pm erro padrão da média. * para $p < 0.05$, $n = 6$. Resultado representativo de 2 experimentos.

Como forma complementar de avaliação da inflamação tecidual, foi realizado o ensaio de atividade da enzima mieloperoxidase de pele, uma forma indireta para avaliar o infiltrado neutrofilico. A administração de Imiquimode induziu um aumento de atividade de MPO nos animais selvagens em relação ao grupo controle. Porém, os animais Δ dblGATA-1 tiveram uma menor atividade de MPO quando comparados aos animais WT após a aplicação de Imiquimode (Figura 10).

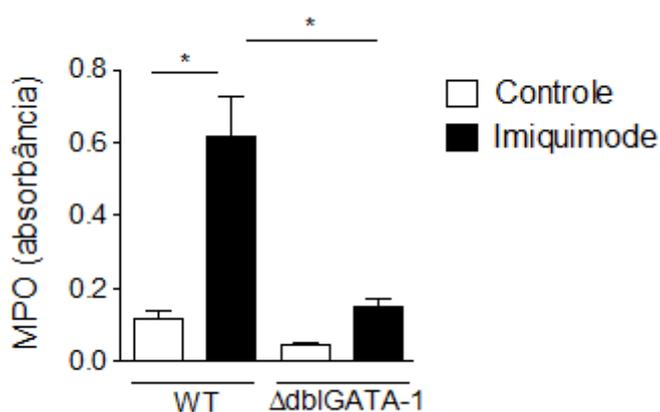


Figura 10: Atividade de mieloperoxidase nas lesões psoriasiformes em animais Δ dblGATA-1. Atividade de mieloperoxidase por absorbância. Avaliação do dorso dos animais após 4 dias de IMQ (3.125 mg/dia) ou veículo. Os resultados estão expressos com média dos valores obtidos \pm erro padrão da média. * para $p < 0.05$, $n = 10-12$. Resultado representativo de pelo menos 3 experimentos.

4.2.3 Efeitos sistêmicos da psoríase experimental

Foi observado aumento na massa do baço dos animais WT e Δ dblGATA-1 nos grupos que receberam Imiquimode quando comparado a seus respectivos controles. Porém, entre os grupos tratados com Imiquimode, os animais Δ dblGATA-1 apresentaram massa levemente reduzida, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa quando comparado ao grupo WT (Figura 11).

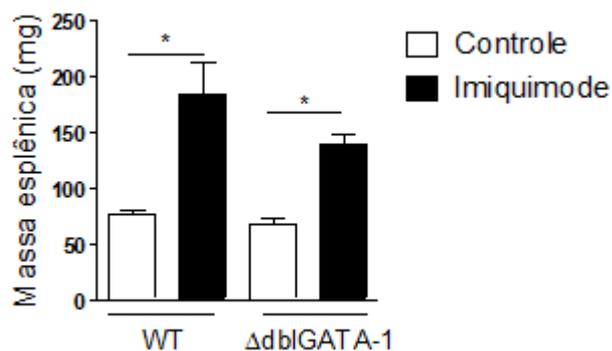


Figura 11: Avaliação da massa do baço induzida pelo uso tópico de Imiquimode. No quinto dia após a aplicação de Imiquimode (3,125 mg/dia por 4 dias consecutivos) ou veículo, os animais foram eutanasiados e o baço removido para a pesagem. Os resultados estão expressos com média dos valores obtidos \pm erro padrão da média. * para $p < 0.05$, $n = 8-9$. Resultado representativo de pelo menos 3 experimentos.

4.3 Evasina-4 como estratégia terapêutica para o tratamento das lesões psoriasiformes

Um segundo método para avaliar o papel dos eosinófilos no desenvolvimento da lesão psoriasiforme induzida por Imiquimode foi reduzir sua migração para o tecido através do tratamento dos animais com Evasina-4. A doença se desenvolveu tanto nos animais tratados como não tratados, porém de forma mais branda nos animais tratados com Evasina-4.

4.3.1 Avaliação dos parâmetros clínicos e morfológicos

O tratamento com Evasina-4 se mostrou eficiente na redução dos parâmetros clínicos da psoríase. Foram testadas as doses de 1 e 3 μg por animal. Em ambas as doses, a doença se estabeleceu de forma mais branda, sendo que a dose de 3 $\mu\text{g}/\text{animal}$ se mostrou mais eficiente na redução da descamação (Figura 12A). Em relação à análise do eritema, em ambas as doses o parâmetro foi reduzido, porém não de forma significativa quando comparado ao grupo com lesão psoriasiforme e

tratado veículo (Figura 12B).

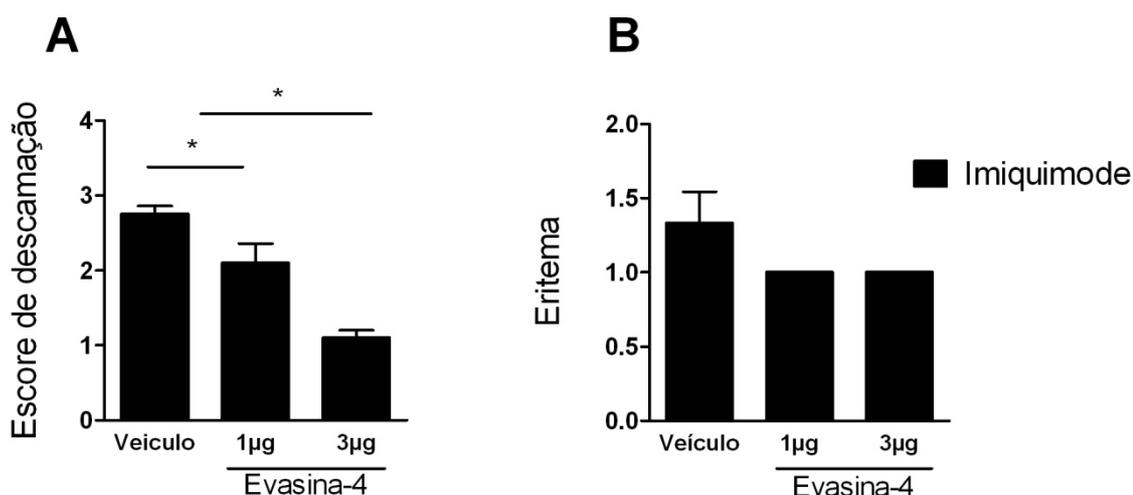


Figura 12: Avaliação de parâmetros clínicos da psoríase em animais tratados com Evasina-4. No quinto dia após a aplicação de Imiquimode (3,125 mg/dia por 4 dias consecutivos) foi realizada a análise dos escores clínicos de descamação (A) e eritema (B) em animais tratados ou não com Evasina-4 (1 ou 3 µg/animal diluído em 100 µL de PBS; via subcutânea; 12 em 12 horas durante 4 dias). Os resultados estão expressos com média dos valores obtidos ± erro padrão da média. * para $p < 0.05$, $n = 5-6$. Gráfico referente a um experimento, exceto na dose de 3µg onde o resultado é representativo de 3 experimentos.

Além do escore clínico, os animais tratados com Evasina-4 apresentaram menor escore histopatológico quando comparados aos animais WT na lesão psoriasiforme induzida por Imiquimode (Figura 19). Esses animais apresentaram menor espessamento da epiderme, menor destruição na derme e menor infiltrado inflamatório, o aparecimento de pérola corna se manteve similar aos animais WT (Figura 13). Não foi possível observar microabscessos de Munro e pústula espongiiforme de Kogoj em nenhum dos grupos. Foi observada diferença em ambas as doses quando comparadas aos grupos controle, porém não foi observada diferença entre as diferentes doses.

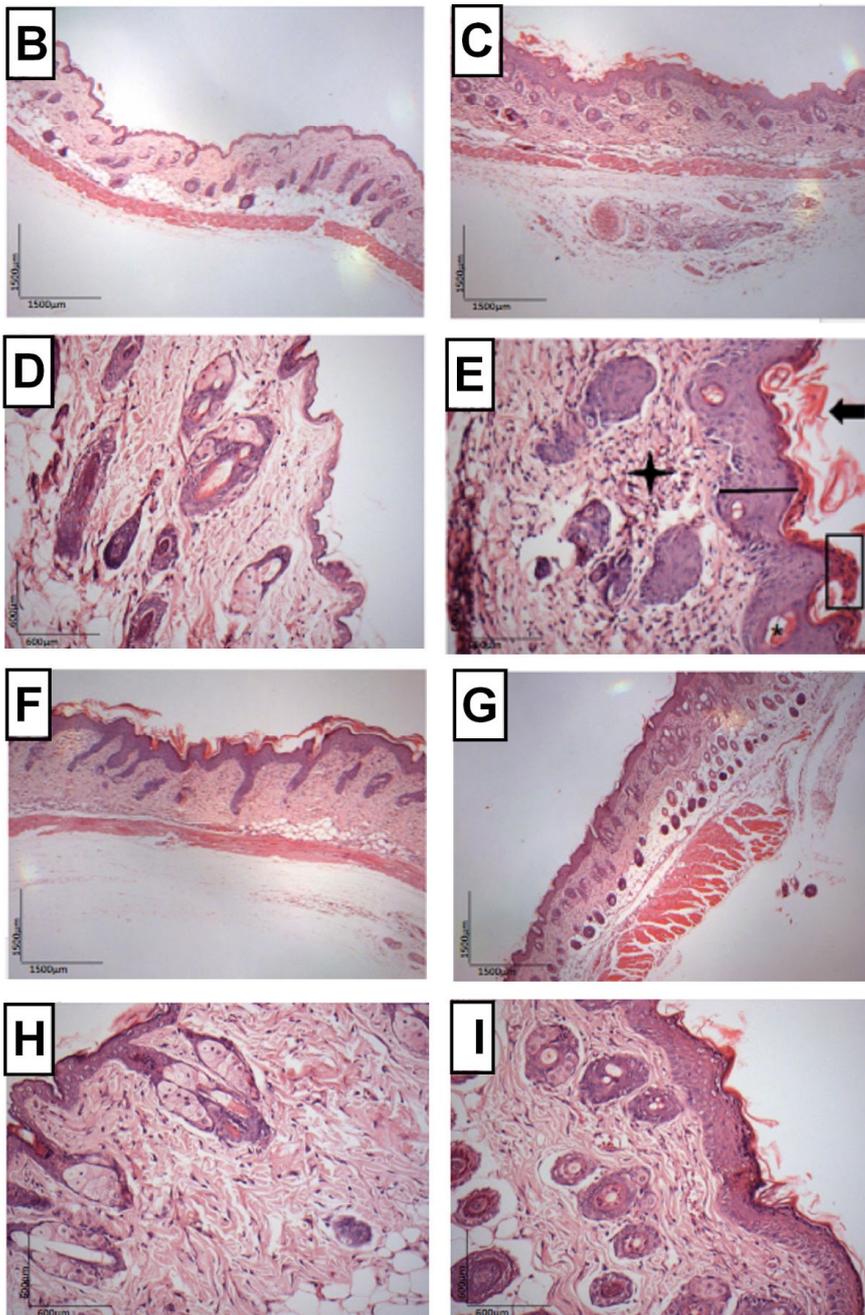
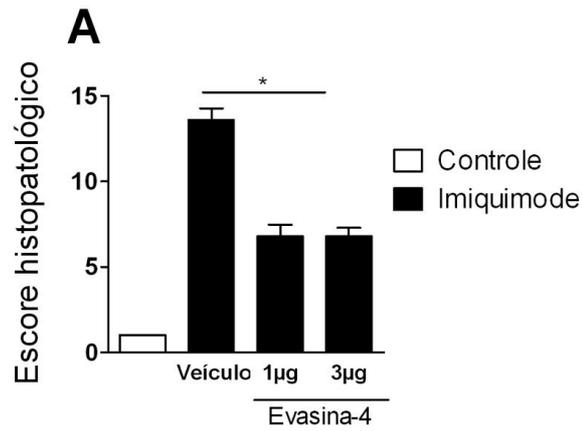


Figura 13: Avaliação histopatológica das lesões psoriasiformes em animais tratados com Evasina-4. No quinto dia após a aplicação de Imiquimode (3,125 mg/dia por 4 dias consecutivos) ou veículo os animais foram eutanasiados e um fragmento de pele foi dissecado para as análises histopatológicas. Grupos diferentes de animais foram tratados ou não com Evasina-4 (1 ou 3 µg/animal diluído em 100 µL de PBS; via subcutânea; 12 em 12 horas durante 4 dias). Soma do escore histopatológico (A). Grupo controle em aumento de 5x (B) e aumento de 20x (C). Grupo veículo em aumento de 5X (D) e aumento de 20x (E). Grupo Evasina-4 1µg em aumento de 5X (F) e aumento de 20X (G). Grupo Evasina-4 3µg em aumento de 5x (H) e aumento de 20x (I). Acanthose (traço), descamação (seta grossa), infiltrado inflamatório (estrela de 4 pontas), pérola córnea (asterisco) e paraqueratose (área em destaque). Avaliação do dorso dos animais após 4 dias de IMQ (3.125 mg/dia) ou IMQ mais Evasina-4. Os resultados estão expressos com média dos valores obtidos ± erro

padrão da média. * para $p < 0.05$, $n = 6$. Resultado representativo de um experimento. Cortes em HE.

5. DISCUSSÃO

A psoríase é uma doença comum da pele que está associada a um dano físico e psicológico. Assim como em outras dermatoses, a desfiguração visível pode desencadear reações negativas em terceiros, o que pode levar a um aumento da carga psicológica da doença. Em comparação a outras doenças crônicas, incluindo câncer, infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca congestiva, apenas a depressão e a doença pulmonar crônica prejudicaram a qualidade de vida psicológica mais do que a psoríase (BOEHNCKE; SCHON; 2015).

Uma característica marcante na psoríase é o infiltrado inflamatório que é composto principalmente por neutrófilos (LANGLEY, et al 1977). Achados na literatura descrevem também a presença dos eosinófilos como componente desse infiltrado uma vez que já foi demonstrado sua presença e degranulação na lesão psoriasiforme (LUNDIN, 1989; MANSUR, GÖKTAY; YAŞAR, 2008).

Embora existam relatos da presença dos eosinófilos na lesão psoriasiforme (LUNDIN, 1989; MANSUR, GÖKTAY; YAŞAR, 2008), o aprofundamento no conhecimento a cerca desses achados ainda se mostra necessário. Com isso estruturamos o objetivo central deste estudo: investigar a participação dos eosinófilos no desenvolvimento da psoríase. Afim de embasar nossa hipótese, simultaneamente a padronização do modelo analisamos a atividade de peroxidase eosinofílica, enzima presente nos grânulos eosinofílicos (BOEHNCKE; SCHON, 2015), no tecido. Foi possível observar em nossa padronização características marcantes da psoríase, como descamação e eritema, além de alterações histopatológicas clássicas, como acantose, hiperqueratose, paraqueratose e infiltrado inflamatório (BOEHNCKE; SCHON, 2015; LOWES; FARINAS; KRUEGER, 2014). A atividade de EPO se mostrou significativamente aumentada na pele psoriasiforme. Assim, a padronização do modelo e a detecção de eosinófilos nos

tecidos lesionados nos deram suporte para prosseguir os experimentos com o modelo de psoríase induzida por Imiquimode e fazer os estudos investigativos sobre o papel dos eosinófilos na lesão psoriasiforme.

Os eosinófilos são leucócitos multifuncionais envolvidos na iniciação e propagação de diversas respostas inflamatórias, bem como moduladores da imunidade inata e adaptativa (HOGAN et al., 2008). Em uma ampla gama de patologias da pele é possível observar infiltrado e ou degranulação de eosinófilos, dentre essas manifestações estão as alergias, urticária, dermatite de contato alérgica, dermatite atópica, eczema, prurigos, dermatite herpetiforme e penfigóide bolhoso (LONG et al., 2015).

Dentre a composição natural da pele se encontram as células da família das ILCs. Essas células podem ter um papel relevante no desenvolvimento das lesões psoriásicas, visto que são uma das fontes das citocinas IL-17 e IL-22, como demonstrado em modelo experimental de psoríase (PANTELYUSHIN, et al 2012) Particularmente, foi observado um aumento no número de ILCs do grupo 3 nas lesões da psoríase (DYRING- ANDERSEN et al., 2014). As ILCs do grupo 2, também presentes na pele, estão aumentadas na dermatite atópica e são responsáveis pela produção de IL-4, IL-5 e IL-13 (SALIMI; OGG, 2014), citocinas de grande importância na migração e ativação dos eosinófilos (ZIMMERMANN et al 2003). Desta forma as ILC2 podem não só estar envolvidas no desenvolvimento da psoríase através da produção de IL-17 e IL-22, como também ter uma possível participação na migração e ativação dos eosinófilos para as lesões psoriasiformes.

Estudos recentes identificaram relações estreitas entre a patofisiologia da psoríase e depressão, onde as citocinas IL17 e TNF são compartilhadas pelas duas patologias (PATEL et al., 2017). A psoríase está associada ao aumento no desenvolvimento de outras doenças crônicas, bem como comorbidades graves,

como síndrome metabólica e doença cardiovascular, provavelmente refletindo um componente inflamatório sistêmico da doença. Dentre as doenças comórbidas, incluem artrite psoriásica, ansiedade e depressão, doença hepática gordurosa não alcoólica, doença de Crohn e linfoma (BOEHNCKE; SCHON; 2015. HYE- LIN HA et al, 2014). Uma das comorbidades relacionadas a psoríase e que acarreta grande dano aos pacientes é a depressão. A psoríase é uma patologia desfigurante, onde as lesões podem atingir grandes partes do corpo e se tornarem crônicas, o aspecto das placas muitas vezes leva os pacientes a terem dificuldades emocionais e sociais. Os pacientes com psoríase tem 1,5 a mais de probabilidade de desenvolver quadros de depressão (KORMAN et al., 2016). Em conjunto, a produção de diferentes moléculas pró-inflamatórias na psoríase contribuiria para os quadros de lesão tecidual e depressivo nos pacientes. Embora nossos resultados para as dosagens de IL17 e TNF, tanto por qPCR quanto por ELISA, foram inconclusivas e necessitam ser repetidos, acreditamos que a participação ausente ou reduzida de eosinófilos nesse contexto também acarretaria em redução de IL-17, TNF ou outras citocinas, justificando a melhora de aspectos gerais dessa doença.

Os neutrófilos são as células mais abundantes nas lesões psoriásicas e as maiores produtoras de IL-17 nessas lesões (LANGLEY, et al 1977). Aqui, realizamos o ensaio de atividade da mieloperoxidase, uma forma indireta para quantificar o infiltrado neutrofílico, embora outros tipos celulares também possuem essa enzima, como monócitos e macrófagos. Vimos que em animais Δ dbIGATA-1 tratados com IMQ, a atividade dessa enzima se mostrou significativamente reduzida quando comparados aos animais selvagens. Além disso em análises histológicas foi possível verificar uma redução do infiltrado neutrofílico tanto em animais Δ dbIGATA-1 como em animais selvagens tratados com Evasina-4. Nossos resultados apontam que a ausência de eosinófilos na psoríase induzida por Imiquimode é capaz de reduzir o

infiltrado neutrofílico, desta forma os eosinófilos podem ter grande relevância no quadro de associação psoríase/depressão, uma vez que a produção de IL-17 pode estar reduzida assim como visto com os neutrófilos. Além disso na liberação dos grânulos eosinofílicos estão presentes citocinas como IL-2, IL-6, TNF que são citocinas já correlacionadas a depressão (KORMAN et al., 2016), tornando os eosinófilos um possível agravador da depressão no quadro de associação da psoríase/depressão.

Outra patologia relacionada a psoríase é a asma, onde os pacientes psoriásicos apresentam maior prevalência de asma quando comparados aos índices de pacientes não asmáticos (LØNNBERG et al., 2015). A asma é uma doença crônica do sistema respiratório que apresenta quadros de recorrência assim como na psoríase. Um componente celular da asma e diretamente relacionado ao agravamento da doença são os eosinófilos, que estão aumentados no lavado broncoalveolar e sangue de pacientes asmáticos (CASCIANO et al., 2016. POSSA et al., 2013). Estudos em pacientes com psoríase também mostraram um aumento dos eosinófilos no sangue como nas áreas de lesões da pele (MANSUR; GÖKTAY; YAŞAR, 2008). Desta forma os eosinófilos podem ser um dos componentes comuns entre as duas comorbidades que pode favorecer na incidência conjunta dessas patologias.

Eosinófilos ativados podem liberar mediadores lipídicos (LT: leucotrienos; PG: prostaglandinas) que estão envolvidos na vasodilatação (WELLER et al 1994) e VEGF (factor de crescimento endothelial Vascular) (HORIUCHI et al, 1997), b-FGF (Fator de crescimento fibroblástico básico) (HOSHINO et al., 2001), TNF (WONG et al., 1990), GM-CSF (KITA et al., 1991), NGF (Fator de crescimento nervoso) (SOLOMON et al., 1998), IL-8 (YOUSEFI et al., 1995) e CCL11 (NAKAJMA et al., 1998) que são mediadores pró-angiogênicos. Entre estes mediadores pró-

angiogêncos, o VEGF é o mais importante e selectivo, causando proliferação e migração de células endoteliais (PUXEDDU et al., 2005). A dilatação dos vasos sanguíneo e angiogênese dérmica também são característica marcantes nas lesões da psoríase (BOEHNCKE; SCHON; 2015). Avaliamos através da técnica de doppler o fluxo sanguíneo no dorso dos animais e o grupo de animais selvagens e Δ dblGATA-1 tratados com IMQ apresentaram maior fluxo sanguíneo quando comparados aos seus respectivos grupos controle, porém não ocorreu diferença significativa entre os animais selvagens e Δ dblGATA-1 tratados com IMQ. Apenas os dados do doppler não nos possibilita avaliar se o aumento visto no fluxo ocorre por angiogênese ou hiperemia, mas a análise conjunta do doppler e histologia indicam que o aumento visto no fluxo se dá pela dilatação dos vasos uma vez que ela é mais significativa que a angiogênese. Então, os eosinófilos não parecem ser os principais responsáveis pelas alterações vasculares que ocorrem nesse modelo de inflamação.

É crescente o conhecimento acerca da participação dos eosinófilos na exacerbação de prurido em muitas afecções da pele. A proeminência de eosinófilos na pele infectada com o ectoparasita, *Sarcoptes scabiei*, é um exemplo de relação entre eosinófilos e prurido. Observações mostraram que as proteínas dos grânulos de eosinófilos, mesmo na ausência de eosinófilos intactos, foram extensivamente depositadas em pacientes com afecções cutâneas edematosas e pruriginosas, como urticária, dermatite atópica e prurigo nodular (LEIFERMAN, 2015). Assim como nas afecções citadas, o quadro de prurido é bem marcante nas lesões da psoríase (GREB et al., 2016). Houve uma tentativa inicial de se avaliar o comportamento de coceira nos animais após a aplicação tópica de Imiquimode. As primeiras análises sugerem que os animais Δ dblGATA-1 ou o tratamento com Evasina-4 tendiam a ter esse comportamento reduzido, porém nossos resultados foram inconclusivos e a técnica para avaliação do prurido deve ser aprimorada. Mas os eosinófilos poderiam

estar associado exacerbação no quadro de prurido nas lesões da psoríase.

Além dos padrões morfológicos e clínicos da psoríase, também é interessante demonstrar se a ausência dos eosinófilos são capazes de reduzir importantes marcadores inflamatórios, como a produção de IL-23, IL-17, IL-22, IL-36, TNF, e IFN, que são importantes no desenvolvimento da psoríase. Em nosso modelo avaliamos não só a produção dessas citocinas como também a produção de CCL11 e CXCL1, porém nossos resultado não foram conclusivos e requerem mais repetições. Ainda sim, os resultados aqui apresentados corroboram com os achados LUNDIN (1989) e MANSUR (2008) demonstrando que os eosinófilos estão presentes nas lesões psoriasiforme e acrescenta um novo dado, em que essas células são importantes no desenvolvimento das lesões psoriasiformes.

6. CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível evidenciar que ocorre a participação dos eosinófilos no desenvolvimento da psoríase e de forma interessante a ausência ou bloqueio da migração dessa célula foi capaz de reduzir os parâmetros inflamatórios e danos de tecidos vistos nas lesões da psoríase. Apesar de ainda não ter sido testado em humanos, é interessante pensar nos eosinófilos e suas moléculas liberadas como potenciais alvos terapêuticos para redução das recorrências das lesões psoriásicas da pele.

REFERÊNCIAS

ALESSANDRI, A. L. O. F. et al. Avaliação da atividade farmacológica de uma família de proteínas ligantes de quimiocinas derivada da saliva de carrapato. *Universidade Federal de Minas Gerais*, Belo Horizonte, 2007.

BEUTNER, K. Human papillomavirus and human disease. *Am. J. Med.* 102: 9 –15. 1997

BLANCHARD C, Rothenberg ME (2009) Biology of the eosinophil. *AdvImmunol* 101:81–121

BOEHNCKE, Wolf-henning; SCHÖN, Michael P. Psoriasis. *The Lancet*, [s.l.], v. 386, n. 9997, p.983-994, set. 2015. Elsevier BV.

BONIFACE, K. et al. A role for T cell-derived interleukin 22 in psoriatic skin inflammation. *ClinExpImmunol*2007;150(3):407–415. [PubMed: 17900301]

BYSTROM J, AMIN K, BISHOP-BAILEY D. Analysing the eosinophil cationic protein a clue to the function of the eosinophil granulocyte. *Respir Res* 12:10. 2011

CASCIANO, Julian et al. Burden of asthma with elevated blood eosinophil levels. *Bmc Pulmonary Medicine*, [s.l.], v. 16, n. 1, p.1-2, 13 jul. 2016. Springer Nature

COLLINS et al. Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. *J. Exp. Med.* Volume 182 October 1995. 1169-1174

CARRIER, Y. et al. Inter-regulation of Th17 cytokines and the IL-36 cytokines in vitro and in vivo: implications in psoriasis pathogenesis. *J. Invest. Dermatol.* 131, 2428–2437. 2011

DYRING-ANDERSEN, B. et al. Increased number and frequency of group 3 innate lymphoid cells in nonlesional psoriatic skin. *British Journal Of Dermatology*, [s.l.], v. 170, n. 3, p.609- 616, mar. 2014.

GABAY, Cem; TOWNE, Jennifer E. Regulation and function of interleukin-36 cytokines in homeostasis and pathological conditions. *Journal of Leukocyte Biology*, V 97 2015

GREB, Jacqueline E. et al. Psoriasis. *Nature Reviews Disease Primers*, [s.l.], v. 2, p.16082-16084, 24 nov. 2016. Springer Nature.

FERRER, M. Immunological events in chronic spontaneous urticaria. *Clinical And Translational Allergy*, [s.l.], v. 5, n. 1, p.5-30, 25 ago. 2015. Springer Nature.

FRY L, BAKER BS. Triggering psoriasis: the role of infections and medications. *ClinDermatol* 2007; 25: 606–15.

FISHER, Gary J. et al. Collagen Fragmentation Promotes Oxidative Stress and Elevates Matrix Metalloproteinase-1 in Fibroblasts in Aged Human Skin. *The American Journal Of Pathology*, [s.l.], v. 174, n. 1, p.101-114, jan. 2009. Elsevier BV.

GIEMBYCYZ MA, et al. Pharmacology of the eosinophil. *Pharmacol Rev* 51(2):213–339 1999

HAVRAN, W. L.; JAMESON, J. M.. Epidermal T Cells and Wound Healing. *The Journal Of Immunology*,[s.l.], v. 184, n. 10, p.5423-5428, 5 maio 2010. The American Association of Immunologists.

HA-HI. et al. IL-17 drives psoriatic inflammation via distinct, target cell-specific mechanisms. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*,[s.l.], v. 111, n. 33, p.3422-3431, 4 ago. 2014. Proceedings of the National Academy of Sciences.

HALEY B. et al. The Severity of Psoriasis Associates with Aortic Vascular Inflammation Detected by FDG PET/CT and Neutrophil Activation in a Prospective Observational Study. *ArteriosclerThrombVasc Biol.* 2015 December ; 35(12): 2667–2676.

HOGAN, Simon P. et al. Eosinophils: Biological Properties and Role in Health and Disease. *Clinical & Experimental Allergy*,[s.l.], v. 38, n. 5, p.709-750, maio 2008. Wiley-Blackwell.

HORIE S, et al. Interleukin-13 but not interleukin-4 prolongs eosinophil survival and induces eosinophil chemotaxis. *Intern. Med.*36:179–85. 1997.

HORIUCHI, T., WELLER, P. E.. Expression of vascular endothelial growth factor by human eosinophils: Upregulation by granulocyte macrophage colony-stimulating

factor and interleukin-5. *American Journal of Respiratory and Cellular Molecular Biology*, 17, 70–77. 1997.

HOSHINO et al. Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and angiogenin immunoreactivity in asthmatic airways and its relationship to angiogenesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107, 295–301. 2001.

HUMBLES A. A. et al. The murine CCR3 receptor regulates both the role of eosinophils and mast cells in allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:1479–84. 2002

KITA, H., et al. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3 release from human peripheral blood eosinophils and neutrophils. *Journal of Experimental Medicine*, 174, 745–748. 1991

KORMAN, Abraham M. et al. Impact and management of depression in psoriasis patients. *Expert Opinion On Pharmacotherapy*, [s.l.], v. 17, n. 2, p.147-152, 4 jan. 2016. Informa Healthcare.

KOENDERMAN L Priming: a critical step in the control of eosinophil activation. In: Lee JJ, Rosenberg HF (eds) *Eosinophils in health and disease*. Academic Press, Waltham, pp 170–179 2013

KRYCEK I, Bruce AT, Gudjonsson JE, et al. Induction of IL-17+ T cell trafficking and development by IFN-gamma: mechanism and pathological relevance in psoriasis. *J*

*Immunol*2008; 181: 4733–41.

LANGLEY R.G. et al. Secukinumab in plaque psoriasis--results of two phase 3 trials. *N Engl J Med*. 2014; 371:326–338.

LEE, J. J. et al. Eosinophil-dependent skin innervation and itching following contact toxicant exposure in mice. *Journal Of Allergy And Clinical Immunology*,[s.l.], v. 135, n. 2, p.477-487, fev. 2015. Elsevier BV.

LEIFERMAN, Kristin M.. Eosinophils and itch: Partners in crime or strange bedfellows?. *Journal Of Allergy And Clinical Immunology*,[s.l.], v. 135, n. 2, p.488-490, fev. 2015.

LEW et al. Psoriasis vulgaris: cutaneous lymphoid tissue supports T-cell activation and 'Type 1' inflammatory gene expression. *Trends Immunol*. 25:295–305 2004.

LONG, Hai et al. Eosinophilic Skin Diseases: A Comprehensive Review. *Clinical Reviews In Allergy & Immunology*, [s.l.], v. 50, n. 2, p.189-213, 16 abr. 2015. Springer Nature.

Lopez AF, et al Murine eosinophil differentiation factor. An eosinophil-specific colony-stimulating factor with activity for human cells. *J. Exp. Med*. 163:1085–99 1986.

LOWES, M A.; SUÁREZ-FARIÑAS, M; KRUEGER, J. G.. Immunology of Psoriasis. *Annual Review Of Immunology*,[s.l.], v. 32, n. 1, p.227-255, 21 mar. 2014. Annual Reviews.

LØNNBERG, A.S. et al. Asthma in patients with psoriasis. *British Journal Of Dermatology*, [s.l.], v. 172, n. 6, p.1660-1661, 27 abr. 2015. Wiley-Blackw

LUNDIN, et al. The eosinophil granulocyte in psoriasis. *British Journal Of Dermatology*, Aarhus, v. 22, n., p.181-193, ago. 1989.

MACNEIL, S. Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature*, [s.l.], v. 445, n. 7130, p.874-880, 22 fev. 2007. Springer Nature.

MAHLER, V. et al. Psoriasis predisposition and occupational triggering factors in the appraisal of occupational medical expertises. *J Dtsch Dermatol Ges* 2014; 12: 519–29.

MANOLE, C.G.; GHERGHICEANU, M; SIMIONESCU, O. Telocyte dynamics in psoriasis. *Journal Of Cellular And Molecular Medicine*, [s.l.], v. 19, n. 7, p.1504-1519, 19 maio 2015. Wiley-Blackwell.

MANSUR, At; GÖKTAY, F; YAŞAR, Şp. Peripheral blood eosinophilia in association with generalized pustular and erythrodermic psoriasis. *Journal Of The European Academy Of Dermatology And Venereology*, [s.l.], v. 22, n. 4, p.451-455, abr. 2008.

MCNAGNY K, et al. Making eosinophils through subtle shifts in transcription factor expression. *J. Exp. Med.* 195:F43–47 2002

MUNIZ, V. S.; WELLER, P. F.; NEVES, J. S.. Eosinophil crystalloid granules: structure, function, and beyond. *Journal Of Leukocyte Biology*, [s.l.], v. 92, n. 2, p.281-288, 6 jun. 2012. Society for Leukocyte Biology.

NAKAJIMA, T., et al. Intracellular localization and release of eotaxin from normal eosinophils. *FEBS Letters*, 434, 226– 230.1998

NESTLE, F. O. et al. Skin immune sentinels in health and disease. *Nature Reviews Immunology*,[s.l.], p.1-2, 18 set. 2009. Springer Nature.

a) NERLOV C, et al. PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Genes Dev.* 12:2403–12 1998.

b) NERLOV C, et al. Distinct C/EBP functions are required for eosinophil lineage commitment and maturation. *Genes Dev.* 12:2413–23 1998.

NOGRALES, K. E. et al. Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. *Br. J. Dermatol.* 159:1086–91 2008.

NOGRALES, K. E.; DAVIDOVICI, B.; KRUEGER, J. G.. New Insights in the Immunologic Basis of Psoriasis. *Seminars In Cutaneous Medicine And Surgery*, [s.l.], v. 29, n. 1, p.3-9, mar. 2010. Frontline Medical Communications, Inc..

NÖSKE, K. et al. Mitotic Diversity in Homeostatic Human Interfollicular Epidermis. *International Journal Of Molecular Sciences*,[s.l.], v. 17, n. 2, p.167-180, 28 jan. 2016. MDPI AG.

PANTELYUSHIN S. et al. Rorct+ innate lymphocytes and gammadelta T cells initiate

psoriasiform plaque formation in mice. *J Clin Invest* 2012; 122:2252–6

PATEL, Nupur et al. Psoriasis, Depression, and Inflammatory Overlap: A Review. *American Journal Of Clinical Dermatology*, [s.l.], p.1-2, 21 abr. 2017. Springer Nature.

POSSA, Samantha S. et al. Eosinophilic Inflammation in Allergic Asthma. *Frontiers In Pharmacology*,[s.l.], v. 4, p.12-13, 2013. Frontiers Media SA

PUXEDDU, Ilaria et al. Human peripheral blood eosinophils induce angiogenesis. *The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology*,[s.l.], v. 37, n. 3, p.628-636, mar. 2005. Elsevier

RAVIN, Karen A.; LOY, Michael. The Eosinophil in Infection. *Clinical Reviews In Allergy & Immunology*, [s.l.], v. 50, n. 2, p.214-227, 21 dez. 2015. Springer Nature.

REIS, A. C. et al. Induction of eosinophil apoptosis by hydrogen peroxide promotes the resolution of allergic inflammation. *Cell Death And Disease*, [s.l.], v. 6, n. 2, 12 fev. 2015. Springer Nature.

RIOL-BLANCO, L. et al. Nociceptive sensory neurons drive interleukin-23-mediated psoriasiform skin inflammation. *Nature*,[s.l.], v. 510, n. 7503, p.157-161, 23 abr. 2014. Springer Nature.

ROTHENBERG ME, et al. Characterization of a human eosinophil proteoglycan, and augmentation of its biosynthesis and size by interleukin 3, interleukin 5, and

granulocyte/macrophage colony stimulating factor. *J. Biol. Chem.* 263:13901–8 1988

ROTHENBERG, M. E.; HOGAN, S. P.. The eosinophil. *Annual Review Of Immunology*,[s.l.], v. 24, n. 1, p.147-174, abr. 2006. Annual Reviews.

SHAMRI R, Xenakis JJ, Spencer LA. Eosinophils in innate immunity: an evolving story. *Cell Tissue Res* 343(1):57–83 2011

SOLOMON, A., et al. Nerve growth factor is preformed in and activates human peripheral blood eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 102, 454–460.1998

SORENSEN O.E, et al. Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors. *J. Immunol.* 170:5583–89 2003.

TRIVEDI, S. G.; LLOYD, C. M.. Eosinophils in the pathogenesis of allergic airways disease. *Cellular And Molecular Life Sciences*,[s.l.], v. 64, n. 10, p.1269-1289, 15 mar. 2007. Springer Nature.

UEKI, S. et al. Eosinophil extracellular DNA trap cell death mediates lytic release of free secretion-competent eosinophil granules in humans.*Blood*,Akita, Japan, v. 121, n. 11, p.2074-2083, 20 dez. 2012.

UHM, T. Gi; KIM, B. Soo; CHUNG, Il Yup. Eosinophil Development, Regulation of Eosinophil-Specific Genes, and Role of Eosinophils in the Pathogenesis of Asthma.

Allergy, Asthma And Immunology Research,[s.l.], v. 4, n. 2, p.68-79, 2012. The Korean Academy of Asthma, Allergy and Clinical Immunology and The Korean Academy of Pediatric AI.

VAN-DER-FITS, L. et al. Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice Is Mediated via the IL-23/IL-17 Axis. *The Journal Of Immunology*, [s.l.], v. 182, n. 9, p.5836-5845, 20 abr. 2009. The American Association of Immunologists.

VIEIRA, Angélica T. et al. Treatment with a Novel Chemokine-Binding Protein or Eosinophil Lineage-Ablation Protects Mice from Experimental Colitis. *The American Journal Of Pathology*,[s.l.], v. 175, n. 6, p.2382-2391, dez. 2009. Elsevier BV.

WELLER P. F. et al. Eosinophils: structureandfunctions. *Curr. Opin. Immunol.* 6:85–90. 1994

WONG, D. T., et al. . Human eosinophils express transforming growth factor alpha. *Journal of Experimental Medicine*, 172, 673–681. 1990

YU C, et al. Targeted deletion of a high-affinity GATA-binding site in the GATA-1 promoter leads to selective loss of the eosinophil lineage in vivo. *J Exp Med* 195:1387–1395 2002

YOUNG B, et al. Wheater's functional histology: a text and colour atlas. 5th ed. Edinburgh:*Elsevier*; 2006.

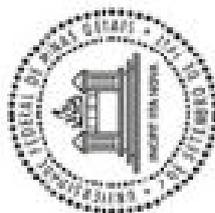
YOUSEFI, S., et al.. IL-8 is expressed by human peripheral blood eosinophils: Evidence for increased secretion in asthma. *Journal of Immunology*, 154, 5481–

5490.1995

ZIMMERMANN N, Hershey GK, Foster PS, Rothenberg ME. Chemokines in asthma: cooperative interaction between chemokines and IL-13. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111:227–42. 2003

ZHU Z, et al. Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. *Science* 304:1678–82. 2004

ZHU X, Zimmerman N. Eosinophil chemotaxis. In: Lee JJ, Rosenberg HF (eds) *Eosinophils in health and disease*. Academic Press, Waltham, pp 121–131 2013



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 424 / 2015, relativo ao projeto intitulado "Mecanismos envolvidos na inflamação psoriásica: papel dos eosinófilos e do receptor CD300a "; que tem como responsável Flávio Almeida Amaral, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 05/04/2016. Este certificado expira-se em 05/04/2021.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 424 / 2015, related to the Project entitled "Mechanisms involved in the psoriatic inflammation: role of eosinophils and CD300a receptor", under the supervision of Flávio Almeida Amaral, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 05/04/2016. This certificate expires in 05/04/2021.

Cleuzo Maria do Faria Rezende
 Coordenador(a) da CEUA/UFMG
 Belo Horizonte, 05/04/2016.

Atenciosamente,

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
 Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
 Unidade Administrativa II – 2ª Andar, Sala 2005
 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
 Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpg.ufmg.br