

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA: GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Isabelle Costa Antoniol

**Efeito de PereSkin, uma formulação contendo extrato de
Pereskia aculeata Miller, no tratamento de dermatite atópica
induzida em ratos**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Juiz de Fora
2023

Isabelle Costa Antoniol

**Efeito de PereSkin, uma formulação contendo extrato de
Pereskia aculeata Miller, no tratamento de dermatite atópica
induzida em ratos**

Dissertação de Mestrado do Curso
de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Área: Genética e
Biotecnologia, para obtenção do
Título de Mestre em Ciências
Biológicas: Área: Genética e
Biotecnologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Elita Scio Fontes

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Maria Christina Marques Nogueira Castañon

Juiz de Fora

2023

Isabelle Costa Antoniol

EFEITO DE PERESKIN, UMA FORMULAÇÃO CONTENDO EXTRATO DE *Pereskia aculeata* MILLER, NO TRATAMENTO DE DERMATITE ATÓPICA INDUZIDA EM RATOS.

Dissertação
apresentada ao
Programa de Pós-
graduação em
Ciências Biológicas
da Universidade
Federal de Juiz de
Fora como requisito
parcial à obtenção do
título de Mestre em
Ciências Biológicas.
Área de
concentração:
Genética &
Biotecnologia.

Aprovada em 20 de setembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Elita Scio Fontes - Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Prof^a. Dr^a. Maria Christina Marques Nogueira Castanon - Coorientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Prof. Dr. Gilson Costa Macedo
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Prof. Dr. Janildo Ludolf Reis Junior
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Prof^a. Dr^a. Josiane Mello da Silva Cunha

Centro Universitário do Sudeste Mineiro - UNICSON

Juiz de Fora, 11/09/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Elita Scio Fontes, Professor(a)**, em 25/09/2023, às 11:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Christina Marques Nogueira Castanon, Professor(a)**, em 25/09/2023, às 12:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Josiane Mello da Silva Cunha, Usuário Externo**, em 25/09/2023, às 12:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Janildo Ludolf Reis Junior, Professor(a)**, em 27/09/2023, às 11:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gilson Costa Macedo, Professor(a)**, em 28/09/2023, às 09:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1460937** e o código CRC **A7D33437**.

AGRADECIMENTOS

À essa força infinitamente acolhedora e a todos os que, por meio dela, me acompanham com o mesmo carinho.

À minha família que nunca deixou de me apoiar, por mais inusitados que lhes parecessem os caminhos que eu escolhi trilhar. Por todo amor e sustento, por toda paciência e confiança, por tudo o que sou.

À minha orientadora, Elita Scio, que me acolheu com braços e laboratórios abertos, pela oportunidade ímpar, pela paciência e pelo carinho, por toda ajuda e por dar asas às minhas ideias mirabolantes.

À minha querida co-orientadora, Maria Christina Castañon, por tanto aprendizado e orientação, inspiração, incentivo e compreensão.

Aos meus caríssimos colegas de laboratório pela ajuda imprescindível e por tornarem meus dias sempre mais leves. Naiara, Ari, Lu, MF, Jéssica: conhecer vocês alegrou o trabalho de uma vida.

Às queridas Yuli e Carmen, por todo o aprendizado que buscamos juntas e por confiarem em mim. Este trabalho não teria sido possível sem vocês.

A todos os técnicos e servidores da UFJF, cujo trabalho é o que permite o nosso. Delfino, Rogério, Bárbara, Carlos, Mariana, Stephane, Raquel, Evelise, Julieta, Fernanda e tantos outros nomes, meu agradecimento pessoal e verdadeiro a todos com quem convivi durante os últimos anos dentro desta instituição.

Por último, mas não menos importante, ao meu filho tão amado que chegou no meio desta jornada e ressignificou tudo o que entendo sobre a vida: obrigada por me fazer continuar de tantas, tantas e infinitas formas.

“Isso de querer ser exatamente aquilo que a gente é
ainda vai nos levar além.”
(Paulo Leminski)

RESUMO

A dermatite atópica é uma doença crônica, de caráter alérgico e recidivante que afeta de 1 a 20% da população mundial, entre adultos e crianças, cuja incidência crescente acompanha o nível de industrialização dos diferentes países. Sua manifestação se inicia geralmente durante a primeira infância, juntamente com outras doenças alérgicas como asma, rinite e conjuntivite alérgica, como consequência da marcha atópica. De forma semelhante, a DA acomete os cães, sendo a dermatite atópica canina (DAC) atualmente a dermatopatia de segunda maior apresentação clínica veterinária, tornando a doença uma preocupação cada vez maior na área da saúde. A teoria atualmente aceita para seu desenvolvimento envolve um conjunto de fatores intrínsecos e extrínsecos, de natureza imunológica e não imunológica. Imunologicamente, uma hipersensibilidade tipo I mediada por IgE caracteriza um cenário de intensa ativação celular, enquanto alterações estruturais envolvendo a expressão de proteínas epiteliais resultam em desestruturação da barreira cutânea. Uma das abordagens terapêuticas da DA é a manutenção da barreira visando reduzir a perda de água, a exposição à alérgenos e a consequente resposta inflamatória tecidual. Neste sentido, a espécie *Pereskia aculeata* é uma cactácea utilizada na medicina popular brasileira cujas folhas são empregadas como agente emoliente pelo seu conteúdo mucilaginoso e no abrandamento de processos inflamatórios associados a diferentes doenças de pele. Este trabalho avaliou os efeitos da atividade de um extrato rico em polissacarídeos obtidos das folhas de *P. aculeata* incorporado a uma formulação hipoalergênica que recebeu o nome de PereSkin, sobre um modelo animal de dermatite atópica induzido com capsaicina em ratos Wistar, em dois períodos distintos de tratamento contínuo: 2 e 4 semanas. Avaliações clínicas realizadas ao longo do tratamento dos animais indicaram que o uso de PereSkin está associado à uma redução do escore de dermatite, corroborado pelas avaliações clínicas e histopatológicas, demonstrando redução do escore de hiperplasia e da espessura epidérmica, além de diminuição das alterações morfológicas associadas. Análises histoquímicas demonstraram redução no número de mastócitos infiltrados na derme dos animais. Em conjunto, essas observações sugerem que PereSkin exerce atividade anti-inflamatória e ajuda a promover a restituição da barreira cutânea e reduzir os sintomas associados à DA, podendo ser útil no tratamento tópico coadjuvante e na terapia de manutenção da doença.

Palavras-chave: *Pereskia aculeata*. PereSkin. Dermatite atópica. Tratamento tópico. Capsaicina.

ABSTRACT

Atopic dermatitis (AD) is a chronic, allergic and recurrent disease that affects 1 to 20% of the world's population, including adults and children, whose increasing incidence follows industrialization levels in different countries. Its manifestation usually begins during the early childhood, along with other allergic diseases such as asthma, rhinitis and allergic conjunctivitis, as a consequence of the atopic march. Similarly, AD can affect dogs, and the canine atopic dermatitis (CAD) is currently the second most common veterinary dermatopathy presented in clinical animal health, making the disease a growing concern in the health area. The currently most accepted theory for its development involves a set of intrinsic and extrinsic factors, of both immunological and non-immunological nature. Immunological responses involves a type I hypersensitivity mediated by IgE while trophic disturbances involving the expression of epithelial proteins result in skin barrier disruption. Therapeutic approach for this condition includes maintenance of the skin barrier, aiming to reduce transepidermal water loss (TEWL), exposure to allergens and the consequent inflammatory response. In this scenario, the species *Pereskia aculeata* is a Cactaceae used in Brazilian traditional medicine whose leaves are used as an emollient agent due to their mucilaginous content, in order to reduce inflammatory processes associated with many skin diseases. This work aimed to evaluate the effects of an extract rich in polysaccharides obtained from the leaves of *P. aculeata* which was incorporated into a hypoallergenic formulation named PereSkin, used in the topical treatment of an animal model of AD induced by capsaicin in Wistar rats, in two different time points of continuous treatment, for 2 and 4 weeks. Clinical evaluations carried out throughout the experiment indicated that the use of PereSkin is associated with a reduction in the dermatitis score, corroborated histopathological and morphometric evaluations, showing a reduction in epidermal thickness in addition to a decrease in associated morphological alterations. Histochemical analyzes showed a reduction in the dermis infiltrated of mast cells. Taken together, these observations suggest that PereSkin exerts anti-inflammatory activities, helping on the skin barrier restitution and reducing the AD associated symptoms, and may be useful in the adjuvant topical treatment and in the maintenance therapy of AD patients.

Key-words: *Pereskia aculeata*. PereSkin. Atopic dermatitis. Topical treatment. Capsaicin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A cactácea <i>Pereskia aculeata</i> Miller: flores e folhas.....	31
Figura 2. Distribuição geográfica de <i>P. aculeata</i> Mill. no Brasil por regiões	32
Figura 3. Pele humana (HE)	43
Figura 4. Representação esquemática da epiderme: barreira cutânea e modelo de “tijolos e cimento”	44
Figura 5. Esquematisação da disfunção da barreira cutânea em dermatite atópica ...	48
Figura 6. Avaliação imuno-histoquímica para filagrina em animais não-induzidos (Vehicle-treated) e induzidos (Cap-treated) com aplicação neonatal de capsaicina ...	62
Figura 7. Esquema de etapas para obtenção do extrato rico em polissacarídeos de <i>P. aculeata</i>	78
Figura 8. Obtenção do extrato rico em polissacarídeos de <i>P. aculeata</i>	79
Figura 9. Preparo da formulação Pereskin	81
Figura 10. Regiões anatômicas de registro fotográfico de evolução clínica	85
Figura 11. Pesagem dos animais	85
Figura 12. Coleta de material biológico	86
Figura 13. Técnica histológica	87
Figura 14. Mastócitos em heterocromasia	88
Figura 15. Graus de acantose (HE)	90
Figura 16. Medida da epiderme (HE)	90
Figura 17. Reação de Dubois	92
Figura 18. Escore de dermatite em T1 e T2	94
Figura 19. CTRL-: espessura da derme e epiderme	100
Figura 20. CTRL-: características histomorfológicas	101
Figura 21. CTRLve: espessura da derme e epiderme.....	102
Figura 22. CTRLve: características histomorfológicas	103
Figura 23. CTRL+: atrofia epidérmica por efeito de corticoterapia tópica (HE)	104
Figura 24. CTRL+: características histomorfológicas	105
Figura 25. PERESKIN: espessura da derme e epiderme.....	106
Figura 26. PERESKIN: características histomorfológicas	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização do escore de dermatite	84
Tabela 2. Determinação do grau de acantose	89
Tabela 3. Quantificação dos teores de carboidratos, proteínas e lipídeos em EPA	93
Tabela 4. Incidência dos parâmetros morfológicos em cada grupo (%)	100

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Evolução do escore de dermatite	94
Gráfico 2. Evolução ganho de peso	95
Gráfico 3. Contagem de mastócitos	96
Gráfico 4. Medida da espessura da epiderme (μm)	97
Gráfico 5. Grau de acantose	98

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

AGPs – proteínas arabinogalactanas
AGs – arabinogalactanas
AT – Azul de toluidina
CAM – metabolismo do ácido crassuláceo
CB – camada basal
CBR – Centro de Biologia da Reprodução
CC – camada córnea
CCD – cromatografia em camada delgada
CDM – corneodesmosina
CE – camada espinhosa
CG – camada granulosa
CO₂ – dióxido de carbono
CTRL - – grupo controle negativo
CTRL ve – grupo controle veículo
CTRL+ – grupo controle positivo
CTs – corticosteroides tópicos
DA – dermatite atópica
DAC – dermatite atópica canina
EPA – extrato rico em polissacarídeos de *Pereskia aculeata*
EROs – espécies reativas de oxigênio
FAO – “Food and Agriculture Organization” Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FDA – “Food and Drug Administration” Administração Federal de Alimentos e Medicamentos
FcεRI – receptores de IgE de alta afinidade
FHN – fatores de hidratação natural
FLG – filagrina
FS – Fenol-sulfúrico
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
HE – hematoxilina-eosina
ICB – Instituto de Ciências Biológicas
IgE – imunoglobulina E
IL – interleucina
ITCs – inibidores tópicos de calcineurina
LIP – Laboratório Integrado de Pesquisa
LPNB – Laboratório de Produtos Naturais Bioativos
Mapa – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MS – Ministério da Saúde
NGF – “neural growth factor” fator de crescimento neural
NMR – ressonância magnética nuclear
NO – óxido nítrico
O₂ – superóxido
OMS – Organização Mundial da Saúde
ONU – Organização das Nações Unidas
OPN – ora-pro-nobis
PANC – planta alimentícia não-convencional
PAR-2 – Receptor ativado por protease

PARP – poli-ADP-ribose polimerase
PBS – “phosphate buffered saline” tampão fosfato-salino
PICS – Práticas Integrativas e Complementares de Saúde
PNPIC – Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PNPMF - Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
q.s.p – quantidade suficiente para
Rennisus – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS
RRPs – receptores de reconhecimento de padrão
SNC – sistema nervoso central
SUS – Sistema Único de Saúde
TEWL – “traspidermal water loss” perda de água transepidermica
TGF- β – “transforming growth fator” fator de crescimento transformante beta
TJ – “tight-junctions” zonas ocludentes epiteliais
TNF-a – “tumoral necrosis fator” fator de necrose tumoral alfa
TRP – “transient receptor potential” canais receptores de potencial transitório
TRPV1 – “transient receptor potential vanilloid 1” receptor de potencial transitório vaniloide subtipo 1
UFJF – Universidade Federal de Juiz de Fora

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
1.1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	28
1.1.1	ETNOBOTÂNICA E FARMACOGNOSIA	28
1.1.2	A ESPÉCIE <i>Pereskia aculeata</i> Miller	29
1.1.3	POLISSACARÍDEOS	34
1.1.4	POLISSACARÍDEOS DE <i>P. aculeata</i>	37
1.1.5	O TEGUMENTO	42
1.1.6	DERMATITE ATÓPICA	45
1.1.7	A PELE ATÓPICA	47
1.1.8	ABORDAGEM TERAPÊUTICA TÓPICA	52
1.1.9	MASTÓCITOS	58
1.2	MODELO ANIMAL	61
1.2.1	CAPSAICINA: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ESTRUTURA MOLECULAR, ORIGEM E ANÁLOGOS	66
1.2.2	APLICAÇÃO FARMACOLÓGICA	67
1.2.3	MECANISMO DE AÇÃO	68
1.2.4	APLICAÇÃO CUTÂNEA	73
1.3	EXTRATO RICO EM POLISSACARÍDEOS DE <i>P. aculeata</i> Miller (EPA)	74
2	OBJETIVOS	76
2.1	OBJETIVOS GERAIS	76
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	76
3	MATERIAL E MÉTODOS	77
3.1	MATERIAL VEGETAL	77
3.2	EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>Pereskia aculeata</i> Mill.	77
3.3	CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISES DE EPA	79
3.3.1	PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA	79
3.3.2	QUANTIFICAÇÃO DE CARBOIDRATOS	79
3.3.3	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS, LIPÍDEOS E CINZAS	82
3.4	PERESKIN	82
3.5	ANIMAIS	82
3.6	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	82

3.7 AVALIAÇÃO CLÍNICA	84
3.8 MATERIAL BIOLÓGICO	86
3.9 HISTOPATOLOGIA	87
3.9.1 TÉCNICA HISTOLÓGICA	87
3.9.2 AVALIAÇÃO HISTOQUÍMICA	88
3.9.3 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE ACANTOSE	89
3.9.4 MORFOMETRIA	90
3.9.5 DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA	91
3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	91
4 RESULTADOS	92
4.1 CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISES DE EPA	92
4.1.1 RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>P. aculeata</i>	92
4.1.2 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA	92
4.1.3 QUANTIFICAÇÃO DE CARBOIDRATOS, PROTEÍNAS, LIPÍDEOS E CINZAS	92
4.1.4 PERESKIN	93
4.2 EVOLUÇÃO CLÍNICA	93
4.3 HISTOPATOLOGIA	96
4.3.1 ANÁLISE HISTOQUÍMICA	96
4.3.2 ESPESSURA DA EPIDERME.....	97
4.3.3 GRAU DE ACANTOSE	98
4.3.4 DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA	99
5 DISCUSSÃO	108
6 CONCLUSÃO	115
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116

1 INTRODUÇÃO

A dermatite atópica (DA) é uma das principais enfermidades cutâneas inflamatórias da contemporaneidade. Apresenta curva crescente mundialmente e parece relacionada ao nível de industrialização dos países com maiores incidências. A medicina veterinária acompanha esta tendência, sendo a dermatite atópica canina (DAC) hoje a segunda dermatopatia que mais acomete os cães domésticos, atrás apenas da dermatite alérgica por picada de pulgas. É uma doença crônica, recidivante, que não possui cura e que acomete principalmente crianças. Seu tratamento é paliativo e sintomático, cujo objetivo é o abrandamento das crises e retorno do bem-estar físico e psicossocial do indivíduo. A busca por alternativas que complementem e/ou possam reduzir o uso de terapias alopáticas é de interesse tanto das comunidades científica e farmacêutica quanto do consumidor final, sejam eles portadores da doença ou tutores de um portador. Tendo em vista este cenário, ainda se faz necessária a busca por terapias mais seguras, acessíveis e menos dispendiosas para o tratamento e manutenção dos pacientes atópicos.

O Laboratório de Produtos Naturais Bioativos (LPNB) da Universidade Federal de Juiz de Fora desenvolve projetos da linha de pesquisa “Estudo químico e farmacológico de plantas bioativas”, cujo objetivo é a caracterização química e a avaliação da atividade biológica de extratos vegetais. Dentre outras espécies, a cactácea *Pereskia aculeata* Miller vem sendo amplamente estudada, demonstrando resultados promissores para o desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas. Esta é amplamente utilizada na culinária e na medicina popular, apresentando atividade emoliente, imunomoduladora, anti-inflamatória, cicatricial, antioxidante e antimicrobiana já demonstrada em outros trabalhos.

O presente estudo pretende avaliar a atividade biológica de uma formulação aquosa de base gel de administração tópica que contém como princípio ativo um extrato rico em polissacarídeos obtido a partir das folhas de *Pereskia aculeata*, que recebeu o nome de PereSkin. A espécie será investigada como possível agente terapêutico complementar com finalidade de promoção da restauração de barreira cutânea para manutenção da condição da dermatite atópica, reproduzida através de um modelo animal induzido por capsaicina em ratos que serão tratados com o produto desenvolvido.

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 ETNOBOTÂNICA E FARMACOGNOSIA

Desde as primeiras civilizações reportadas, sabe-se que o ser humano faz uso do reino vegetal para fins de manutenção da saúde. Os registros mais antigos do consumo de plantas com propriedades biológicas de interesse datam de pelo menos 5 mil anos (INOUE et al., 2019). O uso de plantas medicinais para o tratamento de diferentes condições humanas, sejam físicas, emocionais ou espirituais, pode ser encontrado em papiros, manuscritos, textos médicos e outros registros oriundos de todas as civilizações ancestrais de que se têm notícia. A Medicina Tradicional Chinesa, a Medicina Ayurvédica, a própria medicina romana (que dá origem às bases da medicina ocidental que conhecemos hoje) que foi também influenciada pela medicina egípcia, a medicina ancestral dos povos originários das Américas do Norte, Central e do Sul, a medicina tradicional dos povos islâmicos, árabes e aborígenes australianos: por todo o planeta o homem se desenvolveu como sociedade e civilização fazendo uso de recursos naturais para prevenir e tratar distúrbios do corpo e da mente, expandindo e refinando seus conhecimentos à medida que alcançavam novos territórios, novas interações e novas tecnologias (BALOGUN et al.; INOUE et al.; MINTAH et al.; KOPARDE et al., 2019).

Estima-se que cerca de 70 mil espécies vegetais sejam atualmente empregadas em práticas de medicina tradicional (INOUE et al., 2019). Dados apontam que, ainda hoje, mais de 60% da população mundial dependa diretamente do uso de plantas medicinais e do emprego de medicinas tradicionais como sistema de atenção primária à saúde (MINTAH et al., 2019).

A visão de que a medicina natural seja apenas um ramo de “medicina alternativa” pode não compreender inteiramente o fato de que muitos compostos amplamente empregados pela indústria farmacêutica tenham sua origem em compostos ativos isolados de plantas (KOPARDE et al., 2019). O termo “alternativo” vem sendo substituído pela expressão “complementar”. A medicina alopática e a medicina natural tradicional não devem possuir relação de exclusão, mas de sinergia entre si. A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece e orienta a adoção de Práticas Integrativas e Complementares de Saúde (PICS). No Brasil, o Ministério da

Saúde (MS) reconheceu no início do século a prática de medicinas complementares através da Portaria GM nº 971, sancionando a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), que implementa diferentes práticas tradicionais como serviços oferecidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) desde maio de 2006 (BRASIL, 2006; MENDES et al., 2018). Ainda neste ano, o MS implantou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), através do decreto nº 5813, cujo objetivo é “garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional” (Ministério da Saúde, 2006). Segundo o MS (2019), desde o ano de 2019 o SUS contava com 29 práticas integrativas incluídas no programa. Em 2009, o MS divulgou a catalogação de 71 espécies vegetais de interesse etnobotânico e farmacológico por meio da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS).

A nível mundial, o Brasil se destaca no campo dos estudos fitoterápicos por possuir um terço da flora do planeta. Além disso, a Amazônia é a maior reserva de produtos naturais com ação fitoterápica do mundo (MENDES et al., 2018).

1.1.2 A ESPÉCIE *Pereskia aculeata* Miller

As cactáceas, conhecidas popularmente como cactos, são representantes da família *Cactaceae*. Pertencem ao grande grupo das Angiospermas, o que significa que são plantas que possuem sementes protegidas pela estrutura que chamamos de fruto. Os cactos são nativos do continente americano, distribuídos desde o norte do Canadá até o sul da Argentina (NYFFELER, 2002). É uma família botânica com usos relatados para várias espécies na medicina popular, culinária tradicional e cerimônias religiosas (ZAPPI, 2015).

Possui atualmente 176 gêneros e compreende 2233 espécies divididas em 4 subfamílias: *Maihuenioideae*, *Pereskioideae*, *Opuntioideae* e *Cactoideae* (THE PLANT LIST, 2021). É característico dos seus exemplares um caule suculento como principal órgão fotossintético e folhas vestigiais ou já substituídas por espinhos. O objetivo das adaptações evolutivas das cactáceas é, em suma, minimizar a perda de água através da respiração. A essas características somam-se células ricas em mucilagem, um estoque complexo de polissacarídeos que pode conter até trinta mil subunidades de açúcar e funciona como um reservatório de moléculas de água

(OGBURN e EDWARDS, 2009). Dentro das subfamílias *Maihuenioideae* e *Pereskioideae*, alguns membros são considerados os representantes botânicos mais antigos por ainda conservarem folhas fotossintéticas bem desenvolvidas (BUTTERWORTH et al., 2008).

Os representantes do gênero *Pereskia* foram os primeiros cactos a serem estudados pelos botânicos (LEUENBERGER, 2008), e são nativos da América do Sul (BUTTERWORTH e WALLACE, 2005). Este gênero compreende 17 espécies (EDWARDS et al., 2005) e mantém características ancestrais que já não se apresentam em outros gêneros da mesma família, como folhas suculentas fotossintéticas, caules finos e pouco espinhosos, lenhosos ou sublenhosos, flores terminais dispostas em cimeiras e hábitos arbóreos ou arbustivos. O metabolismo do tipo CAM também é limitado nestes indivíduos, o que garante à planta uma capacidade adaptativa em ambientes mais úmidos (DUARTE e HAYASHI, 2005; FARAGO et al., 2004; OGBURN, 2009). Sua distribuição está associada à ocorrência do clima seco, podendo ser encontrada ao longo da faixa tropical do continente americano. No território brasileiro estão distribuídas 7 espécies do gênero *Pereskia* (ZAPPI, 2015). Sem grande importância econômica, exemplares podem ser encontrados com relativa facilidade em campos, beiras de estrada, cercas-vivas e quintais (MIRANDA, 2013; ZAPPI, 2015).

A partir do nosso continente, sua distribuição se deu até outras regiões tropicais do mundo, como a Índia, América Central e Panamá, Califórnia, Filipinas, Bermudas, Hawaí, Israel, Austrália e sul da África (ALMEIDA FILHO; CAMBRAIA, 1974; MORTON, 1987; WEED MANAGEMENT GUIDE, 2003; OLCKERS, 2004). Apesar de se desenvolver inicialmente em regiões levemente áridas (DUARTE e HAYASHI, 2005; EDWARDS et al., 2005), sua ocorrência em florestas tropicais alteradas é relatada em estudos fitossociológicos e florísticos, que pode ser explicado, em parte, pelas características evolutivas destes exemplares que permitem sua adaptação a ambientes moderadamente úmidos, diferentemente de outras cactáceas (UDULUTSCH, 2010).

No Brasil, duas espécies do gênero *Pereskia* recebem destaque. *Pereskia aculeata* (Figura 1) e *Pereskia grandifolia* são popularmente conhecidas como ora pro nobis (derivado do latim, significa “rogai por nós” e faz referência à utilização que data da época colonial desta planta), e utilizadas na culinária e na medicina popular regional. Embora possam ser confundidas, principalmente em períodos não férteis

quando não apresentam floração, *P. aculeata* é utilizada em maior escala na culinária enquanto *P. grandifolia* é normalmente cultivada para fins ornamentais e formação de cercas vivas (FARAGO et al., 2004; ALMEIDA, 2012).



Figura 1. A cactácea *Pereskia aculeata* Miller: flores e folhas.
Fonte: elaborado pela autora, 2023.

Pela natureza rústica comum às cactáceas e sua fácil propagação, seu cultivo é favorável e de boa adaptação (MIRANDA, 2013), resultando em um arbusto perene, de caules finos, que geralmente se apresenta na forma de trepadeira. É destituída de um pacote tecnológico para produção como cultivo agrícola (MIRANDA, 2013), sendo considerada uma planta alimentícia não-convencional (PANC). Pode atingir até dez metros de altura e possui ramos largos, espinhos e folhas tenras e medianamente carnosas, com presença de mucilagem e sabor característico, com pequenos frutos de formato arredondado (DUARTE e HAYASHI, 2005). As flores possuem de cerca de 3cm de diâmetro e coloração brancas e amarelo-alaranjadas para a espécie *P. aculeata* e rosa-arroxeadas para a espécie *P. grandifolia* (MORTON, 1987; ROSA e SOUZA, 2003).

Na medicina popular, suas folhas são empregadas como emoliente pelo seu conteúdo mucilaginoso, usadas para tratamento de feridas por queimaduras, abrandamento de processos inflamatórios e no tratamento de doenças de pele. Os frutos são tidos como expectorantes e antisifídicos (SARTOR et al., 2010; DUARTE e HAYASHI, 2005; FARAGO et al., 2004).

Também é consumida como hortaliça e faz parte da culinária tradicional de algumas regiões do sudeste do país, sendo bem distribuída no território brasileiro (Figura 2). Seu consumo é incentivado pelo Governo Federal no Manual de Hortaliças

Não-Convencionais desenvolvido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2010).



Figura 2. Distribuição geográfica de *P. aculeata* Mill. no Brasil por regiões
Fonte: Flora do Brasil, 2021

Apresenta significativos teores de ferro e outros minerais, conteúdo de fibras dietéticas e elevado teor proteico – o que a tornou conhecida como “carne dos pobres”. É ingrediente para sopas e refogados (QUEIROZ, 2015), farinhas, saladas, tortas e massas alimentícias como o macarrão (ROCHA et al., 2008), e caracterizada como nutracêutica pelo seu alto valor nutricional (SARTOR et al., 2010).

Estudos de avaliação nutricional encontraram valores que variam de 17,4 a 28,9g de proteína nas folhas para cada 100g de matéria seca de OPN (CORRÊA, 2012). A composição de aminoácidos caracteriza a OPN como uma fonte de proteínas de alto valor biológico pelo teor de aminoácidos essenciais presentes nas folhas, acima do necessário ao consumo humano segundo a Organização de Alimentação e Agricultura da ONU (em inglês Food and Agriculture Organization – FAO). Por definição, aminoácidos essenciais são aqueles cuja obtenção depende da composição da dieta do indivíduo, ou seja, não podem ser sintetizados livremente pelo

organismo. Os aminoácidos mais abundantes encontrados nas folhas de OPN são triptofano e lisina (MERCÊ et al., 2001; TAKEITI et al., 2009).

O teor de lisina corresponde a até 23 vezes o valor encontrado em outros vegetais (MERCÊ et al., 2001). A lisina um aminoácido essencial envolvido na manutenção do sistema imune, no metabolismo de cálcio, na produção de colágeno e no desenvolvimento corporal saudável. Seu consumo é um dos limitantes das dietas à base de cereais quando não suplementado. Isto é significativo, uma vez que muitas comunidades de baixo poder aquisitivo têm sua dieta baseada neste grupo alimentar. O triptofano, por sua vez, é um aminoácido essencial envolvido na síntese de serotonina, um neurotransmissor responsável pelo desempenho de processos cognitivos, manutenção do ritmo circadiano e outras funções orgânicas, cuja falta está relacionada à quadros de depressão e outros distúrbios psicológicos (TAKEITI et al., 2009; MERCÊ et al., 2001).

Pesquisas também demonstraram importantes quantidades de outros fatores nutricionais presentes nas folhas de *P. aculeata*, como: fibras dietéticas; minerais como cálcio, ferro, zinco, manganês e magnésio; vitaminas A, C, E e B9; assim como níveis reduzidos de lipídeos e calorias (GIRÃO et al., 2003; MERCÊ et al., 2001; ROCHA et al., 2008; TAKEITI et al., 2009). Um estudo considerou a OPN uma fonte de ferro mais rica quando comparado a outras espécies reconhecidas como boas fontes de ferro, como o espinafre (4,48 mg/100 g); o feijão (9,64 a 10,37 mg/100 g), couve-manteiga refogada (2,70 mg/100 g), e a beterraba cozida (2,13 mg/100 g) (MOURA E CANNIATTI-BRAZACA, 2006; KINUPPI, 2008).

O conteúdo mucilaginoso nas folhas de OPN se mostrou rico em arabinogalactanas e galactomananas, biopolímeros de potencial interesse das indústrias química, alimentícia e farmacêutica pelas suas propriedades reológicas e de ligação com íons metálicos como ferro, cobre, cobalto, manganês e níquel. Além disso, unidades de arabinofuranose, arabinopiranosose, galactopiranosose, ácido galactopiranosil urônico, ramnopiranosose e glicopiranosose também estão presentes nas folhas de *P. aculeata*. (MARTIN et al., 2017).

Sua atividade biológica vem sendo estudada por diferentes pesquisadores de forma mais frequente desde a última década (MORAES et al., 2018). Trabalhos anteriores revelaram o potencial na promoção da cicatrização de feridas cutâneas excisionais (PINTO et al., 2016) e no tratamento de dermatites induzidas de forma aguda e crônica (SOUZA et al., 2016; PINTO et al., 2015). Dentre as propriedades

reportadas, vem sendo destacado seu potencial antioxidante (PINTO et al., 2012; BESSA, 2020; CRUZ et al., 2021). Foi encontrada também atividade antinociceptiva (PINTO et al., 2015), A ação de um extrato de *P. aculeata* em ensaio animal demonstrou que sua ação analgésica e anti-inflamatória é similar ao mecanismo de ação de glicocorticoides sem que fossem observados os efeitos adversos causados por estes fármacos, mesmo em tratamento prolongado (PINTO et al., 2015). Atividade antimicrobiana (SOUZA et al., 2016) e antitumoral (PINTO et al. 2016; SOUZA et al., 2016) também foi identificada para a espécie. Bessa (2020) constatou o efeito hipoglicêmico, antilipidêmico e prebiótico intestinal de uma fração obtida a partir das folhas desta planta. Além disso, recentemente foi relatado para a espécie, o efeito antipsoriático (PINTO et al., 2020), antihemolítico (CRUZ et al., 2021), neuroprotetivo (TORRES et al., 2021) e imunomodulador sobre cultivo isolado de células de sangue periférico humano (ANDRADE et al., 2020).

1.1.3 POLISSACARÍDEOS

Polissacarídeos são macromoléculas de estrutura complexa, formados por unidades de monossacarídeos unidas por ligações glicosídicas, formando imensas moléculas de carboidratos (CHEN et al., 2020). Os monossacarídeos podem ainda estar ligados a outras cadeias de carboidratos lineares ou ramificadas, o que garante a complexidade destes compostos e faz com que a maior parte deles possua um altíssimo peso molecular (YU et al, 2018).

Abundantemente encontrados em plantas (na forma de amido e celulose, por exemplo), animais (heparina e ácido hialurônico, por exemplo), microorganismos (zimosan e dextrano, por exemplo) e algas (alginato, por exemplo), possuem grande diversidade em termos de estrutura química, composição, peso molecular, potencial e sequências de ligação, o que garante um leque de funcionalidade e de atividades biológicas (LI et al., 2018). Na célula, são empregados como fonte energética e desempenham importante papel em atividades como adesão e comunicação celular, reconhecimento molecular, processos de imunomodulação e características reológicas teciduais (YU et al., 2018; CHEN et al., 2020).

Estudos recentes vêm identificando esses polímeros naturais como uma nova classe molecular que pode ser empregada com objetivos antivirais, antifúngicos, anticoagulantes, antidiabéticos, antitumorais e antioxidantes no tratamento de

diferentes afecções (YU et al., 2018). Amido e glicogênio são polissacarídeos já conhecidamente utilizados como biocombustíveis, compostos adjuvantes e aditivos alimentares (LI et al. 2018).

Devido à suas aplicações práticas, são biomoléculas de interesse de indústrias alimentícias, farmacêuticas, cosméticas e outras (SHARIATINIA, 2019; DRAGAN & DINU, 2019; CHEN et al., 2020). Suas propriedades naturais de estruturação de matriz extracelular e de manutenção da adesão e da proliferação celular são empregadas em áreas biomédicas na forma de agentes terapêuticos, veículos farmacêuticos e na engenharia de tecidos, o que vem incentivando estudos aprofundados desta classe molecular nos últimos anos (LI et al., 2018). Os polissacarídeos naturais têm sua bioatividade intrínseca derivada de propriedades mucoadesivas, antimicrobianas e anti-inflamatórias versáteis (DRAGAN & DINU, 2019). Sua aplicabilidade se dá, de forma geral, pelo aproveitamento de duas propriedades: sua capacidade de formação de hidrocoloides com alta pressão osmótica, viscosidade e absorção de água, com propriedades físico-químicas que configuram uma alternativa no preparo de veículos farmacêuticos; e suas diferentes atividades biológicas (YU et al., 2018; SHARIATINIA, 2019).

Uma variedade de polissacarídeos vegetais, incluindo a celulose, hemicelulose, as pectinas e outros oligossacarídeos são classificados pela FAO como fibras dietéticas de interesse (LI et al., 2018).

A celulose, um dos biopolímeros mais conhecidos e empregados industrialmente, serve de base para fabricação de diversos materiais de interesse comercial como produtos adsorventes, filtros, fabricação têxtil de roupas protetoras e, devido à sua biocompatibilidade, na engenharia médica, sendo empregado na reconstrução de diferentes tecidos, como vascular, ósseo, cardíaco, hepático e nervoso (LI et al., 2018).

Alguns polissacarídeos têm recebido especial atenção pela sua estrutura semelhante à matriz extracelular de tecidos humanos, apresentando importantes vantagens além da alta biocompatibilidade, como sua propriedade biodegradável, baixa toxicidade, capacidade de retenção de umidade e propriedades coloidais (KUZNETSOVA et al., 2020). Polissacarídeos também vêm sendo utilizados na confecção de hidrogéis para administração de drogas como proteínas e peptídeos de interesse farmacológico, por constituírem veículos estáveis e versáteis (DRAGAN & DINU, 2019; SHARIATINIA, 2019). Quitosana, alginato, dextrana, celulose, ácido

hialurônico e o próprio amido estão entre os polissacarídeos mais utilizados industrialmente, inclusive na confecção de veículos farmacêuticos de utilização *in vivo* e *in vitro* (DRAGAN & DINU, 2019).

Especialmente as arabinogalactanas, as galactomananas e as pectinas derivadas de plantas superiores, β -glicanas e glicoproteínas derivadas de fungos e polissacarídeos sulfatados derivados de algas marinhas têm sido alvo de estudo com enfoque nas suas propriedades antioxidantes e imunomoduladoras (YU et al., 2018).

Embora os mecanismos através dos quais os polissacarídeos desempenham sua função imunomoduladora ainda não tenham sido completamente elucidados, a ação imunoestimulante de alguns polissacarídeos já foi observada, principalmente, sobre macrófagos (LI et al., 2018; SHARIATINIA, 2019). Estudos anteriores demonstram que glicanos podem ser capazes de modular funções macrocíticas através de diversos mecanismos, estimulando sua capacidade de fagocitose, citotoxicidade tumoral, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico (NO), e secreção de citocinas e quimiocinas (LI et al., 2018).

O uso de polissacarídeos também está associado à promoção de processos cicatriciais. A cicatrização de feridas cutâneas é um dos fatores mais importantes no tratamento e manutenção de muitas patologias. O desenvolvimento de filmes derivados de biopolímeros aplicados como curativos vem recebendo crescente atenção, uma vez que possuem a capacidade de mimetizar a pele sobre o local exposto, dada sua morfologia e biocompatibilidade (SHARIATINIA, 2019). Os materiais usados para fins de revestimento curativo desempenham um papel de barreira que permite a hidratação e a troca gasosa tecidual sem deixar de oferecer proteção física à área cuja solução de continuidade da pele foi interrompida, particularmente contra a exposição à microrganismos, além de promover absorção do exsudato e a umectação dos tecidos adjacentes (GOKARNESHAN, 2019). Filmes porosos podem ser fabricados a partir de quitosana, amido, celulose, queratina, ácido hialurônico e outros polissacarídeos, geralmente associados a outros componentes que garantem características apropriadas necessárias a um curativo comercial (GOKARNESHAN, 2019; SHARIATINIA, 2019).

Uma das plantas medicinais mais amplamente utilizadas no tratamento de diferentes afecções é a *Aloe vera*, da família das liliáceas. Seu uso popular está fortemente associado a propriedades cicatriciais, calmantes e umectantes. Embora seja composta de 98,5 a 99,5% de água, mais de 200 compostos já foram identificados

em sua porção sólida, sendo a maior parte deles pertencentes à classe dos polissacarídeos e considerados os principais responsáveis pelas atividades biológicas associadas a espécie (MINJARES-FUENTES et al., 2018).

Estudos também têm demonstrado a ação protetora dos polissacarídeos sobre o tecido neural através de uma variedade de mecanismos. O estresse oxidativo descompensado que configura condição patológica é apontado como um fator potencial na patogênese de desordens neurodegenerativas do sistema nervoso central (SNC) (GAO et al., 2017). O alto consumo de oxigênio que ocorre no tecido nervoso, torna este tecido especialmente susceptível a danos causados pelos EROs. Alguns polissacarídeos têm demonstrado ação protetiva contra o estresse oxidativo e a inflamação associada, apoptose de células neurais e na promoção de neurogênese e da viabilidade celular. Outros mecanismos de ação, como a interação com fatores de transcrição e sinalização proteica, também vem sendo elucidados como parte do princípio pelo qual estas moléculas exercem atividade benéfica sobre tecidos neurais (GAO et al., 2017).

O uso de polímeros naturais possui vantagens como sua fácil obtenção, disponibilidade de modificação química, caracterização de fonte renovável, economia, ausência de toxicidade, estabilidade, hidrofília, biocompatibilidade e biodegradabilidade quando comparados aos polímeros desenvolvidos artificialmente, que apresentam não raramente empecilhos relacionados à toxicidade e danos ambientais (SHARIATINIA, 2019). Além disso, os biopolímeros demonstram maior efetividade na cicatrização de feridas que os polímeros obtidos de forma sintética (GOKARNESHAN, 2019).

Cada vez mais pesquisadores vem indicando esta classe molecular como uma importante alternativa para o desenvolvimento de biotecnologias, demonstrando a relevância de novos estudos sobre a empregabilidade dos polissacarídeos em diferentes áreas de manutenção e promoção da saúde (SHARIATINIA, 2019).

1.1.4 POLISSACARÍDEOS DE *P. aculeata*

Uma variedade de polissacarídeos extraídos de fontes vegetais é empregada industrialmente para aproveitamento de suas diversas propriedades físico-químicas (MARTIN et al., 2017). O estudo de novas fontes de hidrocoloides visa a busca de funcionalidades estruturais, físico-químicas e funcionais específicas que

atendam sua demanda como insumo industrial para produção de agentes espessantes, emulsificantes, ligantes, formadores de gel e estabilizantes (SILVA et al., 2019). Carboidratos complexos com grande capacidade de absorção de água possuem a capacidade de formar mucilagem, o que lhes garante propriedade hidrocoloidal e a perspectiva de utilização nas esferas industriais alimentícias, farmacêuticas e cosméticas (MARTIN et al., 2017).

As plantas pertencentes à família das cactáceas são conhecidas pelo seu alto conteúdo mucilaginoso (MARTIN et al., 2017). Como membro desta família, a espécie *P. aculeata* apresenta na composição das suas folhas um considerável aporte de carboidratos, proteínas e aminoácidos essenciais e não essenciais, vitaminas, fibras dietéticas, hemicelulose e minerais como cálcio, magnésio, manganês e zinco (MARTIN et al., 2017; SILVA et al., 2019). Além de ser considerada uma PANC e fazer parte da culinária regional, sua utilização pela medicina tradicional emprega as folhas como um emoliente capaz de abrandar processos inflamatórios e promover a cicatrização de queimaduras (SILVA et al., 2019).

De forma especial, os polissacarídeos presentes nas folhas desta planta vêm sendo estudados como uma fonte alternativa de obtenção de mucilagem, dada sua ausência de toxicidade e a alta concentração destes polímeros (SILVA et al., 2019). Tendo em vista o seu alto conteúdo proteico e mucilaginoso, a espécie *P. aculeata* é tida como uma fonte potencial para a extração de hidrocoloides com capacidade emulsificante e estabilizante (JUNQUEIRA et al., 2018).

Os primeiros pesquisadores a estudar a composição das folhas de *P. aculeata* foram Almeida Filho e Cambraia (1974), enquanto mais tarde Sierakowski et al. (1990) extraíram sua porção mucilagínosa, caracterizando os polissacarídeos presentes nas folhas como altamente ramificados, contendo unidades de arabinofuranose, arabinopirranose, galactopirranose, ácido galactopiranosil urônico e ramnopirranose. Concluíram a presença de arabinogalactanas, polissacarídeo que é principalmente constituído de um heteroglicano estruturado a partir de galactose, arabinose, rhamnose e ácido galacturônico, tanto na sua forma isolada quanto em associação com proteínas tissulares, formando proteínas arabinogalactanas. Além disso, estes estudos também demonstram sua capacidade de interação com íons CO_2^+ , Cu^{2+} , Mn^{2+} e Ni^{2+} (ALMEIDA FILHO E CAMBRAIA, 1974; SIERAKOWSK et al., 1990).

Martin et al. (2017) recentemente extraíram e caracterizaram a porção mucilaginosa das folhas de *P. aculeata* através de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR), concluindo que a extração aquosa de polissacarídeos apresenta arabinogalactanas tipo I como principal componente, juntamente com ácido galacturônico parcialmente esterificado e unidades de fucose, sendo estas últimas pela primeira vez descritas em associação com tal polissacarídeo (MARTIN et al., 2017).

Amaral et al. (2019), avaliando as propriedades reológicas de soluções mucilaginosas de OPN adicionadas de diferentes componentes, concluíram que sua mucilagem é carregada negativamente com polieletrólitos em solução e que sua viscosidade é aumentada quando do aumento da concentração, aumentando concomitantemente seu comportamento elástico e a formação de géis fortes (AMARAL et al., 2019).

Junqueira et al. (2018) avaliaram a estabilidade e o comportamento reológico da mucilagem obtida a partir das folhas de *P. aculeata* através de diferentes métodos de secagem, concluindo que estas se apresentam mais estáveis quando da maior concentração de polissacarídeos hidrocoloides e que o extrato liofilizado é o que se apresenta mais estável e uniforme dentre os processamentos avaliados, possuindo também maior capacidade emulsificante e estabilidade morfológica (JUNQUEIRA et al., 2018).

Oliveira et al. (2019) afirmam que a mucilagem obtida a partir das folhas de *P. aculeata* possui a propriedade de formar filmes biodegradáveis coesivos e flexíveis, tendo estes pesquisadores desenvolvido um filme de embalagem flexível à base de OPN e glicerol. Segundo os autores, essa mucilagem é capaz de ser utilizada como fonte alternativa para a fabricação de filmes biodegradáveis e comestíveis (OLIVEIRA et al., 2019).

Segundo Martin et al. (2017), a mucilagem obtida de *P. aculeata* possui perfil macromolecular heterogêneo, de comportamento polieletrólítico e relativo potencial estabilizador de emulsões, característica proveniente da propriedade de adsorção deste extrato. Segundo os mesmos autores, a solubilidade e a organização e interação moleculares dos polissacarídeos obtidos são melhoradas após aquecimento, demonstrando a influência da temperatura sobre a viscosidade característica da mucilagem. O aumento da temperatura afeta a interação intermolecular e as ligações de hidrogênio presentes, aumentando a vibração das

moléculas e reduzindo a propriedade espessante do extrato aquoso mucilaginoso, melhorando também a solubilidade e a organização molecular dos polissacarídeos extraídos (MARTIN et al., 2017).

Além de suas propriedades reológicas, emulsificantes e estabilizantes, a mucilagem obtida a partir das folhas de OPN pode possuir aplicabilidade biomédica pelo aproveitamento de propriedades biológicas que envolvem a imunomodulação (AGOSTINI-COSTA et al., 2020), atividade hipoglicêmica e capacidade de modulação de populações de microrganismos (BESSA, 2020), já tendo sido demonstrado sua atividade de promoção da saúde da microbiota intestinal (AGOSTINI-COSTA et al., 2020; BESSA, 2020).

As arabinogalactanas (AGs) são polissacarídeos de alto peso molecular que apresentam em sua estrutura muitas ramificações, consistindo principalmente de resíduos de arabinose e galactose. Encontradas em vegetais e em alguns microrganismos, nos primeiros estão geralmente ligadas a um peptídeo. Neste caso, são chamadas proteínas arabinogalactanas (AGPs), que compõem uma família de glicoproteínas comumente presentes nas secreções vegetais e na superfície celular (SAEIDY et al., 2021).

Por possuírem uma ampla diversidade estrutural e serem encontradas em todo o reino vegetal, as AGPs são provavelmente envolvidas com a modulação de funções fisiológicas importantes como a divisão e expansão celular, resposta ao estresse ambiental, diferenciação do xilema, sinalização hormonal, embriogênese somática e desenvolvimento reprodutivo (SAEIDY et al., 2021).

As mucilagens obtidas de cactáceas são caracterizadas como ricas em polissacarídeos do tipo arabinogalactanas, que são polímeros de estrutura molecular complexa e difícil caracterização, presentes nas sementes, raízes, caules, folhas e flores de todas as plantas superiores, e fazem parte do grupo de moléculas chamadas de hidrocoloides ou mucilagens (MARTIN et al., 2017; SAEIDY et al., 2021).

São agrupadas, segundo sua estrutura molecular, em dois tipos: as arabinogalactanas do tipo I, de cadeia principal linear, desempenham função estrutural da parede celular e se encontram ligadas a pectinas, enquanto as arabinogalactanas do tipo II possuem cadeias ramificadas, geralmente conectadas umas às outras, e estão principalmente associadas ao espaço extracelular (SAEIDY et al., 2021).

Além do seu comportamento reológico e das habilidades espessante e emulsificante, as arabinogalactanas têm sido reconhecidas por desempenhar atividades biológicas como agente imunomodulador, antitumoral, anti-inflamatório, antitussígeno, antioxidante, antiobesogênico, gastroprotetivo, antilipidêmico, entre outras atividades reportadas. Como se diferenciam importantemente à medida que sofrem ramificações, sua atividade biológica depende da estrutura molecular particular de cada AG ou AGP (SAEIDY et al., 2021).

De forma geral, o estudo das arabinogalactanas aborda uma molécula ou uma fonte vegetal específica, dada sua alta diversidade em termos estruturais e funcionais. Recentemente, uma série de pesquisas vem elucidando sua ação sobre diferentes desequilíbrios fisiológicos, demonstrando que as arabinogalactanas podem exercer atividade bioprotetora através do desempenho de sua propriedade adesiva. Isso faz com que promovam inibição de sintomas ulcerativos através da formação de uma camada sobre a superfície ulcerada. Além de atuarem como agente protetor, podem desempenhar atividade antioxidante correlacionada com sua composição de unidades de monossacarídeos (SAEIDY et al., 2021).

Desempenham também atividade antitumoral, dada a habilidade de estimular processos como a apoptose de células tumorais, modulação do sistema imune e ação inibidora de angiogênese. Também desempenha atividade antiviral através de diferentes mecanismos (SAEIDY et al., 2021). Além disso, possuem ação prebiótica, pois sua ingestão promove alterações específicas na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal e confere benefícios à saúde humana pela modulação benéfica da população de microrganismos residente no trato digestivo (SAEIDY et al., 2021; BESSA, 2020).

Foi recentemente desenvolvido um extrato rico em polissacarídeos obtidos das folhas de *P. aculeata*, cuja atividade vem sendo estudada no Laboratório de Produtos Naturais Bioativos da UFJF. Mediante os resultados encontrados por Bessa (2020) para este extrato, e as informações expostas anteriormente neste trabalho, foi levantado o questionamento a respeito da atividade deste extrato sobre diferentes condições patológicas. O presente trabalho investiga a ação de uma formulação contendo o dado extrato em uma condição dermatológica de crescente incidência e expressiva importância no cenário atual tanto da medicina humana quanto veterinária: a dermatite atópica.

1.1.5 O TEGUMENTO

O tegumento é constituído pela pele e seus anexos. A pele constitui a primeira barreira seletiva entre o indivíduo e o ambiente. É considerada como o maior e um dos mais importantes órgãos do corpo, representando cerca de 15% do peso corporal total de um indivíduo (LAI-CHEONG & MCGRATH, 2021). Cumpre a função primária de proteção contra o meio externo, formando uma barreira física e imunológica entre o organismo e ambiente, impedindo a entrada de agentes causadores de danos físicos, químicos e patogênicos, além de controlar a perda de fluidos e outros componentes e participar na termorregulação (CAÑEDO-DORANTES & CAÑEDO-AYALA, 2019; LAI-CHEONG & MCGRATH, 2021). Sua espessura, pigmentação e distribuição de estruturas especializadas dependem da região corporal em questão e da funcionalidade exercida em cada área (LAI-CHEONG & MCGRATH, 2021).

Possui um sistema imune-neuroendócrino próprio que contribui para a manutenção da homeostase corporal. Sua circulação é realizada capilares subepidérmicos responsáveis pelo aporte de oxigênio e pela remoção de CO₂ e de produtos metabólicos da epiderme (CAÑEDO-DORANTES & CAÑEDO-AYALA, 2019). Sua estrutura é uma estratificação complexa de tecido epitelial e de tecido conjuntivo que compreende a epiderme e suas estruturas anexas, como folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas, e derme, com suas células e matriz extracelular contendo fibras colágenas e elásticas, além da substância fundamental amorfa. O tecido adiposo pode estar presente no subcutâneo de algumas topografias (LAI-CHEONG & MCGRATH, 2021). É didaticamente dividida em duas camadas principais: derme e epiderme (CAÑEDO-DORANTES & CAÑEDO-AYALA, 2019).

A epiderme possui localização mais externa e contém ceratinócitos como as principais células associadas, representando 95% do conteúdo celular (LAI-CHEONG & MCGRATH, 2021). Além destes, melanócitos, células de Langerhans, células dendríticas, células imunes e axônios sensoriais (CAÑEDO-DORANTES & CAÑEDO-AYALA, 2019) constituem os outros 5% (LAI-CHEONG & MCGRATH, 2021). É dividida em quatro subcamadas: camada córnea (CC), camada granulosa (CG), camada espinhosa (CE) e camada basal (CB) (Figura 3). Uma quinta camada denominada estrato lúcido delgado, fortemente acidófila, situada entre as camadas

granulosa e córnea, pode ser observada com mais evidência em topografia palmo-plantar (LAI-CHEONG & MCGRATH, 2021).

O processo de renovação da epiderme depende do ciclo de diferenciação celular terminal que culmina com o que chamamos de ceratinização ou cornificação celular. Este ciclo tem início com a migração de ceratinócitos da CB até as camadas CG e CE, resultando em uma estrutura multilaminar de envelopes cornificados que é resultante do depósito estratificado de células mortas (DRISLANE & IRVINE, 2019).

A CB é formada por uma única camada celular de ceratinócitos em estado de proliferação e diferenciação que, tendo atingido sua maturação, migram para formação da CC. Fisiologicamente, este processo dura aproximadamente 40 dias, embora algumas doenças, como a psoríase, possam acelerar patologicamente este processo (LAI-CHEONG & MCGRATH, 2021).

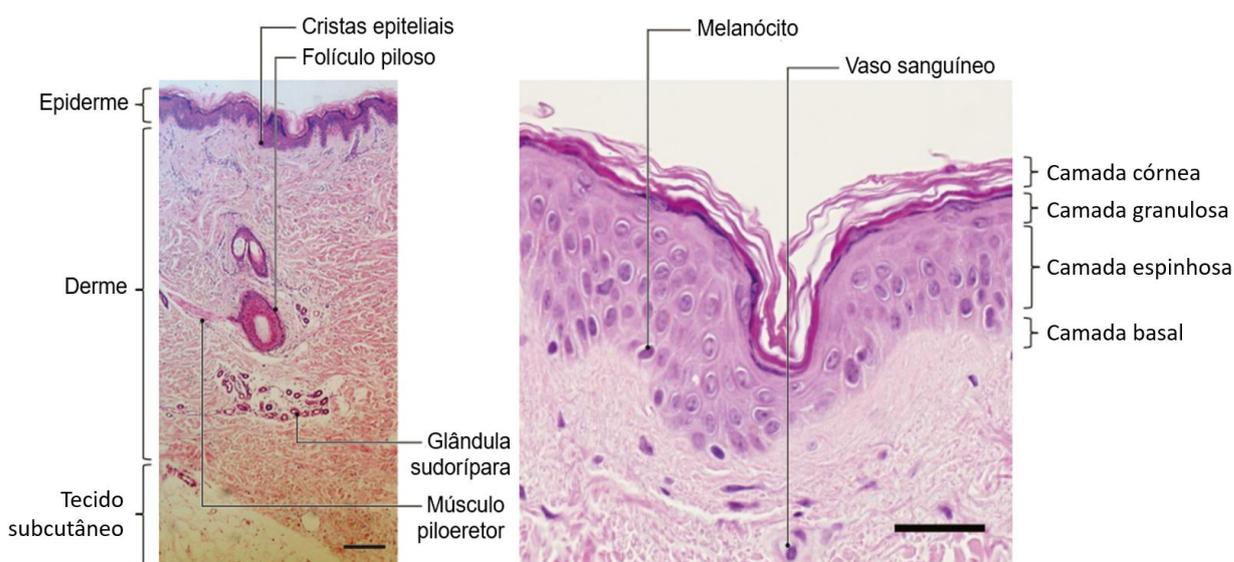


Figura 3. Pele humana (HE)
Fonte: adaptado de Lai-Cheong & McGrath, 2021

Os melanócitos fazem parte das populações celulares da epiderme, e são células dendríticas provenientes da crista neural que também estão localizados na CB. A melanina, proteína responsável pela pigmentação epidérmica, é sintetizada pelos melanócitos e transferida aos ceratinócitos em vesículas chamadas melanossomas, onde formam uma camada protetora supranuclear que protege o DNA epitelial dos efeitos da radiação ultravioleta. Variações de pigmentação da pele são fruto da síntese de diferentes moléculas de melanina e do número e tamanho dos melanossomas (LAI-CHEONG & MCGRATH, 2021). O pH da pele humana varia entre

4.5 e 5.3. A melanina também é responsável pela acidificação da pele: peles negras possuem pH acidificado pela produção de metabólitos ácidos derivados da melanina (LAI-CHEONG & MCGRATH, 2021).

A CC é a camada mais externa da epiderme (LAI-CHEONG & MCGRATH, 2021). Constitui a barreira física e a primeira linha de defesa do organismo contra ameaças externas, além de desempenhar importante papel na regulação da homeostase de água (DRISLANE & IRVINE, 2019).

É formada por lipídeos estruturais e células anucleadas e destituídas de organelas citoplasmáticas chamadas corneócitos, cujas membranas plasmáticas são altamente insolúveis e estruturadas por envelopes cornificados resultantes de ligações *cross-linking* entre precursores de proteínas solúveis como involucrina e loricrina (LAI-CHEONG & MCGRATH, 2019). Este envelope cornificado é formado por lipídeos produzidos pelos ceratinócitos em diferenciação e liberados para o espaço extracelular. Estes componentes formam uma estrutura associada ao esquema de “tijolos e cimento” (Figura 4) (DRISLANE & IRVINE, 2019).

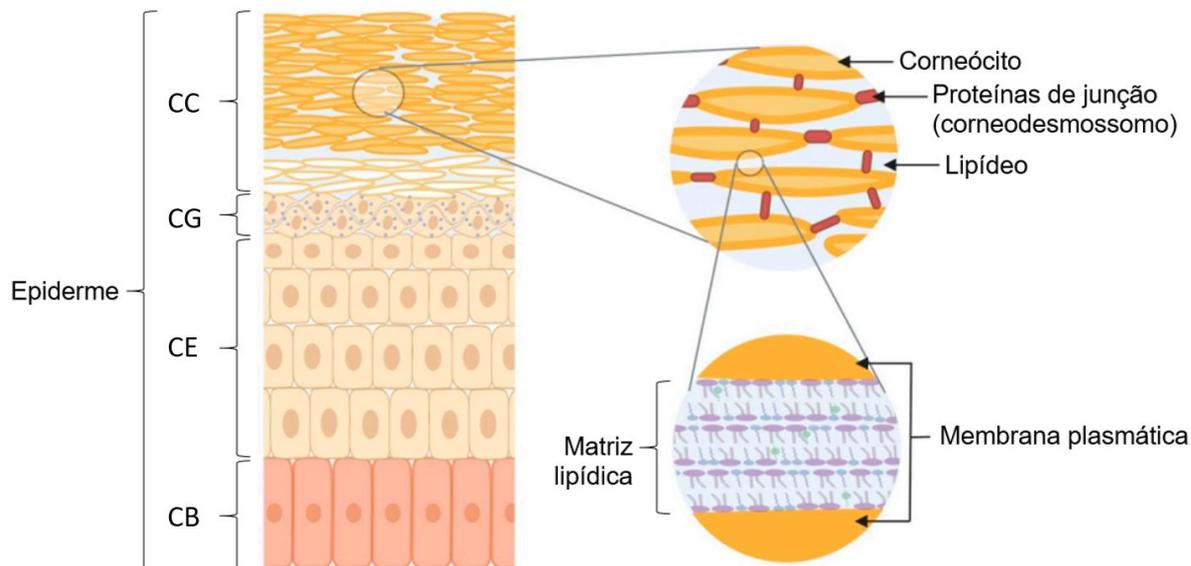


Figura 4. Representação esquemática da epiderme: barreira cutânea e modelo de “tijolos e cimento”

Fonte: adaptado de Yang et al., 2020

A estrutura da camada de ceratinócitos da CB é mantida por um citoesqueleto de filamentos intermediários de citoceratina. À medida que ocorre a diferenciação da epiderme, uma proteína estrutural chamada filagrina (FLG), envolvida na construção da barreira cutânea, é responsável pela compressão e

achatamento dos ceratinócitos (LAI-CHEONG & MCGRATH, 2021). A FLG é uma proteína rica em histidina capaz de agregar os filamentos intermediários de citoceratina (em inglês FILAGGRIN = *filament aggregatin protein*) (DRISLANE & IRVINE, 2019). Junto com a citoceratina, compõe aproximadamente 90% da massa da epiderme (LAI-CHEONG & MCGRATH, 2021).

A derme, por sua vez, é a camada que contém os apêndices cutâneos, fibroblastos, mastócitos, células apresentadoras de antígenos e células imunes residentes e circulantes. Inclui a matriz extracelular que suporta as conexões intercelulares, a dinâmica de mobilidade celular e a regulação de fatores de crescimento e da expressão de citocinas (CAÑEDO-DORANTES & CAÑEDO-AYALA, 2019). É separada da epiderme pela membrana basal, uma região de macromoléculas que ligam filamentos de ceratina provenientes dos ceratinócitos basais e fibras de colágeno na porção superficial da derme. A principal função desta membrana constituída de proteínas e glicoproteínas é a adesão destas duas camadas, e defeitos nestas estruturas resultam em prejuízos na integridade da pele (LAI-CHEONG & MCGRATH, 2021).

Seu tecido intersticial, composto majoritariamente de água, é elástico e permeado por fibras colágenas que constituem aproximadamente 70% das estruturas da derme, predominantemente as fibras tipos I e III. Elastina e microfibrilas elásticas conferem flexibilidade à pele, embora sejam menos resistentes que as colágenas, e constituem cerca de 5% da massa estrutural tecidual. Os fibroblastos são células mesenquimais de diferenciação multipotencial responsáveis pelo depósito de fibras elásticas e colágeno, regulação da homeostase, cicatrização de feridas e estruturação de folículos capilares (LAI-CHEONG & MCGRATH, 2021).

1.1.6 DERMATITE ATÓPICA

Dentre as principais inflamações que acometem a pele, a dermatite atópica (DA) é uma doença cutânea cuja epidemiologia aponta uma crescente incidência nas últimas décadas, chegando a atingir 10% da população adulta e 15-30% da população infantil, principalmente em países com altos níveis de industrialização (ZHONG et al., 2022). Com uma prevalência variável de 1 a 20% da população global, entre adultos e crianças, a doença tem se tornado uma preocupação cada vez maior na área da saúde (DAS et al., 2022). De forma semelhante, na medicina clínica veterinária a

doença tem ganhado casuística cada vez mais significativa, sendo a dermatite atópica canina (DAC) a segunda dermatopatia mais observada em cães (GONÇALVES et al., 2018). Caracterizada por quadros clínicos recidivantes de prurido moderado a intenso com descamação e ressecamento da pele, esta enfermidade traz, além de desconforto físico e expressivos gastos financeiros, um importante desgaste psicológico-social para os pacientes, uma vez que as lesões podem se manifestar com aspecto desagradável em partes expostas do corpo (ANTUNES et al., 2017).

O pico da manifestação da dermatite atópica geralmente ocorre entre 3 e 6 meses de vida (ZHONG et al., 2022). A doença costuma iniciar sua manifestação durante a primeira infância, juntamente com outras manifestações alérgicas como asma, rinite, conjuntivite alérgica, etc (DAS et al., 2022). Aproximadamente metade dos pacientes pediátricos tardios apresentam propensão a rinite e asma como consequência da marcha atópica (ZHONG et al., 2022).

A fisiopatologia da DA é complexa, sistêmica, genética e multifatorial, não tendo sido ainda completamente esclarecida (ANTUNES et al., 2017; BIEBER, 2010). Envolve uma série de condições imunológicas e não imunológicas que se relacionam entre si, como disfunção da barreira cutânea, estímulos ambientais alergênicos e predisposição ao desencadeamento de uma reação imunológica exacerbada com a ativação de mastócitos e células T helper 2, elevada produção de citocinas inflamatórias relacionadas como IL-4, -5, -13, -17, -31, IFN- γ e anticorpos IgE. Esta condição caracteriza um aumento da permeabilidade da pele, promovendo tanto a perda excessiva de água quanto a entrada de alérgenos e patógenos. Combinados, esses fatores desencadeiam um quadro inflamatório cutâneo generalizado e atópico, resultando nos sintomas eczematosos característicos da doença: xerodermia, prurido, eritema, exantema e descamação (GONÇALVES et al., 2018; BRUNNER et al., 2017). Por ser uma doença de natureza crônica, pruritogênica e recidivante cujas manifestações clínicas afetam expressiva e negativamente a qualidade de vida dos pacientes, a DA/DAC influencia o indivíduo de forma física, emocional e financeira, requerendo muitas vezes um tratamento complexo e possivelmente prolongado (DAS et al., 2022; ZHONG et al., 2022).

Ao ocorrer a penetração de um alérgeno, células apresentadoras de antígeno, como as células de Langerhans presentes na epiderme, internalizam-no e apresentam informações alergênicas às células T CD4+ imaturas. Estas, então, sofrem diferenciação em células T helper 2 (Th2), induzindo a secreção de citocinas

pró-inflamatórias que incluem IL-4, IL-13, além da diferenciação de novas células Th2, recrutamento de eosinófilos e a ativação de células B e mastócitos. Quando imunoglobulinas IgE secretadas pelos linfócitos B ativados, presentes no plasma, se ligam a receptores de alta afinidade (FcεRI) presentes na superfície dos mastócitos, o complexo IgE-FcεRI induz a degranulação mastocitária promovendo liberação de histamina e outras substâncias alergênicas. Além dessa cascata imunológica, os mastócitos também são responsáveis pela diferenciação de novas células Th2 e pela indução da síntese de novas moléculas de IgE (KIM et al., 2023).

As abordagens terapêuticas atuais incluem a hidratação e restauração da barreira cutânea com o uso de hidratantes e emolientes, alterações ambientais e na rotina do paciente para evitar exposição a alérgenos, antibioticoterapia, uso sistêmico e/ou tópico de drogas anti-inflamatórias esteroidais ou inibidoras de calcineurina ou de fosfodiesterase (DRAELOS et al., 2019). Normalmente, o tratamento constitui uma combinação destas. As terapias farmacológicas, porém, tendem a se tornar menos efetivas em quadros recidivantes e podem implicar em importantes efeitos adversos, prejudicando a adesão ao tratamento (NYGAARD et al., 2017).

Para controle das crises atópicas normalmente são empregados glicocorticoides. No entanto esta classe de medicamentos está relacionada a uma série de efeitos adversos que afetam desde o metabolismo de tecidos ósseos, proteínas, lipídeos e carboidratos, à regulação do eixo hipotalâmico-hipofisário e do sistema imune, incluindo uma maior predisposição a infecções sistêmicas e cutâneas, toxicidade hepática e esplênica, distúrbios gastrointestinais, atrofia epidérmica e redução de volume de órgãos linfoides decorrentes do seu uso prolongado (DRAELOS et al., 2019). As terapias alternativas ao uso de glicocorticoides por vezes se apresentam inviáveis para alguns pacientes dado seu custo elevado e/ou dificuldade de acesso (ELIAS et al., 2019). Dessa forma, biofármacos que se apresentem seguros e eficazes constituem relevantes objetos de pesquisa no desenvolvimento de novas alternativas de tratamentos.

1.1.7 A PELE ATÓPICA

A pele atópica é caracterizada por um distúrbio na diferenciação tecidual que inclui aumento de proliferação celular e disfunção da barreira epidérmica, disfunção esta que possui etiologia complexa e cujo desenvolvimento está

condicionado à combinação de fatores estruturais, genéticos, imunológicos e externos (ZHU et al., 2018).

Os principais fatores que levam à condição cutânea atópica estão associados a anormalidades de barreira cutânea e envolvem a redução da proteína estrutural FLG, de ceramidas e de peptídeos antimicrobianos; aumento dos níveis de serinoproteases e redução da sua inibição; desordens a nível de TJs (YANG et al., 2020). Estes fatores estarão, por sua vez, relacionados com uma composição lipídica disfuncional da epiderme, deficiência de proteínas estruturais, aumento do pH da pele e alteração na diversidade da microbiota residente (ZHU et al., 2018). Os níveis reduzidos de ceramidas e de fatores de hidratação natural (FHNs) são resultantes da expressão deficiente de FLG. Juntamente com as anormalidades das junções celulares TJs, esses fatores impedem a efetiva estruturação de uma barreira cutânea íntegra, o que culmina em uma maior perda de água transepidermica (em inglês, TEWL – *traspidermal water loss*) e menores níveis de hidratação do estrato córneo dos pacientes atópicos (Figura 5) (NAKAHARA et al., 2021).

A redução do nível de ceramidas e alterações na sua composição, a redução da expressão de moléculas moduladoras da diferenciação epidérmica como FLG, loricrina e involucrina também são fatores associados com a redução da efetividade da barreira observada nos pacientes atópicos e resultam em menores níveis de hidratação cutânea (NAKAHARA et al., 2021).

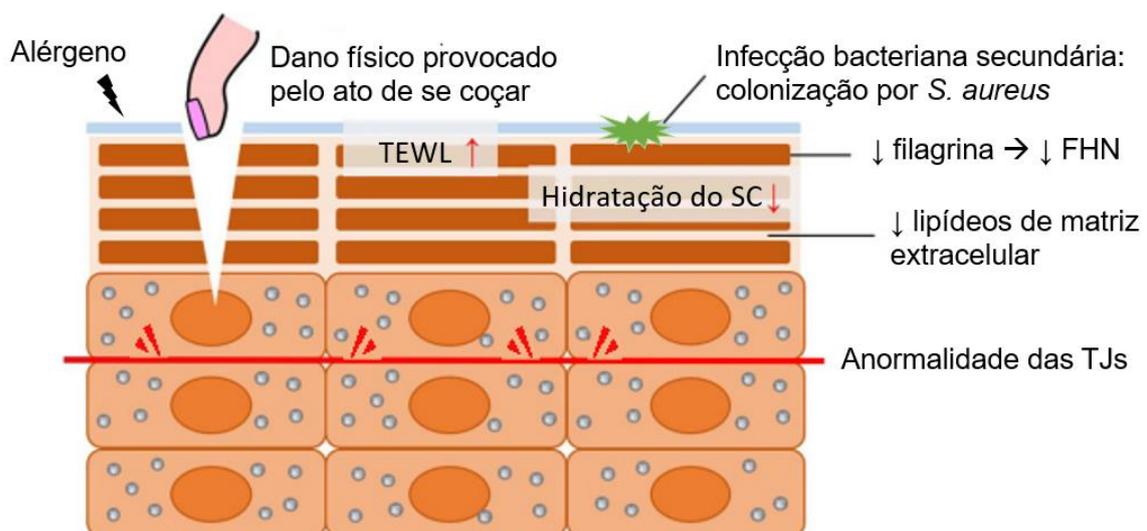


Figura 5. Esquematização da disfunção da barreira cutânea em dermatite atópica.

Fonte: adaptado de Nakahara et al., 2021

Alterações de permeabilidade cutânea podem ser mensurados através de medidas de perda de água transepidérmica e níveis de hidratação cutânea, e estão correlacionados com a severidade da doença. Além disso, alterações da microbiota podem influenciar a duração, a severidade e a resposta dos sintomas às terapêuticas adotadas (ZHU et al., 2018).

A FLG é uma proteína relacionada à manutenção da força mecânica, integridade e hidratação do estrato córneo. A perda de função decorrente de mutações no gene relacionado à expressão de FLG está fortemente associada à dermatite atópica, e o processamento alterado desta proteína precursora está relacionado à disfunção da barreira cutânea e ao desenvolvimento de DA/DAC (KIM et al., 2018; ZHU et al., 2018). Mutações que acarretam a perda de função da FLG são comuns e afetam cerca de 10% da população mundial, constituindo o maior fator de risco para o desenvolvimento da dermatite atópica, de outras doenças alérgicas associadas e de asma (DRISLANE & IRVINE, 2019; LAI-CHEONG & MCGRATH, 2021), e são comumente associadas com todos os subfenotipos da doença e com a manifestação persistente de sintomas de início precoce (DRISLANE & IRVINE, 2019). Camundongos livres de FLG exibem alterações na funcionalidade da barreira cutânea e aumentada resposta imune percutânea (KAWASAKI et al., 2012).

Apesar de ser o maior fator de risco associado ao desenvolvimento de DA/DAC, dentre os indivíduos que apresentam mutações envolvendo os genes de FLG 40% não desenvolvem a doença, e essas mutações apenas são observadas em 15-50% dos pacientes. Isso indica que alterações isoladas no processamento de FLG não sejam suficientes para explicar a disfunção de barreira cutânea observada em condições atópicas (NAKAHARA et al., 2021). Mesmo os pacientes que não possuem tais alterações genéticas tendem a apresentar reduzido conteúdo desta proteína, sugerindo que a expressão desta esteja associada a alterações do microambiente cutâneo ao longo do desenvolvimento da doença. Foi demonstrado que respostas imunes tipo 2 podem reduzir a expressão de FLG em pacientes atópicos. Estudos epidemiológicos indicam que a umidade do ambiente possa reduzir a contribuição das mutações deste gene no desenvolvimento da atopia (NAKAHARA et al., 2021).

Pacientes atópicos apresentam conteúdo de ceramidas reduzido e alterações nas cadeias moleculares destes componentes, tanto na pele lesionada quanto não-lesionada (NAKAHARA et al., 2021). Mais especificamente, na DA/DAC observa-se um aumento na quantidade de ceramidas de cadeia curta e redução nas

ceramidas de cadeia longa, o que promove desequilíbrio na conformação estrutural e acaba por aumentar a perda de água transepidermica (ZHU et al., 2018). A proporção de ceramidas e colesterol também é alterada, estando reduzida em pacientes atópicos (NAKAHARA et al., 2021). É sabido que citocinas inflamatórias reduzem a expressão de enzimas envolvida na síntese de ceramidas, impactando a estruturação lipídica da barreira epidérmica (ZHU et al., 2018). O aumento de pH e a elevada atividade de proteinases resultam na inativação de outras enzimas envolvidas na síntese das ceramidas (NAKAHARA et al., 2021).

De forma análoga, as cadeias de ácidos graxos livres também influenciam a estruturação da matriz lipídica cutânea. Ácidos graxos de cadeia longa são principalmente responsáveis pela manutenção da estrutura da CC, enquanto ácidos graxos de cadeia curta podem prejudicar a conformidade desta estrutura. O desbalanço lipídico em pacientes de DA/DAC é consequência da redução dos níveis de elongase, enzima envolvida no alongamento das cadeias de ácidos graxos, que pode ocorrer em decorrência da resposta Th2 envolvida na fisiopatologia da dermatite atópica. Lipídeos sebáceos secretados na superfície da pele são responsáveis pela lubrificação e manutenção da hidratação cutânea, além de possuírem propriedades antimicrobianas e antioxidantes. Em condições atópicas, a produção de sebo cutâneo se encontra prejudicada, o que sugere uma correlação entre a redução da atividade de glândulas sebáceas e a disfunção de barreira observada em pacientes atópicos (ZHU et al., 2018). Como resultado destas alterações a estrutura lamelar lipídica da barreira cutânea em pacientes atópicos sofre importante disrupção, permitindo a penetração de alérgenos e a perda de água através desta (NAKAHARA et al., 2021).

Os complexos estruturais TJ que formam as barreiras intercelulares exibem alta seletividade para permeabilidade de substâncias e estão presentes nas membranas de ceratinócitos no SG (NAKAHARA et al., 2021). São compostos de proteínas transmembrana localizadas nos espaços intercelulares, e algumas são responsáveis pela formação da interface líquido-sólido da barreira epidérmica, exercendo a função de uma segunda barreira física (ZHU et al., 2018) Pacientes atópicos apresentam condições de redução da expressão de proteínas claudinas e alterações morfológicas associadas (NAKAHARA et al., 2021). A disrupção dos TJ enfraquece sobremaneira a função de barreira ao alterar o processamento de lipídeos e de profilagrina (ZHU et al., 2018), permitindo a entrada de alérgenos que ativam a

resposta inflamatória sistêmica associada às condições de atopia (NAKAHARA et al., 2021; DRISLANE & IRVINE, 2019; ZHU et al., 2018).

A disrupção de barreira em pacientes atópicos também pode ser influenciada pela ação anômala de proteases ativadas por substâncias exógenas. Alérgenos proteolíticos podem iniciar uma degradação epidérmica ao ligar receptores de proteases na superfície de ceratinócitos, desencadeando uma resposta inflamatória mediada por Th2. A inibição de serinoproteases pode também ser prejudicada, o que contribui para o agravamento da doença (ZHU et al., 2018).

Dentre os principais sinais manifestados pelos pacientes, o prurido pode ser considerado, em muitos casos, a manifestação de principal impacto sobre a qualidade de vida do indivíduo atópico e pode agravar o quadro da doença ao promover constante erosão do tecido epitelial. (NAKAHARA et al., 2021; ZHU et al., 2018). A manifestação do prurido é resultado da atividade sensorial primária de fibras neurais -C e -A δ , que transmitem estímulo tátil através do trato espinotalâmico para o tálamo e centros de processamento superiores para modular a percepção pruriginosa, formação de memória e comportamento repetitivo de se coçar (ZHU et al., 2018).

Apesar de não ter sido ainda completamente elucidado o mecanismo através do qual as vias de manifestação de prurido podem ser ativadas, sabe-se que gatilhos endógenos e exógenos como proteases, histamina, substância P, algumas interleucinas e alérgenos ambientais podem servir de sinalizadores para vias específicas ativadas nos terminais neurais da pele, enquanto uma condição de hiperinervação cutânea é responsável pelo agravamento do quadro (NAKAHARA et al., 2021). O prurido observado nos pacientes atópicos é resultante de uma complexa interação de fatores que perpassam a disrupção da barreira e a condição inflamatória da pele (NAKAHARA et al., 2021).

Após ter sua entrada facilitada através de uma barreira cutânea comprometida, alérgenos e patógenos podem atravessar a epiderme e ativar a resposta inflamatória alérgica Th2 mediada, aumentando a permeabilidade venolinfática e iniciando o recrutamento de mais moléculas desencadeadoras de prurido para o sítio da inflamação (ZHU et al., 2018). A resposta a esse estímulo pode, além de promover a erosão da pele, predispor a uma infecção bacteriana secundária, que age como fator perpetuante do ciclo de prurido associado à DA/DAC (NAKAHARA et al., 2021; ZHU et al., 2018).

1.1.8 ABORDAGEM TERAPÊUTICA TÓPICA

As terapias tópicas constituem a principal forma de manutenção da dermatite atópica (KLEINMAN et al., 2022; DRAELOS et al., 2019). As principais abordagens para controle das crises atópicas incluem a utilização de corticosteroides tópicos (CTs) ou alternativas não-esteroidais como inibidores tópicos de calcineurina (ITCs) e de fosfodiesterase (KLEINMAN et al., 2022; DRAELOS et al., 2019; ELIAS et al., 2019). Atualmente, as recomendações mais recentes para o tratamento e manutenção desta condição preconizam o uso de hidratantes juntamente com os agentes anti-inflamatórios (ELIAS et al., 2019).

Desde a década de 50, a corticoterapia tópica permanece sendo a principal ferramenta terapêutica para o tratamento da dermatite atópica pela sua capacidade de reduzir o prurido e a inflamação devido à sua ação vasconstritora, anti-inflamatória e imunossupressiva, atuando sobre mecanismos diretos e indiretos reduzindo os sintomas da doença (KIM et al., 2023; KLEINMAN et al., 2022; DRAELOS et al., 2019). São supressores do processamento de antígenos e da liberação de citocinas pró-inflamatórias (DRAELOS et al., 2019) disponibilizados em diferentes apresentações, como loções, cremes e pomadas (KIM et al., 2023).

Seu uso prolongado ou indiscriminado pode causar efeitos adversos, dentre eles a atrofia da pele, telangiectasia, estrias, dermatite perioral, acne, hiperpigmentação, hiperglicemia e desenvolvimento da Síndrome de Cushing (KIM et al., 2023; KLEINMAN et al., 2022; DRAELOS et al., 2019). Há ainda um risco de absorção sistêmica que deve ser considerado e que pode provocar supressão do eixo hipotalâmico hipofisário adrenal, afetando o crescimento linear de crianças e a densidade óssea de indivíduos adultos (KLEINMAN et al., 2022).

A segunda linha terapêutica inclui os inibidores tópicos de calcineurina (ITCs), que inibem a ativação de células T mediada por calcineurina. É recomendada para pacientes não responsivos à corticoterapia, quando seu uso é contra-indicado ou para manutenção ativa da doença (KLEINMAN et al., 2022). Essas alternativas apresentam menores riscos de efeitos adversos, podendo ser utilizadas por períodos mais longos e por pacientes infantis. Podem, também, ser aplicadas em regiões sensíveis, onde CTs são contraindicados (PAIVA-SANTOS et al., 2022).

Tacrolimus e pimecrolimus fazem parte da classe de medicamentos inibidores tópicos de calcineurina (ITCs). Seu uso foi aprovado no início do século XXI

para uso intermitente ou a curto prazo no caso de pacientes nos quais a corticoterapia seja não responsiva ou contraindicada (KLEINMAN et al., 2022; PAIVA-SANTOS et al., 2022). Esses fármacos agem como imunossuppressores inibindo a ativação de células T, reduzindo a expressão de citocinas pro-inflamatórias (KLEINMAN et al., 2022). O uso de pimecrolimus é recomendado no tratamento de DA leve a moderada que acomete áreas sensíveis da pele de pacientes não comprometidos imunologicamente maiores de 2 anos de idade, enquanto o tratamento com tacrolimus é considerado para casos severos a graves (KLEINMAN et al., 2022; PAIVA-SANTOS et al., 2022; LUK et al., 2021).

Embora as terapias com ITCs não cause atrofia da pele, podem causar efeitos adversos como irritação local e ardor (KLEINMAN et al., 2022; DRAELOS et al., 2019). De acordo com a Academia Americana de Dermatologia e a Academia Americana de Alergia, Asma e Imunologia, as recomendações incluem o aconselhamento do paciente por parte dos profissionais quanto aos efeitos adversos esperados da terapia com ITCs (DRAELOS et al., 2019).

No ano de 2016 um novo fármaco inibidor de fosfodiesterase foi aprovado para uso em adultos e crianças maiores de 2 anos com quadro leve a moderado de dermatite atópica (KLEINMAN et al., 2022). Crisaborole é um medicamento capaz de reduzir a inflamação cutânea e o prurido associado à dermatite atópica através de mecanismos ainda não completamente elucidados (KLEINMAN et al., 2022; PAIVA-SANTOS et al., 2022; DRAELOS et al., 2019). Existem evidências de que pacientes atópicos possuem elevada atividade de fosfodiesterase leucocitária, impactando na liberação de histamina e citocinas (KLEINMAN et al., 2022).

Outras vias de interesse, como a da ativação da proteína Janus-quinase, foram identificadas como participantes no desenvolvimento da DA (KLEINMAN et al., 2022; PAIVA-SANTOS et al., 2022). Um número de citocinas, como as interleucinas IL-4, -5, -13, -31, -22 e a linfopoietina tímica ativam a via da proteína ativadora de transcrição JAKSTAT para recrutamento celular, envolvendo ceratinócitos, células imunes e fibras sensoriais periféricas na propagação da inflamação e do prurido. No quadro de dermatite atópica, essa via de sinalização é superativada. Ruxolitinib, brepocitinib, delgocitinib e jaktinib estão entre os medicamentos aprovados ou em fase de testes clínicos que atuam sobre esta via (KLEINMAN et al., 2022).

O sistema imune inato desempenha importante papel nas fases iniciais do desenvolvimento de DA. Tapinarof é um medicamento que consiste de uma molécula

moduladora de receptores hidrocarboneto em estudo para o tratamento de psoríase e DA, cujo mecanismo de ação parece ser através da inibição da sinalização de IL-4 e IL-13, além de aumentar a expressão de FLG, loricrina e involucrina, proteínas associadas à integridade da barreira cutânea (KLEINMAN et al., 2022).

Outros estudos têm identificado a participação da microbiota da pele na patogênese da DA (KLEINMAN et al., 2022; AMBROZEJ et al., 2021). Neste cenário, microrganismos atuam como moduladores das respostas imunes inata e adaptativa, e em pacientes atópicos essa microbiota é menos diversificada e possui menor proporção de microrganismos comensais benéficos, além de maior colonização por *Staphylococcus aureus* (KLEINMAN et al., 2022). Microrganismos patogênicos, como *S. aureus*, *Candida* e *Trichophyton* contribuem para respostas alérgicas sistêmicas nos indivíduos atópicos ao sinalizarem para o desenvolvimento de inflamação local (AMBROZEJ et al., 2021). A maioria dos indivíduos atópicos apresentam colonização positiva para *S. aureus* (KLEINMAN et al., 2022; AMBROZEJ et al., 2021). No entanto, antibióticos tópicos não apresentam ação benéfica e seu uso não é recomendado em nenhuma diretriz de tratamento atualmente. A diversidade da microbiota parece estar relacionada com a severidade da doença (KLEINMAN et al., 2022).

Um estudo clínico prospectivo preliminar avaliou o uso de um spray veterinário contendo lactobacilos mortos por calor (*L. rhamnosus* e *L. reuteri*) como terapia adjuvante para cães atópicos. Os autores observaram redução no escore clínico e no nível de prurido dos animais, mesmo após 2 semanas da interrupção do uso do produto (SANTORO et al., 2020). Agentes terapêuticos tópicos que consistem em cepas de bactérias comensais benéficas estão em estudo pré-clínico ou em modelos animais com o objetivo de suprimir o desenvolvimento de *S. aureus* na pele de indivíduos com DA (KLEINMAN et al., 2022).

Antioxidantes também vem sendo utilizados como alvo terapêutico dentro das estratégias de manutenção de pacientes atópicos. Fatores exógenos como poluição e radiação solar, além de outros processos fisiológicos normais, podem aumentar a concentração de radicais livres e seu acúmulo pode, eventualmente, exceder a capacidade do sistema de defesa antioxidante do organismo. Essa condição define o estresse oxidativo, e é sugerido que desempenhe um papel importante no desenvolvimento patogênico do quadro de DA (BERTINO et al., 2020). Um estudo duplo-cego unilateral com controle placebo investigou o tratamento da dermatite atópica com emprego de um extrato antioxidante composto de *Brassica*

olerace, *Malus domestica* e *Camellia sinensis* sobre a sinalização inflamatória e promoção de barreira cutânea em ensaio com ceratinócitos humanos e no tratamento de pacientes diagnosticados com dermatite atópica, concluindo que o extrato foi capaz de reduzir a expressão de citocinas inflamatórias e melhorar a expressão de moléculas ligadas à manutenção da barreira cutânea em ceratinócitos humanos. O uso de uma formulação contendo o mesmo extrato reduziu os sintomas clínicos de pacientes diagnosticados com DA leve a moderada como prurido, escore de dermatite local e melhorando a função de barreira e hidratação cutânea (ZHANG et al., 2022).

A maioria dos estudos observa sinais moleculares que demonstram o aumento de reações de oxidação e de danos oxidativos e uma redução no potencial antioxidante do organismo. Isso é esperado em se tratando de uma doença de extenso caráter inflamatório crônico. Em concordância com estes achados, os poucos estudos que avaliaram os efeitos de tratamentos voltados para a DA sobre o estresse oxidativo reportaram que a melhora clínica acompanha uma redução nas alterações de biomarcadores relacionados a essa condição, e que a administração de certos níveis de alguns antioxidantes pode reduzir o risco da doença (BERTINO et al., 2020).

Quando da abordagem clínica, a manutenção da barreira epidérmica deve sempre ser objetivada (ELIAS et al., 2019). Terapias tópicas não-esteroidais para regiões delimitadas que desencadeiem efeitos sistêmicos mínimos podem controlar a doença sem oferecer os riscos de atrofia, telangiectasia, estrias, ou dermatite perioral que estão associados ao uso de CTs (KLEINMAN et al., 2022). Isso é particularmente importante visto que os agentes utilizados como supressores da inflamação são frequentemente contraindicados para crianças ou pacientes com doenças relativamente limitantes (ELIAS et al., 2019).

É recomendado pela Academia Europeia de Dermatologia e Doenças Venéreas o uso regular de emolientes para a manutenção da barreira cutânea, alívio dos sintomas e abrandamento da irritação (DRAELOS et al., 2019). Esta abordagem tem coerência sob a ótica de que a hidratação continuada pode ajudar na redução da necessidade do uso de esteroides tópicos para controle da dermatite atópica (ELIAS et al., 2019). A primeira linha desta terapêutica é constituída de hidratantes e emolientes (DRAELOS et al., 2019), sendo a principal ferramenta terapêutica auxiliar no tratamento anti-inflamatório de doenças da pele (PAIVA-SANTOS et al., 2022; ELIAS et al., 2019).

Estudos com animais sugerem que o uso de hidratantes de forma isolada pode, por si só, reduzir a produção de citocinas ao promover a restituição da hidratação cutânea, reduzindo a hipertrofia e a degranulação de mastócitos, além da hiperplasia da epiderme (ELIAS et al., 2019).

Seu uso pode atenuar o desenvolvimento da chamada “marcha atópica” característica de indivíduos portadores de atopia, mas nem todos os hidratantes são recomendados para este tratamento (HEBERT et al., 2020; ELIAS et al., 2019). Alguns produtos podem agravar o quadro, piorando o estado disfuncional do epitélio e promovendo sensibilidade e inflamações (DRAELOS et al., 2019; ELIAS et al., 2019). Por outro lado, terapias reparadoras de barreira através do uso de lipídeos fisiológicos, quando em proporções corretas e contemplando os três principais lipídeos que compõem o extrato córneo, podem melhorar a funcionalidade da barreira cutânea e reduzir o quadro inflamatório (ELIAS et al., 2019).

Hidratantes oclusivos são como produtos que contém substância com poder oclusivo da superfície da pele, como petrolato ou lanolina, formando uma camada hidrofóbica que impede de forma bidirecional que a água atravesse a barreira cutânea. Ao impedir a perda de água tecidual, promovem uma melhora temporária no quadro de xerose característico da dermatite atópica e de desordens eczematosas relacionadas à idade (ELIAS et al., 2019). A melhora na hidratação do extrato córneo é capaz de atenuar a inflamação (DRAELOS et al., 2019; ELIAS et al., 2018), mas, no entanto, o uso exclusivo de hidratantes oclusivos não é capaz de contemplar as alterações bioquímicas que culminam no desenvolvimento da atopia (HEBERT et al., 2020; ELIAS et al., 2019).

É importante observar também que toda formulação de uso tópico com este objetivo deve ter seu pH ajustado para valores menores que 5, com objetivo de compensar o aumento de pH da região inflamada. A redução do pH promove, por si só, benefícios que incluem a redução do quadro inflamatório, melhora da permeabilidade da barreira e da coesão celular do SC, bem como da defesa contra microrganismos (ELIAS et al., 2019).

Estes produtos hidratantes vem sendo cada vez mais comumente acrescidos de outros compostos vegetais benéficos. Alguns óleos vegetais, como o óleo de girassol, de milho e cártamo são ricos em ácidos graxos essenciais e/ou ácido linoleico. Estes óleos podem promover a melhora da função de barreira, promover benefício nutricionais e reduzir a inflamação. A camomila, por exemplo, contém

substâncias anti-inflamatórias como a flavona apigenina, capaz de atenuar os sintomas da dermatite atópica (ELIAS et al., 2019).

Os lipídeos de aplicação tópica são absorvidos rapidamente pelas camadas mais profundas de células nucleadas e não são capazes de formar uma camada de superfície ocludente. Uma vez nestas células, são incorporados a novos corpos lamelares em formação nos estratos granuloso e espinhoso. Estudos demonstram que os três compostos lipídicos essenciais devem estar presentes de forma balanceada para que a ação hidratante seja benéfica. A inclusão de ceramidas nas formulações hidratantes, quando realizada de forma isolada, pode piorar o comprometimento da barreira cutânea ao invés de promover benefícios (ELIAS et al., 2019).

Nos Estados Unidos da América, a organização Food and Drug Administration (FDA) postula que produtos hidratantes com finalidade terapêutica sobre a DA devem conter, obrigatoriamente, aveia coloidal em sua composição. A aveia coloidal contém em sua composição uma série de compostos ativos dermatológicos que ajudam a manter a hidratação e melhorar a função protetora da pele, possuindo capacidades anti-inflamatória, antioxidante, antipruriginosa e oclusiva, sendo capaz de exercer alívio local (HEBERT et al., 2020).

Outros trabalhos identificaram o potencial do uso de produtos naturais como ferramenta na abordagem da dermatite atópica por diferentes mecanismos de ação, que perpassam a supressão da condição inflamatória, a indução de apoptose e até a prevenção de infecções associadas. Neste sentido, folhas da espécie *Coffea arabica* (Rubiaceae) exibiram forte atividade antioxidante associada ao alívio dos sintomas de dermatite atópica, melhorando a resposta inflamatória de ceratinócitos humanos (CHANG et al., 2023). A orquídea *Dendrobium nobile* Lindley, amplamente utilizada na medicina tradicional coreana, demonstrou efeitos anti-inflamatórios sobre características patológicas e histológicas de lesões análogas à DA induzidas em camundongos BALB/c, com inibição de citocinas inflamatórias e redução da expressão de IL-6, dos níveis de IgE, da presença de infiltrado inflamatório e da espessura da derme e epiderme dos animais tratados (HONG et al., 2022). Um produto desenvolvido contendo como ativo o extrato obtido a partir da Anacardiaceae *Mangifera indica*, popularmente conhecida como manga, demonstrou ação sobre lesões de pele atópica reduzindo marcadores inflamatórios como IL-6, TNF- α , e IL-1 β e de atividade de células como CD68, enquanto uma formulação gel contendo

naringenina, outro composto natural bioativo, foi reportada com ação na redução do infiltrado inflamatório e espessamento da epiderme pele (DAS et al., 2022).

Até o ano de 2022, mais de 40 estudos para desenvolvimento de novos tratamentos tópicos visando o controle da doença estavam em condução (KLEINMAN et al., 2022). O principal objetivo do desenvolvimento de alternativas terapêuticas é o controle da inflamação e do prurido, promovendo melhora da função da barreira cutânea e redução dos efeitos adversos reportados em relação ao uso de CTs e ITCs (KLEINMAN et al., 2022; AMBROZEJ et al., 2021; ELIAS et al., 2019).

1.1.9 MASTÓCITOS

Os mastócitos são células imunes que emergem da medula óssea como basófilos e permanecem na circulação sanguínea até sofrerem maturação, que ocorre quando atravessam capilares terminais e se estabelecem em tecidos específicos (ATIAKSHIN et al., 2020; WANG et al., 2020; YANG et al., 2018; CASTRO et al., 2017), formando populações órgão-específicas em praticamente todo o corpo (ATIAKSHIN et al., 2020).

São encontrados dentre as células residentes de vários tecidos, particularmente observados em topografia perineural ou perivascular (incluindo tanto vasos sanguíneos quanto linfáticos) e em regiões que fazem interface com o meio externo. Na pele, podem compor até 10% da população de células imunocompetentes (ATIAKSHIN et al., 2020). Quando atingem a maturação celular, podem ser identificados histologicamente pela habilidade de ligação de seus grânulos intracelulares com corantes catiônicos como o azul de toluidina, demonstrando propriedades de heterocromasia (ATIAKSHIN et al., 2020; YANG et al., 2018; CASTRO et al., 2017).

Sua migração acontece por quimiotaxia ou estimulação mecânica (ATIAKSHIN et al., 2020; YANG et al., 2018). Interações entre essas células e componentes da matriz extracelular parecem ter importância no processo de migração e distribuição nos tecidos (WANG et al., 2020; YANG et al., 2020; YANG et al., 2018; CASTRO et al., 2017) onde desempenham importante papel na regulação na homeostase, sendo considerados promissores objetos de estudo da regulação homeostática da matriz intercelular (ATIAKSHIN et al., 2020; WANG et al., 2020).

As características funcionais dos mastócitos permitem com que eles atuem como indutores e reguladores de funções básicas como a homeostase do microambiente tecidual, ativação da imunidade inata ou adaptativa, desencadeamento e desenvolvimento de reações alérgicas e inflamatórias, angiogênese, cicatrização, proliferação celular e outros processos fisiológicos. Desempenham ainda importante papel na secreção de componentes como proteases e proteoglicanos que participam direta e indiretamente da remodelação da matriz intersticial (ATIAKSHIN et al., 2020; YANG et al., 2018; CASTRO et al., 2017). Estudos têm notado o aumento do número de mastócitos quando há o desenvolvimento de fibrose, o que tem servido como evidência indireta para que a população mastocitária seja frequentemente associada com alterações na densidade tecidual através da indução de colagênese e manutenção de estágios da fibrinogênese, incluindo sua participação em processos patológicos que apresentam excessiva formação de componentes da matriz (ATIAKSHIN et al., 2020). O aumento da degranulação de mastócitos durante a cicatrização por segunda intenção pode estar relacionado com a persistência da fase aguda pela manutenção da quimiotaxia neste período. A inibição da degranulação mastocitária está associada a uma redução no tempo de cicatrização (CASTRO et al., 2017).

Atiakshin et al. (2020) foram capazes de demonstrar a evidência morfológica da co-localização de mastócitos e fibroblastos, o que pode ser um critério estrutural do efeito regulatório dos mastócitos sobre a biogênese de colágeno e outras proteínas intercelulares provenientes da atividade transcricional de fibroblastos e miofibroblastos. Esta interação pode ser observada especialmente em condições de regeneração tecidual em superfícies epiteliais (ATIAKSHIN et al., 2020).

Durante o processo de colagênese da fase de remodelação tecidual, moléculas de colágeno deixam o citoplasma do fibroblasto formando aglomerados de topografia pericelular. Nestas regiões, as moléculas permanecem em arranjos paralelos, separadas por moléculas de água. Um aumento do pH aumenta as interações hidrofóbicas culminando na formação de microfibrilas sem alterar a orientação molecular inicial (ATIAKSHIN et al., 2020).

A localização próxima de mastócitos pode estar envolvida com a participação de proteoglicanos mastocitários na alongação e espessamento das fibrilas de colágeno. A degranulação destes pode desencadear a sinalização molecular daquele microlocus, e os grânulos provenientes podem agir como

nucleadores para iniciar a polimerização de moléculas de colágeno no processo de fibrinogênese (ATIAKSHIN et al., 2020).

Proteínas de superfície presentes na membrana de fibroblastos são responsáveis por mediar sua interação com mastócitos. A ligação entre as duas células desencadeia a ativação de ambas em sequência e degranulação mastocitária como resposta imediata. Uma vez degranulado, o mastócito disponibiliza substâncias ativadoras de fibroblastos como histamina, triptase, quimase, interleucinas e TGF- β . Em sequência ocorre a produção de IL-4 e -13 pelos mastócitos ativados, induzindo a proliferação dos fibroblastos (ATIAKSHIN et al., 2020).

Estas células também têm sido correlacionadas como mediadores chave no desencadeamento de respostas IgE mediadas em casos de hipersensibilidade e alergias (WANG et al., 2020). Em indivíduos com DA, as células mastocitárias são encontradas em maior número e também em topografia alterada, podendo ser observados em grande proximidade com a epiderme e até mesmo infiltrados nessa camada. Também podem ser encontrados em degranulação em feixes nervosos quem contêm substância P (YANG et al., 2020).

A ativação de mastócitos por IgE desencadeia a liberação de vários tipos de mediadores químicos, que resulta no recrutamento de células imunes para a pele. Citocinas liberadas por linfócitos Th2, como IL-4 e IL-13 são responsáveis também por desencadear a síntese de IgE e a ativação de células T CD4+ em novos linfócitos Th2. Estas interleucinas foram encontradas aumentadas nos níveis séricos e na pele da maioria dos pacientes com dermatite atópica (WANG et al., 2020).

Os mastócitos da pele também produzem IL-31, que age como agente pruritogênico e sensibiliza fibras nervosas, podendo induzir seu alongamento (WANG et al., 2020; YANG et al., 2020). Em indivíduos atópicos, os mastócitos liberam preferencialmente triptase em lugar de histamina. A triptase mastocitária cliva e ativa seu receptor ativado por protease (PAR-2), cuja expressão acontece em nervos sensoriais primários e ceratinócitos. Isso implica no envolvimento aumentado da via de ativação triptase/PAR-2 na pele de indivíduos atópicos (WANG et al., 2020).

Há evidências de que os mastócitos e células neurais formem unidades operacionais (WANG et al., 2020; YANG et al., 2020). Segundo alguns autores, a proximidade topográfica destas células em várias alterações epiteliais encontradas em pacientes com DA sugeriu uma intensa comunicação, principalmente em comparação com a pele de indivíduos saudáveis (YANG et al., 2020). As associações

entre mastócitos e fibras neurais são predominantemente positivas para substância P. Este mediador é capaz de ativar os mastócitos através do receptor NK1, e a liberação de TNF- α promove a estimulação de terminais neurais. Esses achados demonstram que o prurido característico da DA está direta e indiretamente relacionado com a atividade mastocitária nestes indivíduos (WANG et al., 2020).

1.2 O MODELO ANIMAL

Baseado em estudos prévios, Back et al. (2012) foram capazes de desenvolver um modelo animal de indução de dermatite atópica a partir da administração de capsaicina em ratos neonatos. Em estudos anteriores e em conformidade com outros pesquisadores, os autores observaram que a aplicação subcutânea neonatal de capsaicina induz o aparecimento de lesões cutâneas duradouras e ocasionalmente recorrentes na região dorsal dos animais tratados, de desenvolvimento relacionado a respostas comportamentais de prurido e a um quadro complexo que associa a disrupção cutânea à alteração da natureza da resposta imune, desordens neurológicas e dermatológicas (BACK et al., 2012).

No modelo descrito, uma aplicação subcutânea de capsaicina é realizada dentro das primeiras 48 horas de vida de ratos machos. Esta aplicação é responsável por desencadear o aparecimento de lesões cutâneas histopatológica e imunologicamente semelhantes às aquelas observadas em pacientes com dermatite atópica, envolvendo o aumento persistente do número de mastócitos infiltrados na derme, dos níveis de IgE sérica e da expressão de IL-4. O aparecimento dos sinais clínicos se dá a partir da terceira semana de vida, após o desmame dos animais. O aumento dos níveis de IL-4 pode ser observado a partir da primeira semana após o tratamento com capsaicina, enquanto o aumento de IL-13 ocorre mais tardiamente, sugerindo que o desenvolvimento da dermatite atópica induzida pela aplicação de capsaicina seja dependente de IL-4 (BACK et al., 2012).

A aplicação neonatal de capsaicina também induz à disrupção da barreira cutânea, manifestada por hiperplasia epitelial e deficiência de proteínas estruturais. Análises de imunorreatividade para FLG mostram a expressão gênica para esta proteína completamente abolida antes e depois do aparecimento das lesões, o que mimetiza a mutação no gene FLG observada em alguns pacientes de DA. A completa inibição da imunorreatividade para esta proteína neste modelo parece ser responsável

pelo aumento da perda de água transepidérmica e da consequente redução da hidratação cutânea observadas nos animais induzidos (BACK et al., 2012).

Posteriormente, Kim et al. (2019) observaram que o processamento proteolítico de FLG e corneodesmosina sofre alterações quando da aplicação de capsaicina. O processamento de profilagrina e corneodesmosina envolve uma série de enzimas proteases cuja funcionalidade apropriada também é necessária (YSHIDA-YAMAMOTO & IGAWA, 2014). O tratamento neonatal com capsaicina é capaz de promover a desregulação de proteases epidérmicas como a matriptase e as KLKs, o que altera a proteólise das proteínas estruturais FLG e corneodesmosina de forma modulada pelo estado de maturação do tecido epidérmico que ocorre após o nascimento (KIM et. al, 2019), e este processo proteolítico alterado parece ser o responsável pelo desenvolvimento das alterações cutâneas. Como se pode observar na Figura 6 a seguir, o estudo imuno-histoquímico para identificação de FLG demonstra ausência desta proteína nas idades de 3 e 6 semanas de vida na pele não-lesional dos animais tratados com capsaicina quando neonatos, em comparação com animais tratados apenas com veículo (BACK et al., 2012).

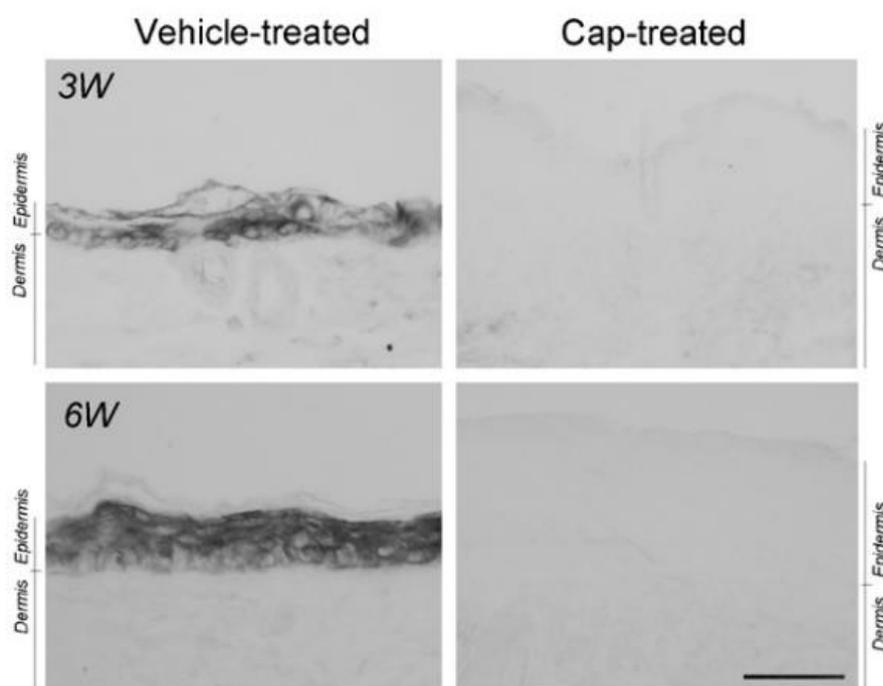


Figura 6. Avaliação imuno-histoquímica para filagrina em animais não-induzidos (Vehicle-treated) e induzidos (Cap-treated) com aplicação neonatal de capsaicina.

Os numerals seguidos de "W" representam as semanas de vida.

Fonte: Back et al., 2012

De forma concomitante, a perda de função da barreira epidérmica também pode ser resultante da perda de fibras peptidérgicas. É possível que a inflamação neurogênica causada pela liberação de neuropeptídeos após a aplicação de capsaicina esteja relacionada com a redução expressiva e aparentemente irreversível no número de fibras nervosas periféricas dos animais tratados (BACK et al., 2012).

Este modelo animal também apresenta elevados níveis de fator de crescimento neural (NGF) na pele (BACK et al., 2012). Este peptídeo é um importante mediador de reparação e manutenção de fibras periféricas responsáveis pela inervação cutânea. Outros autores sugerem que haja participação de NGF no desenvolvimento da DA, demonstrando correlação entre o aumento da inervação cutânea e dos níveis de séricos e tópicos de NGF com a severidade dos sintomas (YAMAGUCHI et al., 2009).

A combinação destas alterações configura uma alteração da barreira cutânea que aumenta os riscos de exposição a alérgenos e patógenos e precede o desenvolvimento clínico da dermatite neste modelo. Analogamente, os animais tratados com capsaicina apresentam infecção por microrganismos patogênicos como *S. aureus*, independentemente da presença de sinais clínicos (BACK et al., 2012).

A pele do rato

A pele do rato não possui diferenças significativas em relação à sua funcionalidade quando comparada com a pele humana. É similarmente estruturada em camadas celulares de origem mesodérmica e ectodérmica. Possui sistemas enzimáticos similares, embora não compartilhe de todas as enzimas que a espécie humana possui, e algumas apresentem atividade diferente, o que requer cuidado na interpretação de resultados bioquímicos quando utilizada como modelo de estudo de doenças cutâneas (NICZYPORUK, 2018).

Algumas diferenças chamam a atenção quando comparamos as duas espécies. No rato, há uma estrutura fibrosa ausente na pele humana localizada na camada mais profunda do tecido subcutâneo, formada por pequenos feixes de colágeno suspensos em tecido conectivo permeado por vênulas e nervos, de consistência mucosa, que recebe o nome de estrato fibroso. Outra camada inexistente na pele humana é o panículo carnososo, uma camada muscular localizada abaixo do estrato adiposo. Este último, no rato, não possui limite bem definidos, e sua estrutura

é mais frouxa que a derme (NICZYPORUK, 2018).

Outra diferença pode ser notada em relação à produção de pigmento, que acontece próximo ao bulbo do pelo e não na camada basal da epiderme, como em seres humanos. O estrato espinhoso, bem demarcado na pele humana, não é tão evidente na epiderme do rato. As células dessa região têm forma poligonal e se aderem umas às outras formando um padrão frouxo, distantes entre si. Em relação à epiderme, o rato possui um estrato granuloso claramente definido, que acompanha toda a superfície da pele (NICZYPORUK, 2018).

Localização das lesões

Considerações especiais foram feitas nos trabalhos que descrevem este modelo a respeito da localização das lesões nos animais submetidos ao tratamento com capsaicina. Segundo Carrillo et al. (1998), as lesões se distribuem seletivamente em regiões amplamente inervadas e vascularizadas da cabeça e pescoço. Os locais mais acometidos pelas lesões são de inervação do nervo trigêmeo, que contém expressivo número de fibras sensíveis à capsaicina (CARRILLO et al., 1998; KIM et al., 2019). Thomas et al. (1994) também consideram o fato de que o sistema nervoso associado à face tende a amadurecer primeiro que outras regiões sensoriais, o que pode ajudar a proteger as porções caudais do animal dos efeitos neurotóxicos da aplicação de capsaicina (KIM et al., 2019). O acesso às regiões de face e pescoço pelas patas dianteiras para manifestação do comportamento de se coçar também pode estar relacionado com a localização rostral das lesões (BACK et al., 2012).

A aplicação subcutânea de capsaicina em ratos neonatos desencadeia manifestações cutâneas após o início da maturação epidérmica. A especulação sobre o modelo de dermatite atópica induzido por capsaicina pode se justificar, em parte, pelo atraso do aparecimento dos sinais clínicos, que ocorre diferentemente dos efeitos imediatos do uso de capsaicina como alternativa de tratamento de dermatite atópica. Estudos sobre este modelo animal objetivaram elucidar este fato sob diversos aspectos (KIM et al., 2019).

Neonatos são indivíduos estrutural e funcionalmente imaturos, e é comum nos mamíferos que alguns órgãos continuem seu desenvolvimento após o nascimento, principalmente durante o primeiro ano de vida. Estímulos que ocorrem no período pós-natal exercem influência sobre a maturação destes tecidos e sistemas,

podendo causar alterações prejudiciais e aumentar a susceptibilidade do indivíduo a diferentes doenças. Tanto o sistema nervoso quanto o tecido epidérmico dos neonatos sofrem maturação após o nascimento. Isto parece ser relevante na resposta à aplicação subcutânea de capsaicina, uma vez que os efeitos observados são mais proeminentes em animais tratados quando neonatos (KIM et al., 2019).

Durante este período, as zonas de pele glabra e pilosa sofrem intenso desenvolvimento em conjunto com suas respectivas estruturas anexas, como glândulas sebáceas, músculos piloerectores e folículos pilosos (CARRILLO et al., 1998; KIM et al., 2019). Este crescimento está condicionado a uma série de fatores, como a disponibilidade nutricional, ação hormonal e de fatores de crescimento, inervação sensorial e autônoma. É possível que a neurotoxicidade sobre as fibras neurais periféricas sensíveis à capsaicina seja compensada pela imaturidade dessas estruturas (CARRILLO et al., 1998).

O sistema nervoso do animal neonato pode não ser maduro o suficiente para identificar ou mesmo responder aos estímulos pruritogênicos com um comportamento intenso de se coçar. Alternativamente, este comportamento pode depender da reorganização do sistema nervoso após o efeito neurotóxico causado pela capsaicina, o que pode explicar o intervalo entre a aplicação do fármaco e o desenvolvimento das lesões enquanto esta reorganização se estabelece (CARRILLO et al., 1998; KIM et al., 2019). Durante o período de desenvolvimento pós-natal das estruturas que compõem o sistema tegumentar, a proporção de células neurais que expressam os receptores TRPV1 na raiz dorsal ganglionar sofre aumento até os 20 dias de vida em um rato neonato (KIM et al., 2019).

Apesar do período refratário que antecede o aparecimento das lesões nos animais tratados com capsaicina enquanto neonatos, que dura aproximadamente da 3ª à 4ª semana de vida, outras alterações observadas neste período sugerem que o desequilíbrio do tecido tegumentar promovido pela disfunção das células sensíveis à capsaicina que expressam o receptor TRPV1 é seguido de eventos compensatórios que promovem o desenvolvimento dos sintomas observados (BACK et al., 2012).

Outro alvo de especulação que pode ser responsável pela manifestação tardia das lesões foi proposto por Kim et al. (2019). Os autores especulam que a aplicação de capsaicina tenha efeito sobre um fator intrínseco da epiderme, possivelmente o receptor ligado à proteína G Lgr6 responsável pelo desenvolvimento epidérmico pós-natal (KIM et al., 2019). O receptor Lgr6 é uma proteína receptora

acoplada à proteína G contendo repetições ricas em leucina. Durante a maturação do tecido cutâneo pós-natal ocorre a expressão deste receptor, que é tido como um marcador de células-tronco adultas responsáveis pela renovação de estruturas como glândulas sebáceas. Sua expressão se distribui pela epiderme de neonatos e concentra-se no istmo de folículos pilosos em aproximadamente 2 semanas após o nascimento. Em ratos adultos, as células expressoras de Lgr6 podem se diferenciar em qualquer componente cutâneo, incluindo folículos pilosos. A aplicação de capsaicina desencadeia expressão persistente de receptores ligados à proteína G Lgr6 na epiderme interfolicular por até 6 semanas pós-natais. Ratos não tratados com capsaicina tem esta expressão reduzida a partir da 3ª semana, o que sugere uma alteração no desenvolvimento epidérmico causada pela capsaicina (KIM et al., 2019).

Animais mais velhos tratados com capsaicina de forma subcutânea apresentam sintomatologia mais rápida, porém menos intensa e duradoura, de forma inversamente proporcional à idade de tratamento. A proteólise de corneodesmosina também segue este padrão (KIM et al., 2019).

Além destes fatores, é interessante pontuar que o comportamento natural da espécie demonstra que os hábitos de autolimpeza e de arranhadura se exacerbam naturalmente quando estes animais atingem a maturidade, o que também poderia estar relacionado com desenvolvimento tardio das lesões (CARRILLO et al., 1998).

1.2.1 CAPSAICINA: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ESTRUTURA MOLECULAR, ORIGEM E ANÁLOGOS

Capsaicina (8-metil-N-vanilil-1,6-nonamida) é um alcaloide cristalino, lipofílico e desprovido de cor ou aroma, que caracteriza o composto primário e mais abundante do grupo dos capsaicinoides, uma família de compostos que possuem semelhanças estruturais e biológicas, responsáveis pela pungência e sabor das frutas das plantas do gênero *Capsicum* (FATTORI et al., 2016; REYES-ESCOGIDO et al., 2011; NELSON e DAWSON, 1923).

Foi descrita em 1919 (NELSON, 1919) após ter sido cristalizada pela primeira vez em 1876, quando foi nomeada (THRESH, 1876). Sua fórmula molecular é $C_{18}H_{27}NO_3$, disposta em um anel aromático e uma cadeia hidrofóbica unidos por uma ligação amida (FATTORI et al., 2016; REYES-ESCOGIDO et al., 2011). São conhecidos mais de vinte capsaicinoides, sendo todos eles uma amida formada pela

condensação de ácidos graxos e vanililamina (REYES-ESCOGIDO et al., 2011). A capsaicina corresponde a aproximadamente 80% dos capsaicinoides presentes nas pimentas, dos quais é o composto mais potente (FATTORI et al., 2016).

Enquanto a região do anel de benzeno é a responsável pela atividade e pungência comum a todos os capsaicinoides, o número de cadeias laterais de carbono e a presença ou não de insaturações caracterizam os diferentes compostos deste grupo, que são naturalmente biossintetizados através da reação enzimática de uma capsaicina sintase (REYES-ESCOGIDO et al., 2011). No fruto, se encontram principalmente ao redor do tecido placentário, o que está diretamente relacionado às suas funções biológicas ligadas à germinação das sementes e proteção contra parasitas (FATTORI et al., 2016).

Devido à sua estrutura fenólica apolar, estes compostos são insolúveis em água. Para extrair e manter as propriedades da capsaicina é necessário a preparação em solventes apolares como éter ou benzeno, além de também ser solubilizada em etanol (FATTORI et al., 2016; REYES-ESCOGIDO et al., 2011).

1.2.2 APLICAÇÃO FARMACOLÓGICA

Embora a utilização das propriedades da capsaicina seja relatada na medicina popular no tratamento de doenças infecciosas, alívio da dor e conservação de alimentos (FATTORI et al., 2016; VELOSO, 2014), os estudos científicos a respeito de suas atividades se intensificaram apenas no final do século passado (REYES-ESCOGIDO et al., 2011).

Vários estudos têm demonstrado que o grupo dos capsaicinoides, em particular a capsaicina, exerce ação seletiva sobre canais TRPV1 mediando respostas nervosas GABAérgicas e glutamatérgicas (FERREIRA et al., 2020; ZHANG et al., 2020), além de promover respostas celulares a partir da sua interação com biomembranas (FERREIRA et al., 2020; HANSON et al., 2015). Está relacionada à efeitos anticancerígenos (FERREIRA et al., 2020; WEBER et al., 2016), hipertensivos, hiperalgesia inflamatória, regulação da homeostase de glucose (FERREIRA et al., 2020), no tratamento de síndromes dolorosas e dores neuropáticas (FERREIRA et al., 2020; FATTORI et al., 2016; CABEZON-GUTIERREZ et al., 2020), atuante na redução da acumulação lipídica, estimulante do metabolismo energético e antiobesogênico (WANG et al., 2020; FATTORI et al., 2016).

Apesar de apresentar efeito irritante quando aplicada sobre a pele, a capsaicina também é empregada com o objetivo de promover nocicepção em condições de dor neuropática (FATTORI et al., 2016). Esta molécula e seus análogos são utilizados em formulações tópicas para tratamento de síndromes dolorosas relacionadas à osteoartrite e artrite reumatoide, neuropatia diabética, neuralgia pós-herpética e quadros de dor musculoesquelética (REYES-ESCOGIDO et al., 2011).

Estudos clínicos em humanos apontaram que sua absorção é rápida quando administrada topicamente, possuindo meia vida aproximada de 24 horas (REYES-ESCOGIDO et al., 2011). Estudos *in vitro* realizados com pele humana demonstraram que a biotransformação da molécula ocorre de forma lenta e apenas uma pequena fração é metabolizada em vanililamina e ácido vanílico (CHANDA et al., 2008; REYES-ESCOGIDO et al., 2011).

Uma avaliação farmacocinética demonstrou 94% de absorção quando administrada via oral, atingindo concentração máxima no sangue, fígado, rins e intestinos após 1 hora de administração e sendo indetectável após 4 dias (REYES-ESCOGIDO et al., 2011). Seu metabolismo ocorre via hepática e é aparentemente similar no cão, no rato e em seres humanos, com a formação de três metabólitos identificados: 16-hidroxycapsaicina, 17-hidroxycapsaicina e 16,17-hidroxycapsaicina (CHANDA et al., 2008). Sua excreção ocorre principalmente via renal, enquanto uma pequena fração de moléculas não metabolizadas também é excretada nas fezes (CHANDA et al., 2008; REYES-ESCOGIDO et al., 2011).

1.2.3 MECANISMO DE AÇÃO

Via canal receptor de potencial transitório vaniloide subtipo 1 (TRPV1)

A capsaicina se liga seletivamente a um receptor de membrana celular presente em uma importante população de nervos sensoriais aferentes, inicialmente chamadas de “fibras aferentes sensíveis à capsaicina” (ELOKELY et al., 2016). Estes receptores foram identificados e clonados por Caterina et al. (1997), e então chamados VR-1. Estudos posteriores identificaram a molécula receptora de ligação da capsaicina como sendo um canal receptor de potencial transitório vaniloide subtipo 1 (TRPV1). Os receptores TRPV1 estão associados a um canal de cátions que pode ser ativado por calor nocivo, prótons e compostos vaniloides como a capsaicina

(CATERINA et al., 1997; ELOKELY et al., 2016) ou seu ultra-potente agonista resiniferatoxina (RTX). Estes receptores também estão envolvidos em processos de hiperalgesia inflamatória (DAVIS et al., 2000).

A sensação dolorosa provocada pela capsaicina é um mecanismo TRPV1 dependente. Por este motivo e, de forma significativa, a capsaicina e seus análogos têm sido considerados uma importante ferramenta no estudo da fisiopatologia da dor e de síndromes dolorosas, possibilitando a expansão do entendimento sobre a complexidade das rotas de nocicepção (HANSON et al., 2015; ELOKELY et al., 2016; FATTORI et al., 2016).

Os canais receptores de potencial transitório (TRP) são um grande grupo de moléculas responsáveis pela detecção e transdução de estímulos sensoriais nociceptivos (ELOKELY et al., 2016). Também são envolvidos na regulação da homeostase iônica, pois atuam como canais de cátions não-seletivos, distribuídos em diversos tecidos onde são expressados nos terminais livres de fibras neurais nociceptivas e também na pele (ELOKELY et al., 2016). Nos mamíferos, são divididos em 6 subfamílias, cada qual ativada pela ligação com diferentes moléculas como mentol, cânfora, mostarda e capsaicina (HANSON et al., 2015; ELOKELY et al., 2016). Os receptores da subfamília dos vaniloides do tipo 1 (TRPV1) são expressos de forma abundante nos terminais livres de nervos sensoriais de fibras aferentes do tipo C e A δ , cuja estrutura é organizada simetricamente ao redor de um poro central (ELOKELY et al., 2016).

Os receptores TRPV1 estão envolvidos com o registro de sensações dolorosas e podem ser ativados via fosforilação de proteínas quinases em seu terminal-N (CATERINA et al., 1997), o que pode ser desencadeado por uma série de mediadores de algésia e inflamação: temperaturas acima de 43°C, acidificação do pH externo, alterações osmóticas extracelulares, mediadores endógenos como bradicinina e anandamida, metabólitos do ácido araquidônico, toxinas de aranhas e águas-vivas e a ligação com moléculas vaniloides, como o potente agonista resiniferatoxina e, de forma menos potente, a capsaicina (FERREIRA et al., 2020).

A ativação dos receptores pela capsaicina acontece através da ligação da sua região aromática (ou vaniloide) com o do receptor vaniloide (FATTORI et al., 2016; ELOKELY et al., 2016). Uma vez ativado, o TRPV1 promove um rápido influxo de cátions como Na⁺ e Ca²⁺. Subsequentemente, essa ativação modula a liberação de segundos mensageiros e altera a fisiologia de outras organelas intracelulares, como

mitocôndrias (FERREIRA et al., 2020). Por ser um canal iônico que está distribuído principalmente em células neurais, como fibras do nervo trigêmeo e na raiz dorsal de neurônios ganglionares (FATTORI et al., 2016), a ativação de canais TRPV1 pela capsaicina promove o aumento do influxo de íons nessas regiões, reduzindo seu limiar de ativação termossensorial (SHARMA et al., 2013), e ativa o centro de controle térmico central, o que é responsável pela sensação de calor experimentada após seu consumo (FERREIRA et al., 2020).

Receptores TRPV1 também estão amplamente expressados em ceratinócitos. Quando ativados, promovem a liberação de mediadores pró-inflamatórios no local (SHARMA et al., 2013). De modo interessante, aplicações repetidas de capsaicina resultam em degeneração de fibras autônomas, o que culmina na redução da sensação dolorosa (CABEZON-GUTIÉRREZ et al., 2020; SHARMA et al., 2013). Recentemente, estudos clínicos utilizando aplicações tópicas de capsaicina têm demonstrado seu potencial de ação no tratamento de estímulos dolorosos variados, em especial a dor neuropática (CABEZON-GUTIÉRREZ et al., 2020; FERREIRA et al., 2020). Além destes dados, outro estudo demonstrou que aplicações tópicas de capsaicina 0.025% exercem moderado efeito supressivo na liberação de histamina e substância P, bem como na redução de prurido mediado pela ativação de receptores via proteinase (SHARMA et al., 2013).

Aparentemente, a capsaicina desempenha sua ação analgésica através de uma cascata de eventos que culminam com a perda de função das fibras nociceptivas (SHARMA et al., 2013). Após sofrer ativação via capsaicina, o receptor TRPV1 entra em estado refratário prolongado, sofrendo dessensibilização e se tornando resistente a estímulos mecânicos, térmicos, algésicos e pró-inflamatórios (FATTORI et al., 2016; ELOKELY et al., 2016). A nível molecular, este estado é resultante do fechamento do canal de cálcio cuja conformação é cálcio-dependente, e desfosforilação via fosfatase (SHARMA et al., 2013).

Sob excitação, TRPV1 libera neuropeptídeos sensoriais em níveis dose-dependente de capsaicina. Após esse estado, um bloqueio no transporte de substância P e somatostatina nos neurônios sensoriais inibe a produção compensatória destes neuropeptídeos, que culmina com a depleção destes (FATTORI et al., 2016; SHARMA et al., 2013). De forma complementar, além do esgotamento de neuropeptídeos, esta perda de função parece envolver a perda de potencial de membrana, perda da capacidade de transporte de fatores neurais e uma retração

reversível de fibras nervosas terminais presentes na derme e epiderme (SHARMA et al., 2013). A inviabilização de neurônios aferentes causada pela estimulação de receptores TRPV1 promove alterações funcionais e fenotípicas em toda a estrutura neural a longo prazo (SHARMA et al., 2013).

Os mecanismos envolvidos na degeneração celular provocada pela capsaicina ainda não foram completamente elucidados. Estudos sugerem que ocorra indução de apoptose celular tanto via ativação da caspase 9 (SHARMA et al., 2013; FATTORI et al., 2016) quanto relacionada à alteração de permeabilidade da membrana mitocondrial (FERREIRA et al., 2020; SHARMA et al., 2013) e ao aumento de espécies reativas de oxigênio (FERREIRA et al., 2020).

O incremento de cálcio intracelular resultante da ativação dos canais TRPV1 parece resultar na perda de função mitocondrial. A alteração metabólica proveniente desta disfunção pode provocar alterações na estabilidade da membrana plasmática, causando o colapso do terminal nervoso (SHARMA et al., 2013). Já foi demonstrado que a capsaicina desencadeia neurotoxicidade em neurônios aferentes e seus prolongamentos nos terminais nervosos sensoriais, provocando excitação, dessensibilização e levando à destruição de fibras nervosas que prejudicam a nocicepção provocada por agentes químicos e a neurotransmissão sensorial de temperatura (FERREIRA et al., 2020; FATTORI et al., 2016; SHARMA et al., 2013).

Via interação com a membrana lipídica celular

O canal-receptor TRPV1 é uma proteína integral transmembrana capaz de ser ativado pela ligação com a capsaicina que é, por sua vez, uma molécula alcaloide lipofílica. Isto sugere que outras interações envolvendo membranas lipídicas possam mediar seus efeitos no organismo. Neste sentido, estudos demonstraram atividades relacionadas à capsaicina que ocorrem de maneira independente à ativação destes receptores (FERREIRA et al., 2020; HANSON et al., 2015).

Diferentes ensaios envolvendo métodos como calorimetria, difração de raios-X e espectroscopia demonstraram alterações na fluidez de membranas plasmáticas causadas pela capsaicina. Aparentemente a capsaicina ocupa o espaço entre as interfaces água-lipídeo, provocando uma alteração estrutural na biomembrana. (FERREIRA et al., 2020). Estudos biofísicos foram capazes de demonstrar efeitos como a formação de poros, alteração da temperatura de transição

de fase lipídica e aumento da fluidez da bicamada (HANSON et al., 2013). A nível molecular, a distribuição das moléculas de capsaicina na bicamada lipídica se dá alinhando os grupos aromáticos da molécula aos grupos carbonila dos lipídeos (HANSON et al., 2013; DAVIS et al., 2000).

Foi demonstrado que a elevação dos níveis de cálcio intracelular promovida pela capsaicina ocorre através da mobilização de reservatórios intracelulares e de forma independente da concentração de cálcio extracelular e da ativação de canais TRPV1. A capsaicina também possui ação na cadeia respiratória. Isso se dá a partir da ligação com complexos presentes na membrana mitocondrial, bloqueando o transporte de elétrons, aumentando a permeabilidade e alterando o potencial de membrana das mitocôndrias, além de induzir a translocação de proteínas proibitinas da membrana para o núcleo destas organelas (FERREIRA et al., 2020).

Uma série de outros estudos demonstram o efeito citotóxico mediado pela sua interação com mitocôndrias, envolvendo o aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), indução à apoptose via citocromo C, ativação de caspases e clivagem de poli-ADP-ribose polimerase (PARP), redução dos níveis de glutathione e da expressão dos genes Bcl-2, que regulam a permeabilidade da membrana mitocondrial externa e podem desempenhar função pró- ou antiapoptótica (FERREIRA et al., 2020). De forma complementar, Skrzypski et al. (2014) relatam a redução dos níveis de ROS, sendo sua formação independente do efeito citotóxico da capsaicina, mas das alterações mitocondriais (FERREIRA et al., 2020; SKRZYPSKI et al., 2014).

Um estudo recente demonstrou que a capsaicina também é capaz de modular a transmissão sináptica através de mecanismos pré- e pós-sinápticos. Os autores Thakre e Bellingham (2019) e Ferreira et al. (2020) encontraram resultados de transmissão sináptica excitatória para capsaicina mesmo na presença de antagonistas TRPV1, o que sugere que a excitação via glutamato não requer a ativação destes receptores. Os autores também sugerem que a capsaicina pode reduzir a amplitude e a frequência de correntes pós-sinápticas inibitórias de transmissão mediadas por glicina, que é um neurotransmissor inibitório de sinapses glutamatérgicas envolvido com o mecanismo de dor neuropática (FERREIRA et al., 2020; THAKRE & BELLINGHAM, 2019).

Outras evidências apontam que a capsaicina pode ter efeitos sobre a sensibilidade de nociceptores baseado na ação inibitória sobre canais de potássio

voltagem-dependentes, cuja regulação está envolvida em mecanismos de dor neuropática e dor inflamatória (FERREIRA et al., 2020; YANG et al., 2014). Além disso, a capsaicina exerce efeito inibitório sobre a agregação plaquetária e associado a alterações de fluidez de membrana destas (FERREIRA et al., 2020).

1.2.4 APLICAÇÃO CUTÂNEA

A capsaicina é um composto neurotóxico que possui ação seletiva em fibras-C sensoriais desmielinizadas, causando ablação neural (NAGY et al., 1983). O tratamento neonatal de roedores com aplicações de capsaicina foi comumente utilizado para investigar a função de nervos sensoriais (MINAMI et al., 1999; LYNN, 1992), e culmina em uma denervação permanente com 80-90% de redução dos níveis teciduais de peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e de substância P (JANCSO et al., 1977; HOLZER et al., 1982; HOLZER, 1991; NAGY et al., 1981).

A aplicação subcutânea de capsaicina em animais neonatos é responsável pela destruição de fibras C de nervos aferentes primários, resultando em denervação periférica aferente (CARRILLO et al., 1998; HIURA et al., 2000). Como as fibras C são responsáveis pela transmissão de impulsos nociceptivos, esta aplicação termina por promover um estado de hipoalgesia que vem sendo estudado para elucidação e tratamento de uma série de síndromes dolorosas (FATTORI et al., 2016).

Estudando estes efeitos, Thomas et al. (1994) relataram que manifestações de dermatite, prurido e lesões cutâneas superficiais podem ser induzidas através da aplicação subcutânea de capsaicina em animais neonatos. Posteriormente, Carrillo et al. (1998) identificaram que este tratamento promoveu o desenvolvimento de lesões cutâneas transitórias a partir da terceira semana de vida em animais com e sem presença de colar protetor, concluindo que estas lesões são desencadeadas por distúrbios tróficos e estruturais do epitélio, e não somente pela lesão física provocada pelo ato de se coçar do animal.

A sensação de prurido é dependente de nervos sensoriais sensíveis à capsaicina (LOTTI et al., 1994; KIM et al., 1999). Mihara et al. (2004) confirmaram a destruição dos nervos sensoriais periféricos sensíveis à capsaicina quando da aplicação neonatal desta substância e demonstraram que estes receptores possivelmente exercem importante papel no desenvolvimento do prurido em quadros de dermatite atópica em modelos. Avaliando a resposta de animais NC/Nga (NC)

submetidos e não submetidos à aplicação subcutânea de capsaicina nos primeiros dias de vida, os autores observaram que os animais tratados responderam com elevada inibição do comportamento de se coçar, enquanto os animais não tratados apresentaram aumento gradativo do prurido. Isso sugere que o comportamento de se coçar é oriundo da atividade de fibras sensíveis à capsaicina e tem papel agravante mais do que desencadeador das condições alérgicas dos animais.

Bánvölgyi et al. (2005) observaram um aumento na reação de dermatite de contato em animais que sofreram depleção química e genética dos receptores TRPV1, o que sugere que o componente neurogênico associado aos neurônios sensíveis à capsaicina possa exercer ação moduladora no sentido de reduzir a hipersensibilidade cutânea e possivelmente influenciar o estado imune da pele ao promover a ausência de neuropeptídeos anti-inflamatórios.

A supressão de TRPV1 nas fibras nervosas pode estar envolvida com a inibição da liberação de neuropeptídeos, contribuindo para a redução da inflamação na derme e da ativação neurogênica (BÁNVÖLGYI et al., 2005; YUN et al., 2011). Os receptores TRPV1 parecem estar relacionados à sinalização de prurido, e seu bloqueio causa redução do comportamento de se coçar (YUN et al., 2011).

De forma análoga, Yun et al. (2011) demonstraram que a ação antagonista da capsazepina nos receptores TRPV1 acelera a recuperação da barreira cutânea danificada, inibindo o desenvolvimento de sintomas relacionados à dermatite atópica como o aumento dos níveis séricos de IgE, degranulação de mastócitos, inflamação cutânea e prurido (YUN et al., 2011). Anteriormente, Denda et al. já haviam sugerido que a ativação dos canais receptores TRPV1 presentes em ceratinócitos pudesse estar relacionada à disrupção da barreira cutânea (DENDA et al., 2007). Estes trabalhos evidenciam a importância da ativação dos receptores TRPV1 na ocorrência de danos à barreira cutânea e o potencial terapêutico destes receptores como alvo e manutenção da DA, além de esclarecer, em parte, o mecanismo de indução de dermatite atópica em animais tratados com capsaicina pela ativação destes receptores.

1.3 EXTRATO RICO EM POLISSACARÍDEOS DE *P. aculeata* Miller (EPA)

O potencial prebiótico de uma extração semelhantemente rica em polissacarídeos de OPN foi comprovado por Bessa (2020) sobre linhagens de

bactérias ácido lácticas e o estudo de sua atividade sobre as desordens metabólicas de ratos Wistar causadas por superalimentação demonstraram resultados sobre a modulação intestinal, apresentando atividades antioxidante e imunomodulatória, refletindo positivamente sobre os níveis séricos de glicemia, frações de colesterol e triglicerídios, além de melhorar o perfil de intolerância à glicose, reduzir os níveis de transaminases hepáticas e evitar lesões relacionadas à doença hepática gordurosa não alcoólica (BESSA, 2020).

Outros estudos realizados por pesquisadores do Laboratório de Produtos Naturais Bioativos da UFJF continuaram a caracterização e a avaliação das atividades in vitro de EPA e da formulação em questão. Dados não publicados retratam sua ação sobre linhagens de bactérias de pele humana, demonstrando potencial modulador de microbiota que pode culminar no efeito inibidor do crescimento de *S. aureus* e estimulante de *S. epidermidis*, que se destaca como microrganismo comensal residente da pele humana. Bessa et al. (2020) também demonstraram o potencial antioxidante da mucilagem obtida de *P. aculeata*, dados que estão de acordo com o encontrado em outro estudo realizado por Andrade et al. (2020). Estas atividades reportadas para o extrato rico em polissacarídeos de *P. aculeata* são de grande interesse, uma vez que esta planta já possui histórico de utilização popular para o tratamento de inflamações de pele, e corroboraram para a justificativa de relevância deste estudo. Os potenciais de ação anti-inflamatório, prebiótico e antioxidante são de importância para o tratamento de diversas condições alteradas de pele, como psoríase, pele acneica, dermatite seborreica e a própria dermatite atópica (ANDRADE et al., 2020; BESSA et al., 2020).

2 OJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

- Avaliar os efeitos da formulação de base gel Pereskin, contendo o extrato rico em polissacarídeos extraídos das folhas de *Pereskia aculeata* Mill., no tratamento tópico de dermatite atópica induzida com capsaicina em ratos Wistar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a extração dos polissacarídeos presentes nas folhas de *Pereskia aculeata*;
- Desenvolver uma formulação natural e hipoalergênica de uso tópico contendo como princípio ativo o extrato rico em polissacarídeos obtido a partir das folhas de *Pereskia aculeata* (EPA);
- Avaliar os efeitos do tratamento tópico com Pereskin sobre parâmetros clínicos gerais e escore de dermatite dos animais;
- Qualificar e quantificar as alterações histopatológicas dérmicas e epidérmicas observadas em microscopia ótica de campo claro;
- Avaliar o efeito do tratamento sobre o número de mastócitos infiltrados na derme dos animais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

As folhas de *Pereskia aculeata* Miller foram coletadas em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil (coordenadas -21.667775, -43.295569). Uma exsicata (CESJ nº 57539) encontra-se depositada no Herbário Leopoldo Krieger da UFJF, a espécie foi identificada pela Dr^a. Daniela Zappi (Royal Botanic Gardens, Kew).

As coletas foram realizadas no período manhã entre meses de janeiro a maio de 2021. As folhas foram secas a uma temperatura de aproximadamente 35°C, durante quinze dias.

3.2 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE *Pereskia aculeata* Mill.

Uma série de etapas de extração e purificação do material vegetal (Figura 7) resultam em um extrato mucilaginoso de consistência gelatinosa e aspecto marrom-esverdeado, posteriormente liofilizado para obtenção do pó da mucilagem de *P. aculeata* (EPA).

Inicialmente, as folhas coletadas foram limpas, secas e trituradas em liquidificador industrial, aproximadamente 100g por vez durante 45 segundos. Então, o pó das folhas secas foi submetido a um processo de deslipidização em etanol 95° GL por meio de maceração estática ao abrigo da luz durante 72 horas. Após este período, foi submetido à filtração em papel filtro e o filtrado foi descartado. O material vegetal resultante foi ressuspenso em água destilada e aquecida a 80°C por 3 horas, para promover a evaporação do etanol remanescente e a extração dos polissacarídeos presentes. A partir daí, um processo de filtração à vácuo dupla separou o conteúdo mucilaginoso que foi submetido ao gotejamento lento de etanol para precipitar os carboidratos (Figura 8). O precipitado foi levado à centrifugação em 5000rpm por 20 minutos e o etanol completamente retirado em rotavapor para obtenção do extrato rico polissacarídeos das folhas de *P. aculeata* (EPA). Após estas etapas, foi realizada a liofilização do extrato obtido e este foi armazenado sob refrigeração a 5°C em frasco de vidro abrigado da luz.

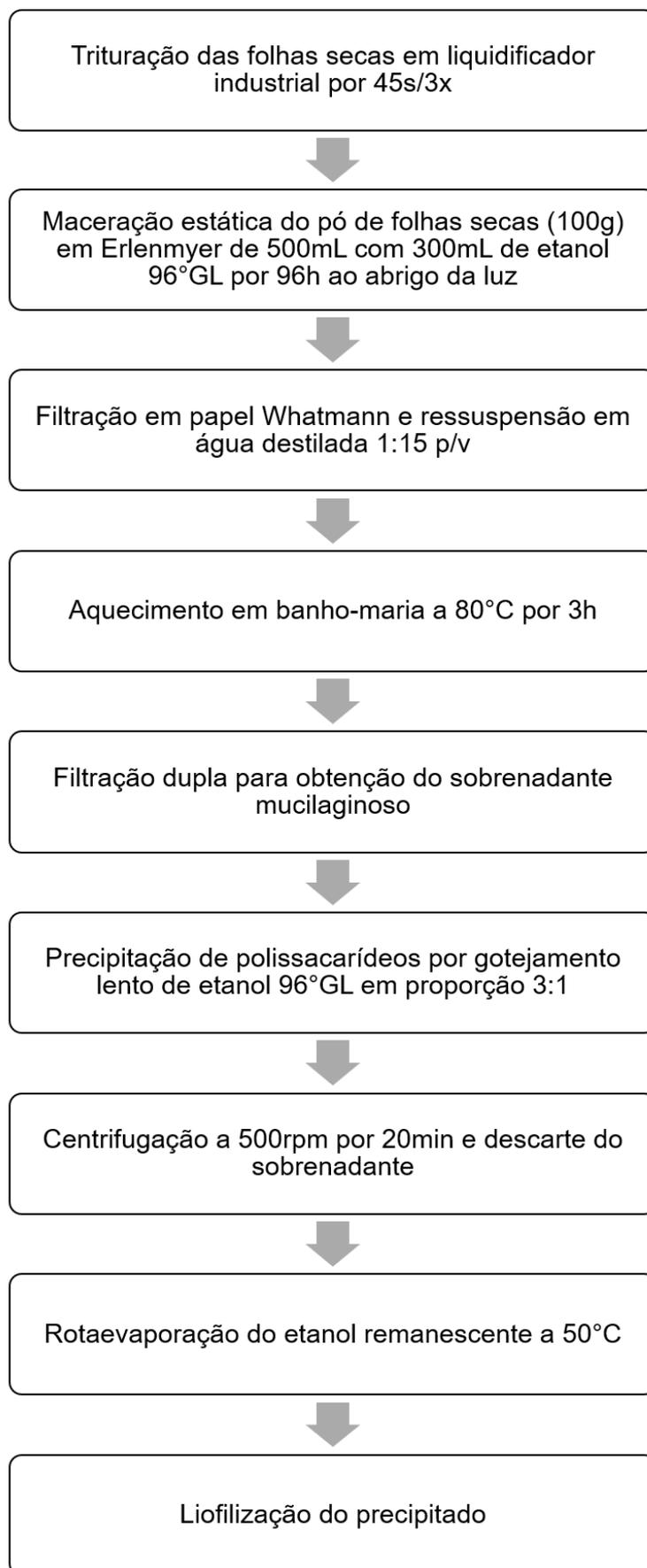


Figura 7. Esquema de etapas para obtenção do extrato de *P. aculeata* rico em polissacarídeos. Fonte: elaborado pela autora, 2023.

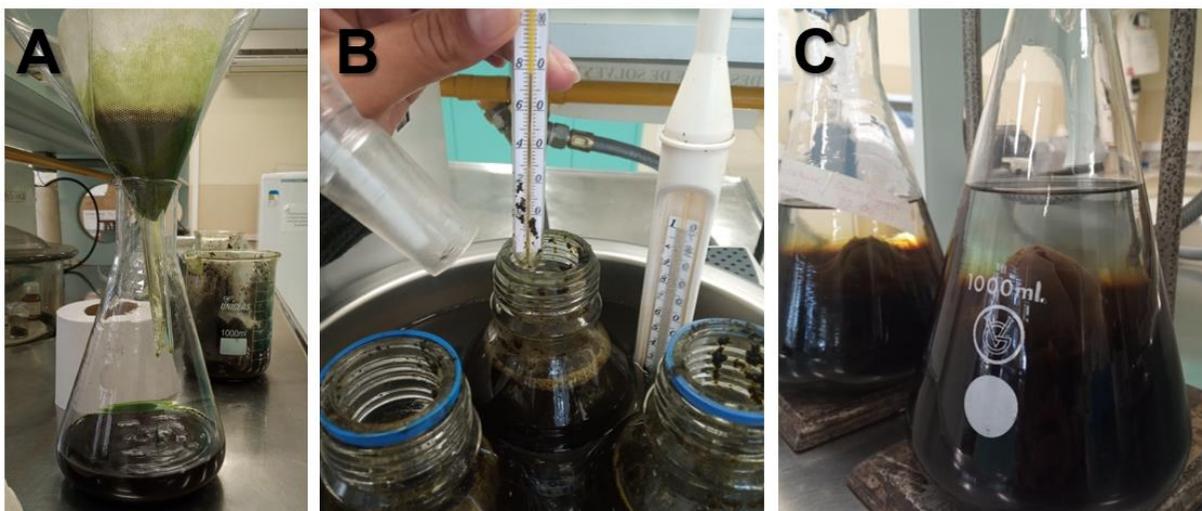


Figura 8. Obtenção do extrato rico em polissacarídeos de *P. aculeata* (EPA).
 (A) Filtração após 72h de maceração estática do pó das folhas secas para obtenção da torta deslipidizada. (B) Amostras em banho-maria a 80°C para extração dos polissacarídeos da torta filtrada. (C) Precipitação dos polissacarídeos por gotejamento lento de etanol.

Fonte: elaborado pela autora, 2023.

3.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE EPA

Para melhor conhecimento do extrato obtido, este foi submetido à caracterização físico-química. As análises realizadas estão descritas a seguir.

3.3.1 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

A pesquisa de metabólitos secundários como alcaloides, flavonoides, fenólicos, cumarinas, antraquinonas, triterpenos e esteroides em EPA foi conduzida segundo as metodologias descritas por Matos (1997).

3.3.2 QUANTIFICAÇÃO DE CARBOIDRATOS

O teor de carboidratos totais do extrato EPA foi mensurado segundo o método fenol-sulfúrico (FS) proposto por Dubois et al. (1956). Para quantificação comparativa dos valores encontrados na leitura das amostras de EPA, foram realizadas curvas padrão de glicose e inulina.

Diferentes concentrações de EPA foram preparadas em água destilada (100, 200 e 300ug/mL) a partir da diluição de uma solução estoque de 1mg/mL. Em triplicata, foi adicionada uma alíquota de 0,5mL de cada concentração a tubos de

ensaio. A cada tubo foi acrescentado 0,5mL de solução de fenol 5% e 2,5mL de ácido sulfúrico concentrado diretamente sobre a superfície do líquido.

O branco da amostra foi realizado com adição das alíquotas de amostras nas respectivas concentrações e adição de água destilada no volume correspondente aos reagentes. O branco do teste foi realizado em triplicata com água destilada no volume correspondente às alíquotas de amostra e adição dos reagentes. Após resfriamento, as amostras foram transferidas para uma placa de 96 poços e a leitura foi realizada por espectrofotometria em leitor de placas no comprimento de onda de 490nm.

Uma curva padrão com um monossacarídeo e um polissacarídeo conhecidos, glicose e inulina, foi realizada com os pontos de calibração nas concentrações de 6,25, 12,5, 25, 50, 75 e 100 ug/mL. O mesmo procedimento descrito anteriormente foi realizado.

Os valores obtidos foram transformados em uma equação da curva, utilizada como curva padrão. Esta deve configurar um ponto na curva conhecida para estabelecer um valor de concentração em função do padrão conhecido, como demonstrado a seguir:

Equação da reta da curva padrão:

$$y = ax + b$$

Onde:

y = absorvância da amostra de EPA

a = coeficiente linear da reta;

b = coeficiente angular da reta;

x = concentração experimental da amostra de EPA.

Cálculo do teor de carboidrato em equivalentes de glicose/inulina

Concentração teórica da amostra (100 µg/mL)	_____	100%
Concentração experimental (X µg/mL)	_____	X%

3.3.3 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS, LIPÍDEOS E CINZAS

A avaliação do teor de proteínas presentes em EPA foi realizada em quadruplicata pelo método de digestão de Kjeldahl (KABAT, MAYER, 1964), no qual foi realizada a quantificação de nitrogênio presente na amostra e convertida no teor de proteína bruta, com fator de conversão de N = 6,25. A quantificação de lipídeos foi realizada em duplicata pela extração com éter etílico em extrator GoldFish. As cinzas, ou teor de resíduo mineral fixo, foram determinadas como descrito no manual do Instituto Adolfo Lutz (2008) em mufla a 550 °C, realizado em duplicata. Esses ensaios foram realizados em colaboração com o Laboratório de Análise de Alimentos e Águas (LAAA) da Faculdade de Farmácia da UFJF sob a supervisão da Professora Dra Juliana de Carvalho da Costa.

3.4 PERESKIN

O pó da mucilagem de *P. aculeata* foi incorporado a outros ingredientes para desenvolvimento de uma formulação gel, então chamada de PereSkin.

Utilizando-se pistilo e gral para execução da formulação, foram incorporados 3% de EPA como princípio ativo; glicerina 5% como agente molhante; natrosol 0,75% como agente espessante; sorbato de potássio 0,2% como agente conservante; ácido cítrico 0,05% como agente antioxidante da formulação; trietanolamina como agente neutralizante; solução de ácido cítrico 50% (p/v) para correção de pH; e água destilada q.s.p (Figura 9).



Figura 9. Preparo da formulação Pereskin.

(A) Insumos e vidrarias utilizados para formulação. (B) Preparo do gel de natrosol 0,75% e solubilização do extrato de OPN. (C) Incorporação do extrato ao excipiente. (D) Envasamento da formulação em frasco plástico estéril de bico conta-gotas.

Fonte: elaborado pela autora, 2023.

Para monitoramento e ajuste do valor de pH da formulação foi utilizada fita papel indicadora de pH, e a correção foi feita com solução de ácido cítrico 50% (p/v), até a obtenção de valores equivalentes à faixa de pH de 4-5.

Todos os excipientes utilizados foram escolhidos com o objetivo de manter a formulação caracteristicamente hipoalergênica e atóxica, minimizando possíveis reações de hipersensibilidade e toxicidade oral, dada a natureza inflamatória da doença estudada e a possibilidade de certo grau de ingestão do produto, ao passo que os animais possuem comportamentos de autolimpeza naturais da espécie.

3.5 ANIMAIS

Foram utilizados 38 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*), provenientes do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora, obtidos com até 48 horas de vida. Durante todo o experimento os animais foram mantidos no Centro de Biologia da Reprodução da UFJF, em dependência localizada em área isolada, climatizada e com ciclo de claro/escuro padronizado para luzes desligadas a partir das 18 horas. As gaiolas foram alojadas em prateleiras verticais com sistema de ventilação mecânica. Água e alimento foram disponibilizados *ad libitum*, gaiolas e camas trocadas uma vez por semana. Todos os protocolos experimentais e procedimentos estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (aprovação do protocolo 019/2021 em anexo no Anexo II) da Pró-Reitoria de Pesquisa/UFJF.

3.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para o experimento foram utilizados 38 ratos Wistar machos, dos quais 32 receberam a indução como descrito previamente por Back et al. (2012) dentro das primeiras 48 horas de vida. O modelo foi induzido através de uma aplicação subcutânea de capsaicina na região do dorso de cada animal na dose de 50 mg/kg veiculada em 80% de solução fisiológica, 10% de etanol e 10% de Tween 80, administrada em seringa de 30UI.

Após a aplicação, os animais foram devolvidos à ninhada e seu desenvolvimento pré-desmame ocorreu normalmente. O desmame foi realizado com

21 dias, quando os animais foram alojados em gaiolas individuais identificadas e mantidos dessa forma até o final do experimento, após serem pesados e distribuídos aleatoriamente em 5 grupos, a saber:

GRUPO NAIVE (n = 6): animais não-induzidos que não receberam nenhum tipo de tratamento.

GRUPO CTRL+ (n = 8): animais induzidos que receberam tratamento com dexametasona creme 1mg/g.

GRUPO CTRL- (n = 8): animais induzidos que não receberam nenhum tipo de tratamento.

GRUPO CTRLve (n = 8): animais induzidos que receberam tratamento com o veículo da formulação PereSkin.

GRUPO PERESKIN (n = 8): animais induzidos que receberam tratamento tópico com a formulação PereSkin.

O veículo da formulação utilizado no tratamento do grupo CTRLve objetivou elucidar se o resultado obtido poderia ser decorrente da ação biológica de algum dos compostos utilizados na fabricação de Pereskin que não o extrato estudado. Foi constituído de todos os excipientes utilizados sem a incorporação de EPA, a saber: glicerina 5%; natrosol 0,75%; sorbato de potássio 0,2%; ácido cítrico 0,05%; trietanolamina; ácido cítrico 50% (p/v); água destilada q.s.p.

A partir da 4ª semana os animais foram avaliados semanalmente quanto ao ganho de peso e a cada dois dias quanto a evolução do escore de dermatite e condição clínica geral por meio de registros fotográficos. A partir da 5ª semana de vida, uma semana após o início dos sintomas clínicos, foi dado início aos protocolos de tratamento. A aplicação tópica dos respectivos produtos foi realizada em dias alternados no período da manhã, e o volume utilizado foi padronizado no que compreendia uma quantidade de creme ou gel suficiente para recobrir todas as áreas anatômicas de interesse, havendo manifestação clínica de lesão visível ou não.

Todos os grupos foram subdivididos em dois tempos de tratamento, T1 e T2, que corresponderam respectivamente a 2 e 4 semanas. Isto objetivou a avaliação comparativa dos resultados obtidos para a utilização da formulação em questão durante um período de curta duração (T1) e para período de duração prolongada (T2).

Os animais não induzidos (grupo NAIVE) não receberam nenhum tipo de tratamento, e foram considerados para parâmetros clínicos de desenvolvimento e histopatológicos de pele hígida normais da espécie.

3.7 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Escore de dermatite

Para avaliação clínica dos animais foi determinado um escore de dermatite calculado seguindo a metodologia proposta por Back et al. (2012), com modificações.

De acordo com a condição clínica determinada pelos parâmetros expostos na Tabela 1, para cada região anatômica avaliada obteve-se um escore de 0-4. A média dos valores das quatro áreas determinou o escore de dermatite do indivíduo naquele dia. Ao final de cada semana, a média da soma dos escores diários determinou sua evolução semanal. Os dados coletados de todos os indivíduos avaliados, dentro de seus respectivos grupos, estão dispostos no Anexo III.

Tabela 1. Caracterização do escore de dermatite

Escore	Condição da pele
0	Normal/sem alteração aparente
1	Pelagem frágil/esparsa, alopecia ou cicatriz (para lesões pré-existent)
2	Lesão ulcerada com crosta
3	Lesão ulcerada recente
4	Lesão ulcerada profunda/extensa

Fonte: elaborado pela autora (2023).

Registros de imagem

Os animais foram fotografados em todos os dias de tratamento para acompanhamento da evolução das lesões. Este banco de imagens têm o objetivo de ilustrar clinicamente os resultados apresentados quantitativamente através do escore de dermatite. O registro completo da evolução clínica semanal dos animais se encontra no Anexo I deste documento.

Cada animal teve registrado as seguintes regiões anatômicas: regiões esquerda e direita da face, região dorsocaudal da base das orelhas esquerda e direita, região occipital, região ventral do pescoço (Figura 10). Os registros obtidos de cada região anatômica de interesse em cada animal foram organizados de forma a entregar uma imagem representativa da média da condição clínica de cada grupo.

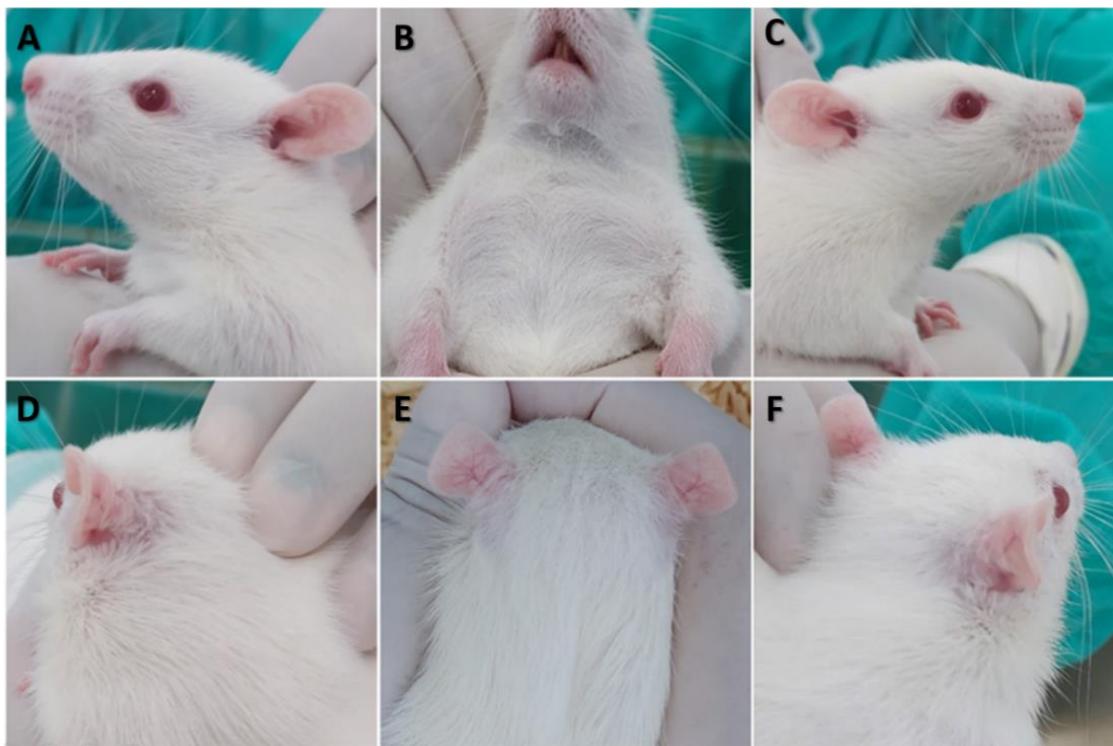


Figura 10. Regiões anatômicas de registro fotográfico de evolução clínica.

Regiões esquerda (A) e direita (C) da face, região ventral do pescoço (B), região dorsocaudal da base das orelhas esquerda (D) e direita (F), região occipital (E). Animal NAIVE, 5 semanas de vida.

Fonte: elaborado pela autora, 2023.

Ganho de peso

A partir do desmame e separação dos animais em grupos e em gaiolas de alojamento individual, os animais foram pesados semanalmente para monitoramento do ganho de peso corporal e desenvolvimento geral, como ilustrado na Figura 11.



Figura 11. Pesagem dos animais.

Fonte: elaborado pela autora, 2023.

3.8 MATERIAL BIOLÓGICO

Após o respectivo período de tratamento, em T1 com 7 semanas de vida e em T2 com 9 semanas de vida, os animais foram eutanasiados por meio de sedação e anestesia segundo as diretrizes do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA) utilizando-se protocolo de associação farmacológica de um agonista de adrenorreceptores alfa-2 e um anestésico dissociativo (BRASIL-CONCEA, 2018). A administração da dose letal foi realizada com xilasina 30mg/kg + cetamina 180mg/kg via intraperitoneal, seguida de exsanguinação por punção cardíaca. A coleta dos materiais biológicos foi realizada imediatamente após a confirmação do óbito.

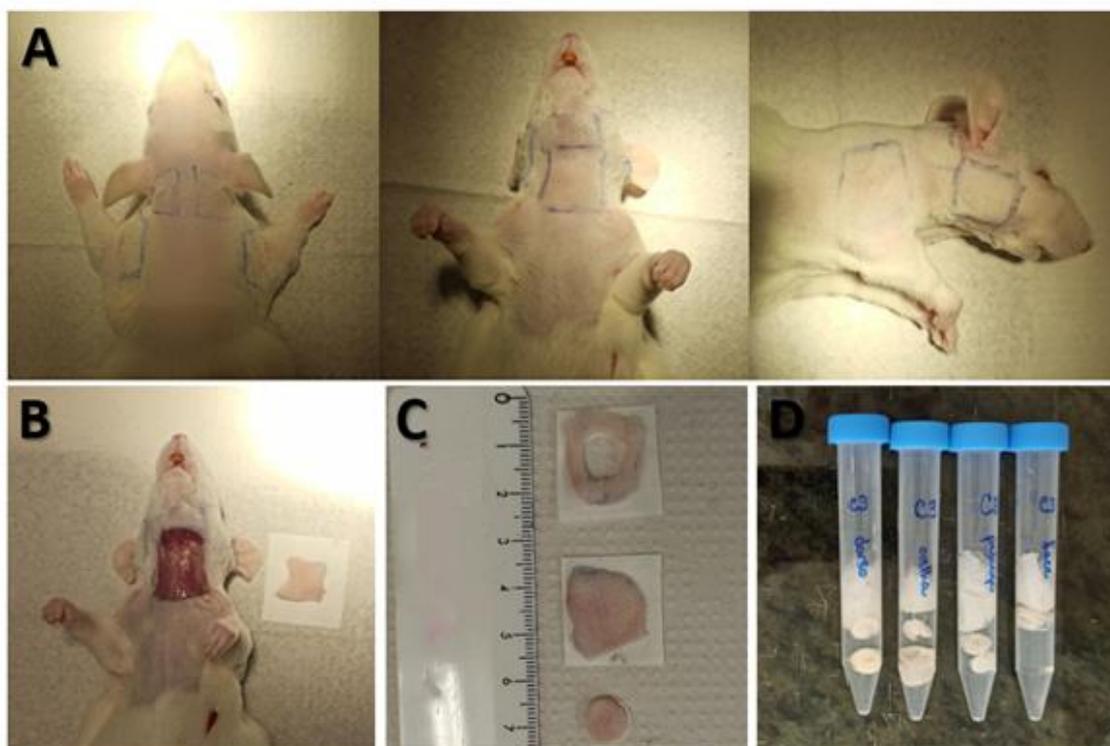


Figura 12. Coleta de material biológico.

(A) Demarcação das áreas a serem coletadas para corte com bisturi. (B) Região excisada. (C) Padronização dos fragmentos coletados. (D) Armazenamento do material coletado.

Fonte: elaborado pela autora, 2023.

Após a eutanásia, foram excisados das quatro regiões monitoradas utilizando-se bisturi, lâmina para bisturi e uma pinça anatômica, retalhos de pele previamente tricotomizada com aparador elétrico de pelos. Os retalhos cutâneos foram distendidos sobre papel aderente e então recortados utilizando-se um *punch* de 10mm (Figura 12) com o objetivo de padronizar a dimensão das amostras a serem submetidas à técnica histológica. Em seguida as amostras foram imersas em tubos

Falcon de 15mL contendo formalina 10% em solução tampão fosfato de sódio (PBS) visando a preservação da morfologia tecidual.

3.9 HISTOPATOLOGIA

3.9.1 TÉCNICA HISTOLÓGICA

Após a fixação, os fragmentos de pele devidamente identificados foram submetidos à clivagem e os fragmentos contidos em “cassetes” foram submetidos às etapas do processamento histológico: desidratação em álcool (em diferentes concentrações, sendo a inicial de 70% e finalizando com 100%). Logo após seguiu-se a diafanização com xilol, seguida de impregnação em parafina fundida (Figura 13).



Figura 13. Técnica histológica.

(A) Preparo para clivagem e armazenamento dos fragmentos em cassetes identificados.
 (B) Fragmento clivado (bisseccionado). (C) Momento da inclusão do fragmento em bloco de parafina.
 (D) Central de inclusão.

Fonte: elaborado pela autora, 2023.

Após o processamento histológico, as amostras foram emblocadas em parafina. Os blocos rígidos com os fragmentos foram levados ao micrótomo, onde foram seccionados cortes de 4 µm de espessura em diversos níveis de profundidade. Em seguida, os cortes foram distendidos em lâminas, desparafinizados em estufa e submetidos à coloração de rotina hematoxilina-eosina (HE) e Azul de Toluidina (AT) (TOLOSA et al., 2003). Após a montagem com lamínula e Bálsamo do Canadá, as lâminas foram analisadas em microscópio de luz em aumentos de dez, vinte e quarenta vezes.

Dos 38 animais utilizados, foram coletados fragmentos de pele de 4 regiões distintas. Das regiões de face, base da orelha e dorso, foram coletados 2 fragmentos (1 de cada lado), totalizando pelo menos 7 fragmentos de pele pertencentes a cada animal. Todos os fragmentos foram submetidos a processamento histológico,

reunindo, ao final, 266 blocos de parafina. De cada região anatômica foi selecionado o fragmento com melhor qualidade representativa para condução das análises histopatológicas, de forma que foram analisadas 144 lâminas coradas em HE e 144 lâminas coradas em AT.

Toda a técnica histológica e a avaliação histoquímica foram realizadas no laboratório de Histologia, do Departamento de Morfologia, enquanto as análises morfométricas e histopatológicas foram feitas no Laboratório Integrado de Pesquisa (LIP), pertencentes ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora.

3.9.2 ANÁLISE HISTOQUÍMICA

A análise semiquantitativa do número de mastócitos presentes na derme identificados por heterocromasia foi realizada nas lâminas submetidas à técnica histoquímica do AT, como ilustra a Figura 14.

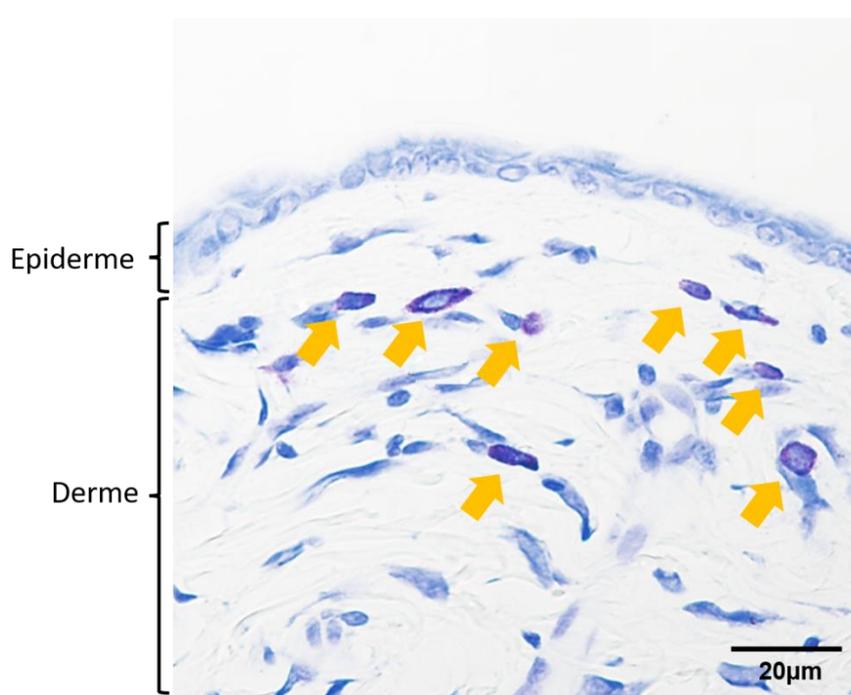


Figura 14. Mastócitos em heterocromasia.
Indicados pela seta amarela. Animal NAIVE. Azul de toluidina 50x.
Fonte: elaborado pela autora, 2023.

A contagem considerou o número de mastócitos em “hot spots” identificados em sete campos em objetiva de aumento de 50x, realizada por três avaliadores distintos. A partir da soma das contagens dos campos de cada lâmina

obteve-se uma média da respectiva lâmina para cada avaliador. A média da contagem dos avaliadores serviu como número de mastócitos representativo de cada lâmina. Ao final da contagem de todas as regiões, a média das quatro lâminas (uma de cada região) serviu como número de mastócitos representativo de cada animal. Analogamente, a média dos animais de cada grupo serviu como representativo deste em cada fase do experimento.

3.9.3 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE ACANTOSE

Objetivando aprofundar a análise da distribuição do espessamento patológico da epiderme em cada fragmento de pele excisado foram estipulados graus de acantose (Figura 15) de acordo com os critérios dispostos na Tabela 2.

Tabela 2. Determinação do grau de acantose

GRAU DE ACANTOSE	CRITÉRIO DE AVALIAÇÃO	
	AUMENTO 10x	AUMENTO 40x
1	Espessamento leve; focal	≤ 3 camadas celulares
2	Espessamento moderado; focal	4 - 5 camadas celulares
3	Espessamento moderado; extenso ou espessamento intenso em qualquer ponto	≥ 6 camadas celulares

Fonte: elaborado pela autora, 2023.

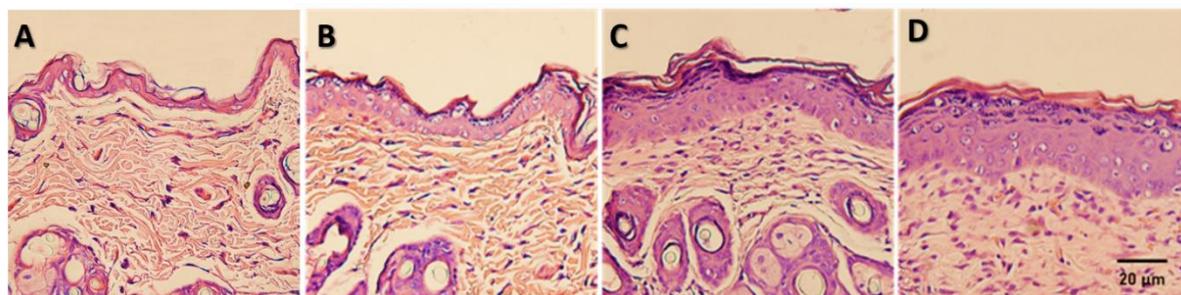


Figura 15. Graus de acantose (HE).

(A) *Animal NAIVE- sem acantose*; (B) *acantose grau 1*; (C) *acantose grau 2*; (D) *acantose grau 3*.
Figuras A, B, C e D HE 20x.

Fonte: elaborado pela autora, 2023.

3.9.4 MORFOMETRIA

Além dos parâmetros descritivos, foi feita a análise histopatológica semiquantitativa através da medição da espessura da epiderme das quatro regiões de interesse de todos os animais. Este parâmetro foi mensurado microscopia de campo claro sob aumento de 800x, utilizando-se objetiva de 40x somado ao aumento de 20x da imagem em software digital ferramentas de análises CellSens™.

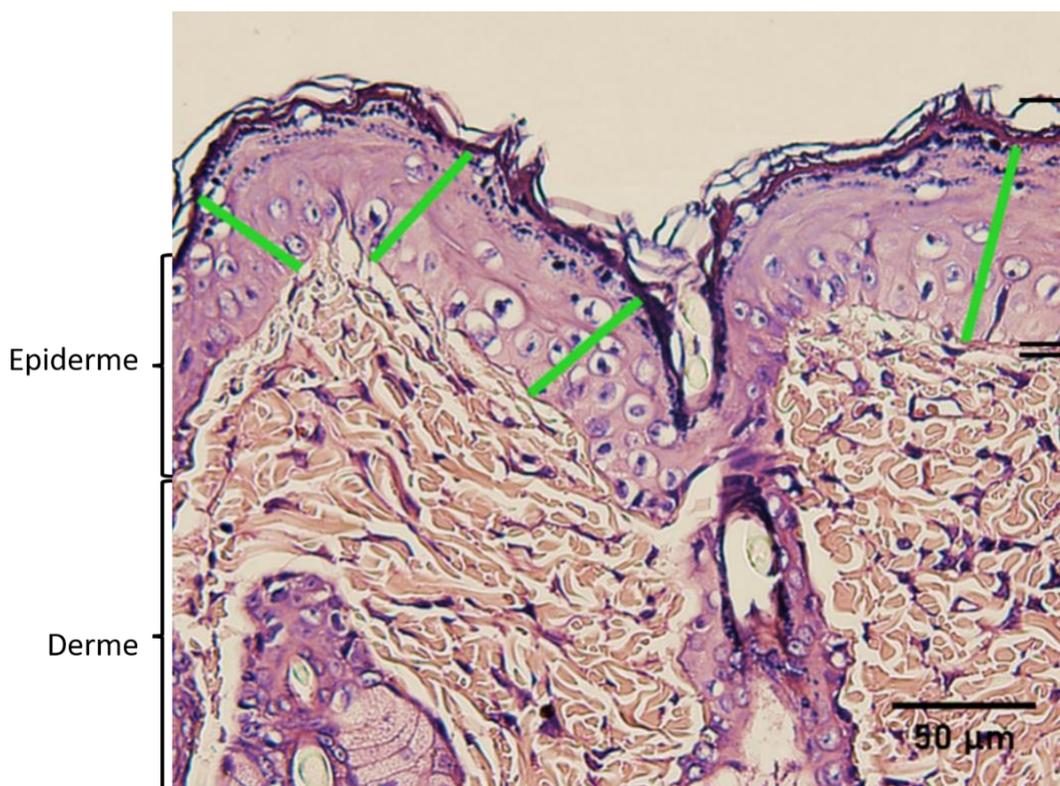


Figura 16. Medida da epiderme (HE).

Medida morfométrica indicada pelas barras em verde.

Fonte: elaborado pela autora, 2023.

A medida foi feita desde a lâmina basal até o limite das células granulosas, e expressa em micrometros (μm) (Figura 16). O resultado foi obtido pelo cálculo da média de dez regiões de epiderme íntegra escolhidas ao longo do fragmento. Por epiderme íntegra, entende-se a presença da camada granulosa preservada ou totalmente restaurada. Por ser uma camada facilmente despreendida durante o processo de confecção das lâminas histológicas, a camada córnea não foi quantificada em análises de espessura ou quanto sua ausência/presença. Para os animais induzidos, considerou-se as áreas com presença de acantose.

3.9.5 DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA

Os fragmentos de pele coletados corados com coloração padrão HE foram selecionados para análise morfológica, cujos parâmetros foram agrupados em uma tabela e então transformados em dados descritivos. De acordo com a região do tecido epitelial, foram considerados para descrição morfológica a alteração do processo de ceratinização da camada córnea; presença de úlcera ou crosta; presença de hipergranulose representada por aumento dos grânulos ceratohialinos intracelulares e/ou aumento do número de camadas celulares do estrato granuloso da epiderme. Estes parâmetros foram avaliados de forma qualitativa, visto a característica descritiva das análises histomorfológicas.

3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas das variáveis mensuradas nos testes clínicos de ganho de peso e evolução de escore de dermatite foram realizadas através do teste *two-way* ANOVA seguido do teste de Bonferroni como *post hoc*. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$, quando comparadas ao grupo de respectivo interesse. Valores de significância representados por * quando $p < 0.05$, ** quando $p < 0.01$ e *** quando $p < 0.001$. Para a execução dessas análises foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 5.0.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE EPA

4.1.1 RENDIMENTO

O rendimento é dado pela diferença entre os pesos de matéria vegetal (100g) ao início e ao final da extração (14,9g), e correspondeu a 14,9%.

4.1.2 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

Os resultados não demonstraram a presença de compostos correspondentes a nenhum dos grupos moleculares que caracterizariam metabólitos secundários.

4.1.3 QUANTIFICAÇÃO DE CARBOIDRATOS, PROTEÍNAS, LIPÍDEOS E CINZAS

Os resultados obtidos pelo método FS (Figura 17), juntamente com os mensurados pelo método de digestão de Kjeldahl estão dispostos na Tabela 3.

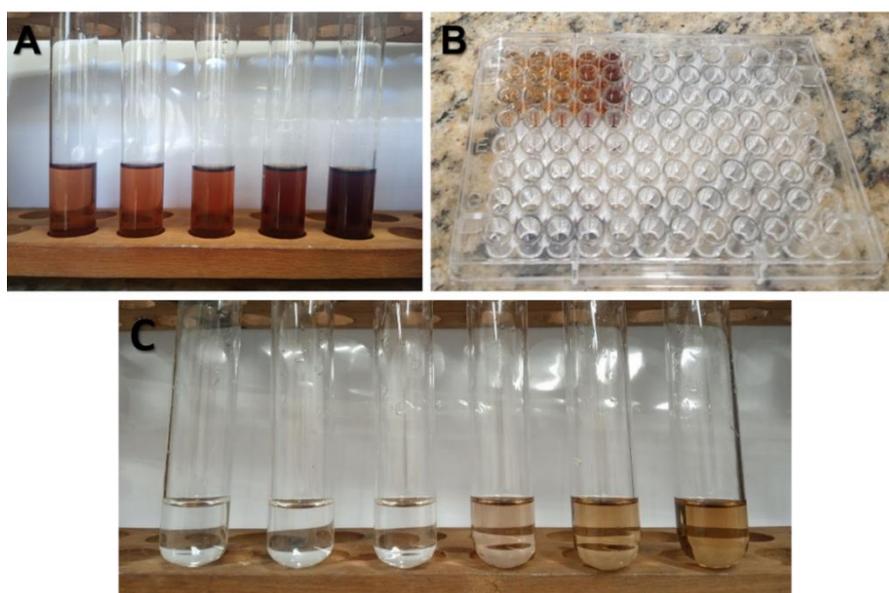


Figura 17. Reação de Dubois.

(A) Da esquerda para a direita: resultado da reação da adição de fenol e ácido sulfúrico para 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de glicose. (B) Preparação de microplaca para leitura em espectrofotômetro. (C) Da esquerda para a direita: branco da amostra em triplicata, reação da adição de fenol e ácido sulfúrico para 100, 200 e 300 $\mu\text{g/mL}$ de EPA.

Fonte: elaborado pela autora, 2023.

Tabela 3. Quantificação dos teores de carboidratos, proteínas e lipídeos em EPA

Substância	Resultado
Carboidratos* (%)	50,22 ± 0,99
Proteínas (%)	16,45 ± 0,03
Lipídeos (%)	3,71 ± 0,13
Cinzas (%)	30,10 ± 0,37

Valores expressos em média ± desvio padrão da média (n=3)

*Teores de carboidratos expressos em equivalente de glicose

Fonte: elaborado pela autora (2023).

4.1.4 PERESKIN

O estudo das características de estabilidade preliminar da formulação de PereSkin foi realizada em paralelo, em pesquisa conduzida pela pesquisadora Naiara Tavares no mesmo laboratório. A mesma pesquisa revelou que o potencial antioxidante de EPA se mantém quando incorporado à formulação por diferentes métodos *in vitro* (OLIVEIRA, 2023).

4.2 EVOLUÇÃO CLÍNICA

Escore de dermatite

A média dos escores de dermatite obtidos para cada grupo ao longo das semanas de tratamento está representada no Gráfico 1 e ilustrado na Figura 18.

Na primeira semana de tratamento, S1, todos os grupos de animais induzidos se encontravam em condição semelhante, muito próximo ao escore 2. Ao longo desta primeira semana a evolução do escore de dermatite aconteceu diferentemente para cada grupo, de acordo com o tratamento recebido. Animais não tratados evoluíram para muito próximo do escore 3 enquanto os animais tratados com dexametasona começaram a apresentar tendência decrescente. Esta tendência foi acompanhada pelo grupo tratado com PereSkin, enquanto o grupo tratado apenas com o veículo da formulação também apresentou escore de dermatite maior na semana seguinte, S2, onde observou-se o pico do escore de dermatite em todos os grupos. Em S2 também foi realizada a eutanásia dos animais incluídos no primeiro tempo de tratamento, que configura T1.

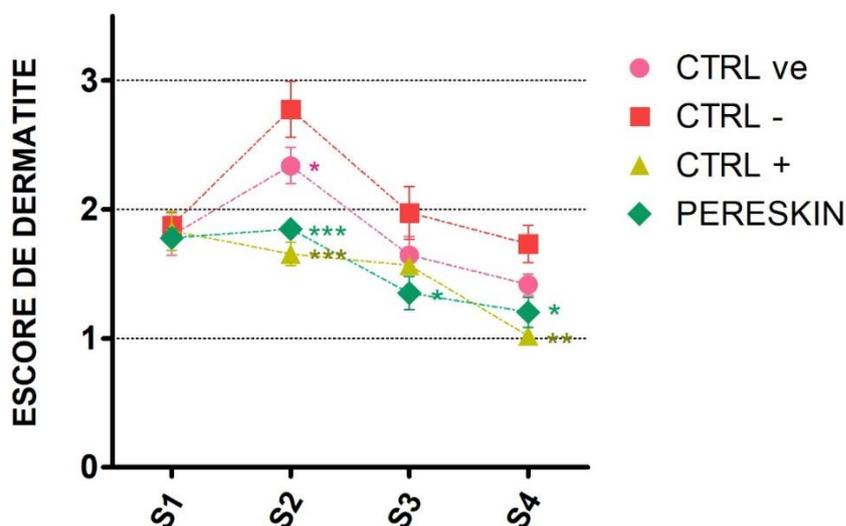
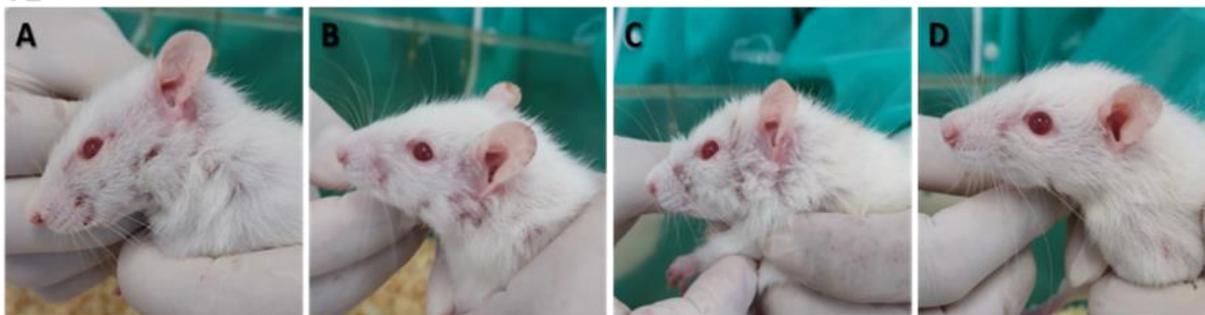


Gráfico 1. Evolução do escore de dermatite.

Escore de dermatite médio por grupo a cada semana de tratamento, representadas por S1, S2, S3 e S4. Os valores expressos representam a média \pm desvio padrão de cada grupo. O grupo CTRL- foi utilizado como controle para comparação estatística, realizada por two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni como post hoc. Valores significantes representados por * quando $p < 0.05$, ** quando $p < 0.01$ e *** quando $p < 0.001$.

Fonte: elaborado pela autora (2023).

T1



T2



Figura 18. Escore de dermatite clínico em T1 e T2.

T1 (A) CTRL- escore 2; (B) CTRLve escore 2; (C) CTRL+ escore 2; (D) EPA escore 1.

T2 (A) CTRL- escore 1; (B) CTRLve escore 1; (C) CTRL+ escore 1; (D) EPA escore 1.

Fonte: elaborado pela autora, 2023.

Ao final do primeiro tempo de tratamento (T1), que corresponde a S2, houve redução no escore de dermatite com maior significância estatística para os

animais tratados com PereSkin e com dexametasona. Uma melhora menos significativa foi observada no grupo CTRLve. Esta significância, no entanto, não se manteve em T2, durante S3 e S4. O grupo tratado com dexametasona também não apresentou diferença estatisticamente significativa em S3, mas voltou a apresentar em S4.

Ganho de peso

O ganho de peso dos animais de acordo com seus respectivos grupos ao longo das semanas de experimento está disposto no Gráfico 2 a seguir.

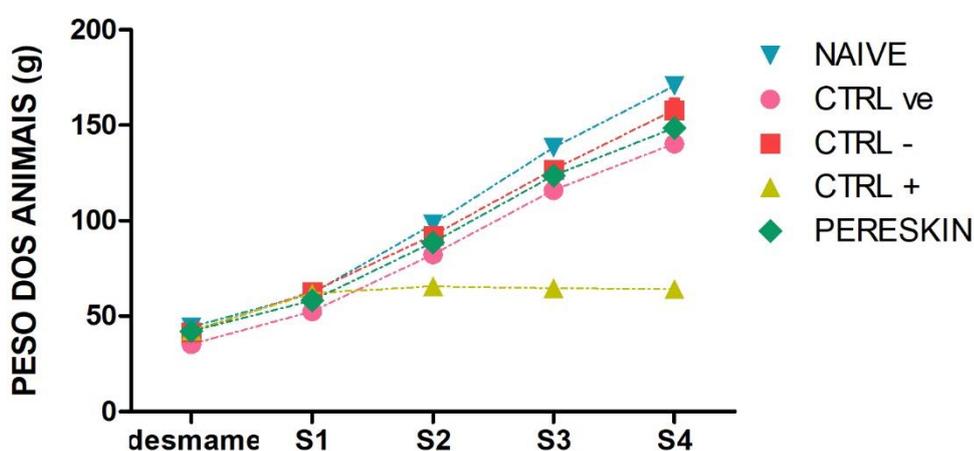


Gráfico 2. Evolução do ganho de peso.

Peso médio dos animais por grupo experimental em cada semana de experimento. S1, S2, S3 e S4 correspondem às semanas e tratamento. Os valores expressos representam a média \pm desvio padrão de cada grupo. A análise estatística foi realizada por teste two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni como análise post hoc. O grupo NAIVE foi utilizado como controle para comparação estatística. Foram considerados significantes valores representados por * quando $p < 0.05$, ** quando $p < 0.01$ e *** quando $p < 0.001$.

Fonte: elaborado pela autora (2023).

Todos os grupos, exceto o grupo CTRL+, que recebeu tratamento com o glicocorticoide dexametasona creme, seguiram a curva esperada para o ganho de peso da espécie de acordo com a idade, segundo Neves (2013).

Neste último grupo, o peso máximo foi atingido na primeira semana após o desmame dos animais e apresentou tendência decrescente desde então. Além do ganho de peso prejudicado, alguns animais do mesmo grupo apresentaram quadros de balanopostite em diferentes momentos do experimento. Os registros de imagem referentes a esta intercorrência se encontram no Anexo I.

4.3 HISTOPATOLOGIA

4.3.1 ANÁLISE HISTOQUÍMICA

A contagem de mastócitos identificados por heterocromasia em lâminas histológicas coradas pelo azul de toluidina está expressa no Gráfico 3, revelando redução significativa no número de mastócitos infiltrados na derme em todos os grupos tratados em relação ao grupo CTRL-, excetuando o grupo CTRLve.

Todos os grupos apresentaram uma redução numérica na contagem de mastócitos para o segundo tempo de tratamento. Esta foi uma redução esperada visto que o modelo animal utilizado nesta pesquisa possui como característica a remissão espontânea das lesões a partir da sétima semana de vida dos animais. Esta redução foi maior no grupo tratado com PereSkin, como pode ser visto abaixo.

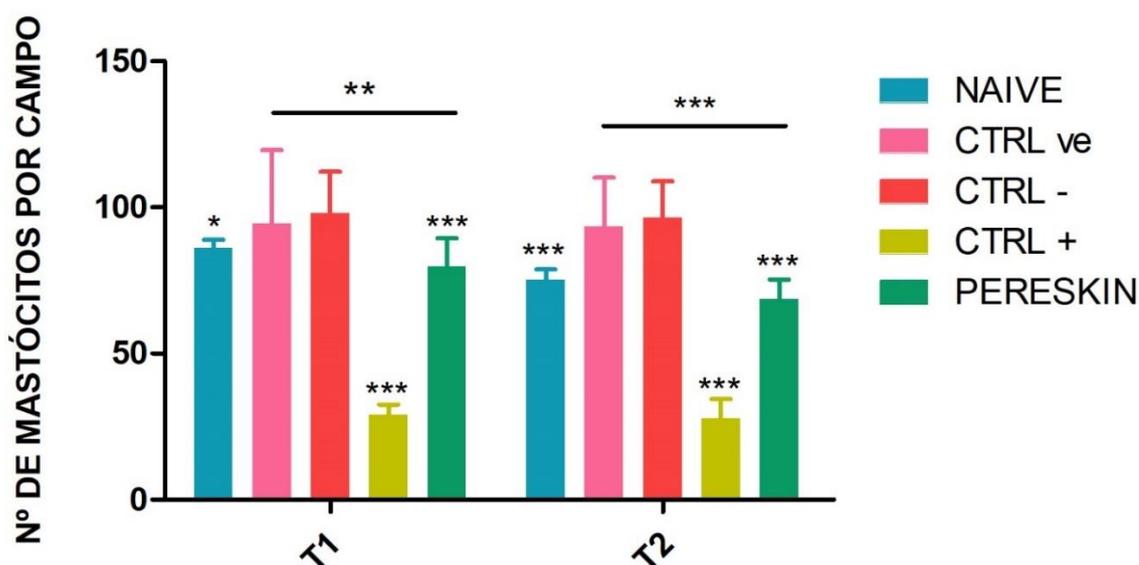


Gráfico 3. Contagem de mastócitos.

Média das contagens de mastócitos por grupo de acordo com os tempos de tratamento T1 e T2. Os valores expressos representam a média \pm desvio padrão de cada grupo. Os valores expressos representam a média \pm desvio padrão de cada grupo. A comparação estatística entre os grupos CTRLve e PERESKIN está representada pela barra posicionada acima as respectivas colunas. O grupo CTRL- foi utilizado como controle para comparação estatística, realizada por two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni como post hoc. Valores significantes representados por * quando $p < 0.05$, ** quando $p < 0.01$ e *** quando $p < 0.001$.

Fonte: elaborado pela autora (2023).

Foi encontrada diferença estatística entre os grupos tratados com PereSkin e somente com o veículo da formulação, para ambos os tempos de tratamento.

4.3.2 ESPESSURA DA EPIDERMIS

A distribuição das medidas de espessura da epiderme obtidas em todas as regiões anatômicas dos animais está disposta no Gráfico 4.

O grupo tratado com PereSkin apresentou redução significativa nas medidas da epiderme tanto em T1 quanto em T2, quando comparadas com animais que não receberam nenhum tipo de tratamento. Em relação ao grupo CTRLve, apenas os animais incluídos em T1 apresentaram diferença significativa quanto à espessura da epiderme quando comparados com animais que não receberam nenhum tipo de tratamento.

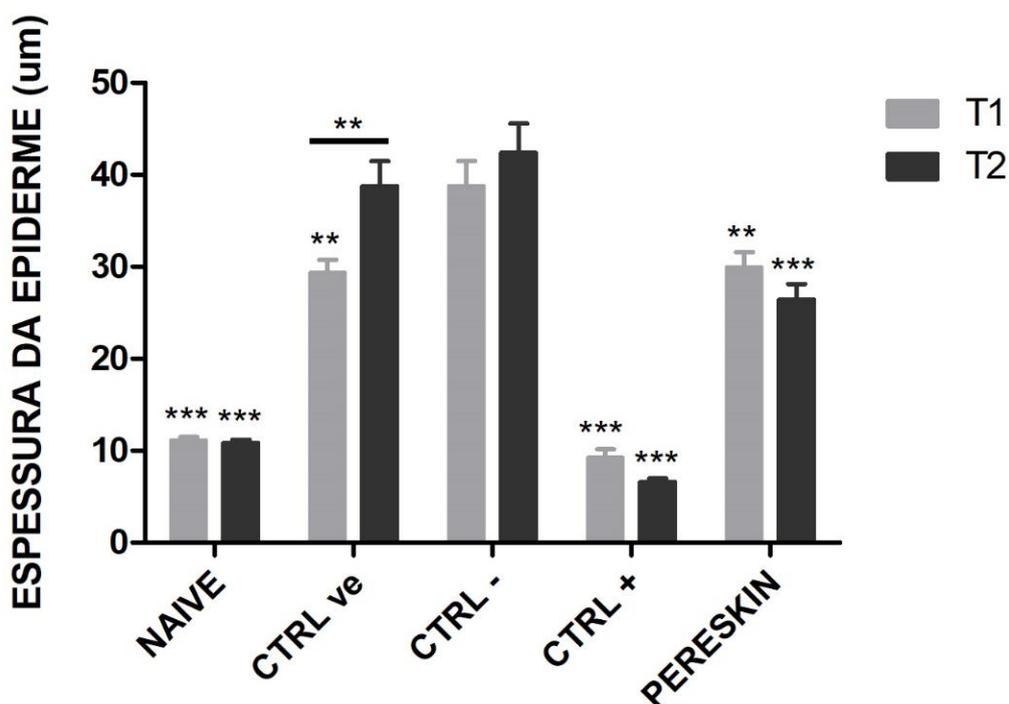


Gráfico 4. Medida da espessura da epiderme em µm.

Média da espessura da epiderme de cada grupo em T1 e T2, que correspondem aos tempos de tratamento dos animais eutanasiados em S2 e S4, respectivamente. Os valores expressos representam a média \pm desvio padrão de cada grupo. A diferença estatística entre os dois tempos de tratamento para o grupo CTRLve está representada pela barra posicionada acima das respectivas colunas. O grupo CTRL- foi utilizado como controle para comparação estatística, realizada por two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni como post hoc. Valores significantes representados por * quando $p < 0.05$, ** quando $p < 0.01$ e *** quando $p < 0.001$.

Fonte: elaborado pela autora (2023).

De acordo com o tempo de tratamento, o único grupo que apresentou diferença estatística entre T1 e T2 foi o grupo tratado apenas com o veículo da formulação.

Embora não tenha sido indicada no gráfico, a espessura da epiderme do grupo CTRL+, tratado com dexametasona, apresentou expressiva redução indicada por significância estatística em relação à pele hígida representada pelos animais do grupo NAIVE, tanto em T1 (***) quanto em T2 (**). Foi observado nestes animais, além da atrofia da epiderme, importante redução na espessura das demais camadas da pele. Embora não tenham sido realizadas análises de morfometria das camadas subepidérmicas para comparação estatística, cabe a notoriedade descritiva da observação.

Não foi encontrada diferença estatística significativa que justificasse a distribuição das medidas por região. Dessa forma, as medidas de epiderme obtidas por software especializado foram dispostas por tempo de tratamento para cada grupo avaliado.

4.3.3 GRAU DE ACANTOSE

A distribuição das médias do grau de acantose mensurado em todos os animais e obtidas para cada grupo está apresentada no Gráfico 5, dispostas de acordo com cada região anatômica e também de acordo com o tempo de tratamento, e a significância estatística calculada em relação ao grupo CTRL-.

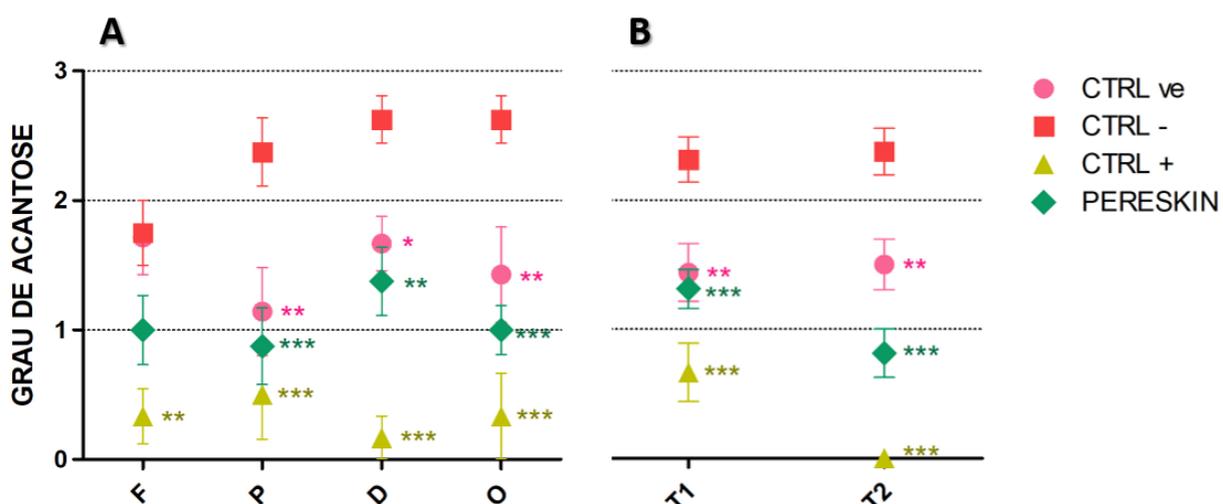


Gráfico 5. Grau de acantose.

Grau de acantose por região anatômica (A) e por tempo de tratamento (B). F = face; P = pescoço; D = dorso; O = região da base da orelha. T1 e T2 correspondem aos tempos de tratamento. Os valores representam a média \pm desvio padrão de cada grupo. O grupo CTRL- foi utilizado como controle para comparação estatística, realizada por two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni como post hoc. Valores significantes representados por * quando $p < 0.05$, ** quando $p < 0.01$ e *** quando $p < 0.001$.

Fonte: elaborado pela autora (2023).

Os grupos CTRLVe e EPA se aproximam em relação ao grau de acantose em T1, mas há redução significativa em T2 para o grupo tratado com PereSkin enquanto o grupo tratado apenas com o veículo da formulação apresenta aumento significativo do grau de acantose e da espessura epidérmica em T2, de forma semelhante ao grupo que não recebeu nenhum tipo de tratamento. O grupo tratado com o veículo da formulação demonstra redução quando comparado ao grupo CTRL- apenas em T1, mas sua significância não chega a ser maior ou igual à diferença observada no grupo tratado com PereSkin.

O grupo tratado com dexametasona apresentou, em ambos os tempos de tratamento e para todas as regiões mensuradas, grau de acantose menor que 1, com maior redução em T2. As poucas áreas de acantose observadas não apresentaram, via de regra, mais de 3 camadas celulares. Somado a isso, a atrofia epidérmica ainda se manifestava com expressiva redução do volume celular dos ceratinócitos, quando comparado a células normais do grupo NAIVE.

4.3.4 DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA

Nas avaliações histopatológicas, analisou-se alteração da camada córnea; presença de úlcera ou crosta; presença de hipergranulose representada por aumento dos grânulos ceratohialinos intracelulares e/ou aumento do número de camadas celulares do estrato granuloso da epiderme. Estes dados foram distribuídos em porcentagem de incidência e estão demonstrados na Tabela 4.

Pequenas diferenças na inclinação do fragmento histológico no momento da inclusão em parafina que culminem em cortes histológicos oblíquos e ajustes micrométricos de espessura no momento do corte em micrótomo podem afetar, respectivamente, os parâmetros de espessura dérmica e celularidade/densidade celular, de forma que não se considerou plausível a determinação de valores numéricos para estes parâmetros. De forma semelhante, a observação dos níveis de congestão vascular, angiogênese e infiltrado inflamatório não foi expressa em valores quantificados, dada a natureza variável dos momentos de abordagem das lesões em relação ao seu processo cicatricial, sendo dessa forma considerados descritivamente, e em áreas distantes de úlceras/crostas quando da presença das mesmas.

Tabela 4. Incidência dos parâmetros morfológicos em cada grupo (%)

	ALTERAÇÃO DE CERATINIZAÇÃO	ÚLCERA/CROSTA	HIPERGRANULOSE
CTRL-	63	72	63
CTRLve	50	61	43
CTRL+	68	14	13
EPA	9	69	38

Fonte: elaborado pela autora, 2023.

Concomitantemente com estes parâmetros, as características morfológicas de cada grupo foram reunidas em uma análise descritiva qualitativa que está apresentada a seguir.

Análise morfológica do grupo CTRL-

O padrão ortoceratótico da camada córnea foi visto em 37% das amostras, muitas vezes em hiperortoceratose. Algumas áreas de camada córnea se apresentaram em coloração mais acidófila e associadas à paraceratose ou outra alteração do processo de cornificação em 63% dos fragmentos analisados. Esta característica, no entanto, não se estendeu a porções extensas do fragmento, sendo mais pontual do que o observado em outros grupos.

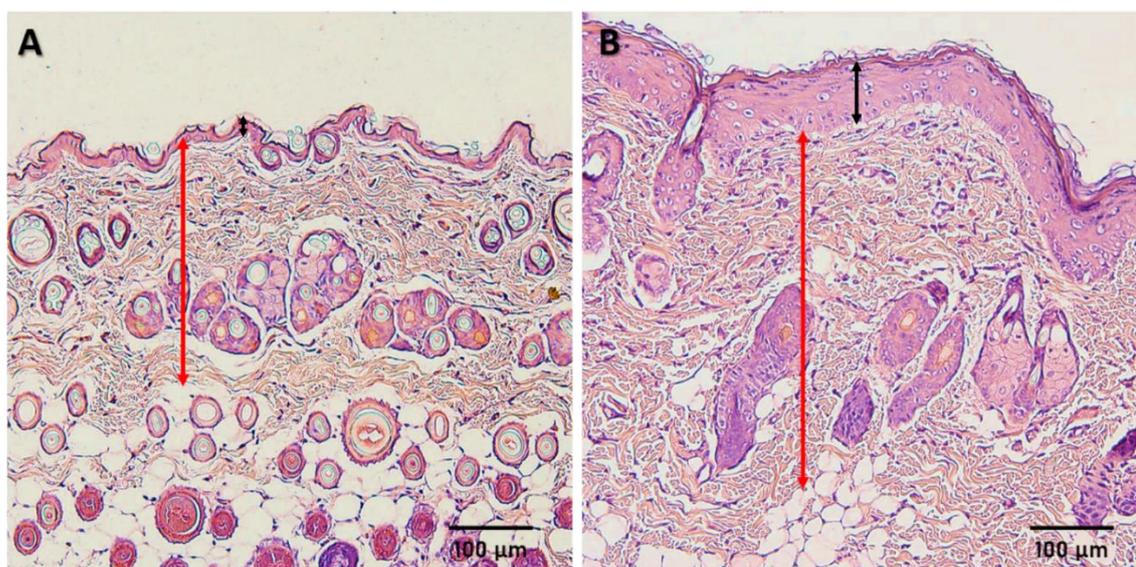


Figura 19. CTRL-: espessura da derme e epiderme.

Comparação entre espessura aproximada da derme (dupla seta vermelha) e da epiderme (dupla seta preta) de animal NAIVE (A) e animal CTRL- (B). Figuras A e B HE 20x.

Fonte: elaborado pela autora, 2023.

Fica evidente neste grupo um espessamento da derme em relação ao grupo controle hídrico NAIVE, secundário ao estímulo mecânico do ato de se coçar pelo prurido e da condição inflamatória associada, que também pode ser visto na Figura 19. Embora o conceito de celularidade não tenha sido abordado quantitativamente, é possível perceber neste grupo também uma densidade celular aumentada, ocasionada pelos mesmos fatores já citados. Ao longo de toda a derme, mesmo distante de lesão prévia ou recente, observa-se com facilidade células mastocitárias evidentes mesmo na coloração HE.

Observou-se com uma alta frequência de 72% a presença de crostas e úlceras nos fragmentos analisados. A epiderme perilesional encontrava-se quase sempre muito espessada, alcançando até 15 camadas de células epiteliais e, frequentemente, observou-se associação de material fibrinonecrótico sobreposto (Figura 20). Neste grupo, um achado que chamou atenção, além da acantose pronunciada, foi a hipertrofia e células da camada espinhosa.

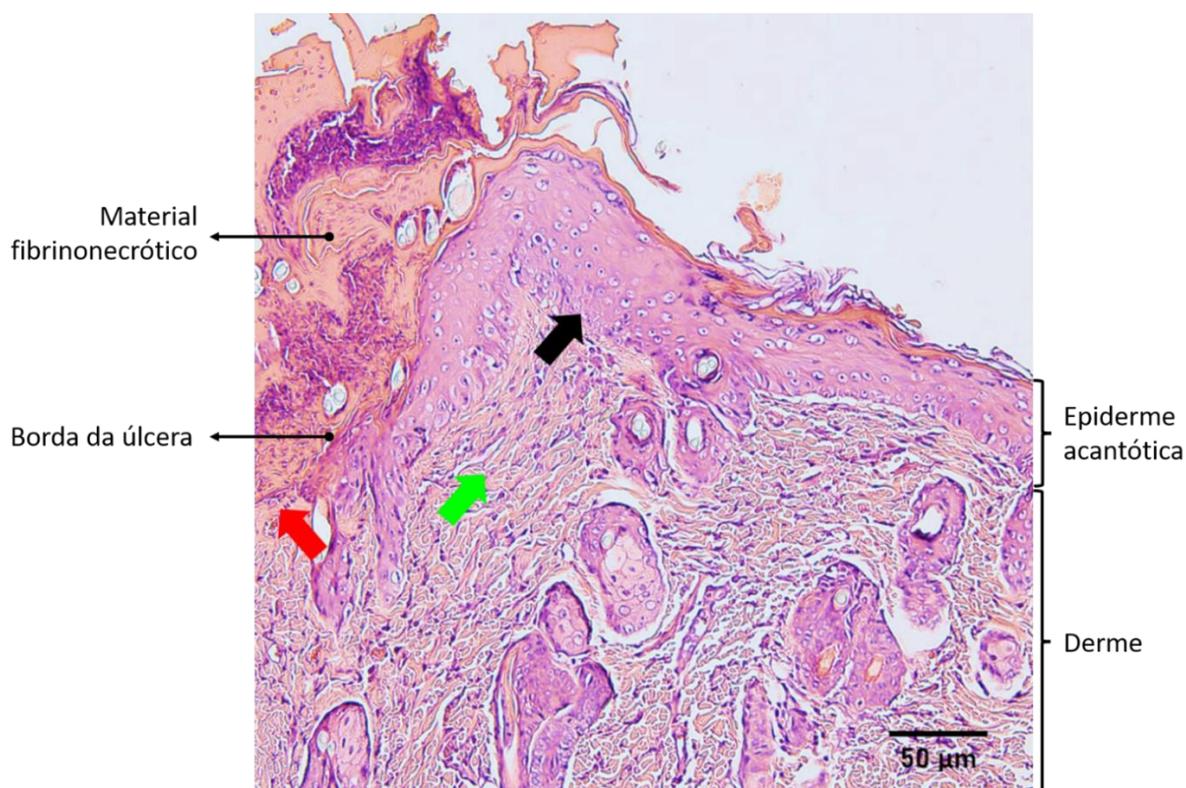


Figura 20. CTRL-: características histomorfológicas.

Região perilesional apresentando compactação e paralelismo de fibras colágenas em derme superficial correspondente à regeneração tecidual prévia (indicada pela seta verde). Epiderme acantótica grau 3 recoberta por material fibrino-necrótico (indicada pela seta preta). À esquerda, região ulcerada (indicada pela seta vermelha). HE 20x.

Fonte: elaborado pela autora, 2023.

Observou-se o estrato granuloso sempre bem evidente quando presente, com hipergranulose decorrente de acúmulo de grânulos ceratohialinos e aumento expressivo no número de camadas celulares, chegando até 6 camadas em algumas áreas. Estes achados justificam a alta incidência de hipergranulose neste grupo, mensurada em 74%.

Análise morfológica do grupo CTRLve

O grupo tratado com o veículo da formulação de PereSkin possui parâmetros morfológicos muito semelhantes ao grupo CTRL-. Células da epiderme com núcleos volumosos e presença frequente de acantose chamam a atenção em relação à epiderme. A camada córnea se apresenta preservada em algumas regiões do epitélio, sendo frequente a ocorrência de ortoceratose. Paraceratose ou outra alteração do processo de ceratinização da camada córnea foi observado em 50% das lâminas avaliadas.

Observa-se neste grupo, concomitantemente às regiões de acantose, uma hiperplasia das células do estrato granuloso e/ou maior acúmulo de grânulos cetarohialinos intracelulares, porém este achado parece restrito às áreas descritas, caracterizando 43% de hipergranulose neste grupo.

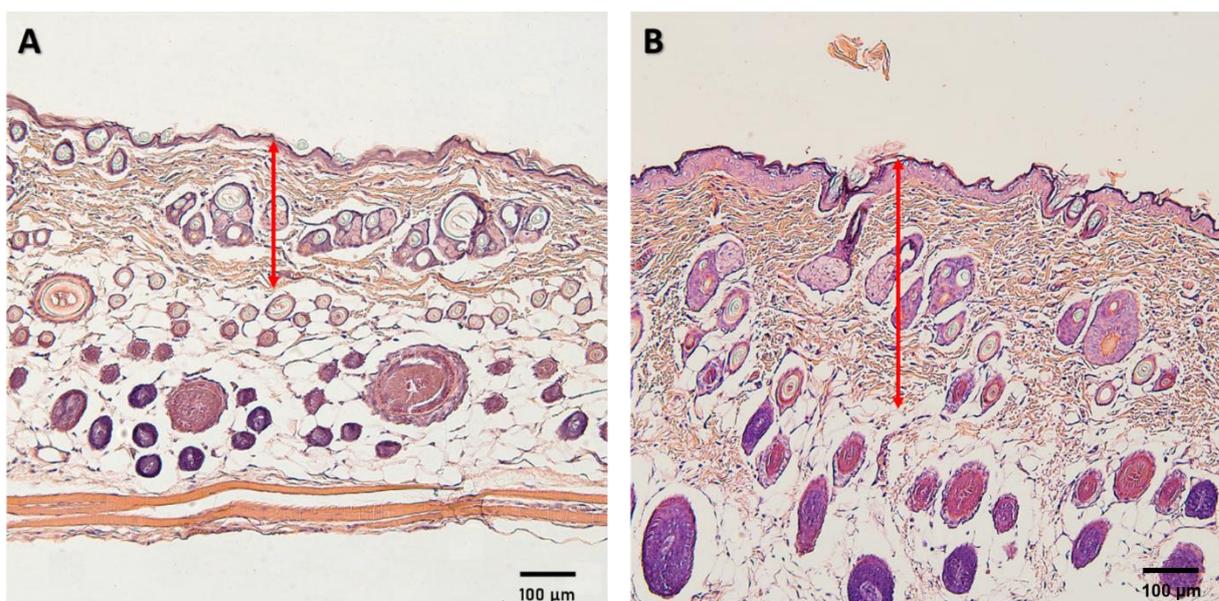


Figura 21. CTRLve: espessura de derme e epiderme.

Comparação entre espessura aproximada da derme e epiderme (indicadas pela dupla seta vermelha) de animal NAIVE (A) e animal CTRLve (B). Figuras A e B, HE 10x.

Fonte: elaborado pela autora, 2023.

Semelhantemente a CTRL-, fica evidente neste grupo o espessamento da derme em relação ao grupo NAIVE, secundário ao estímulo mecânico decorrente do comportamento de coçadura responsiva ao prurido ocasionado pelo desenvolvimento do modelo animal de dermatite atópica (Figura 21).

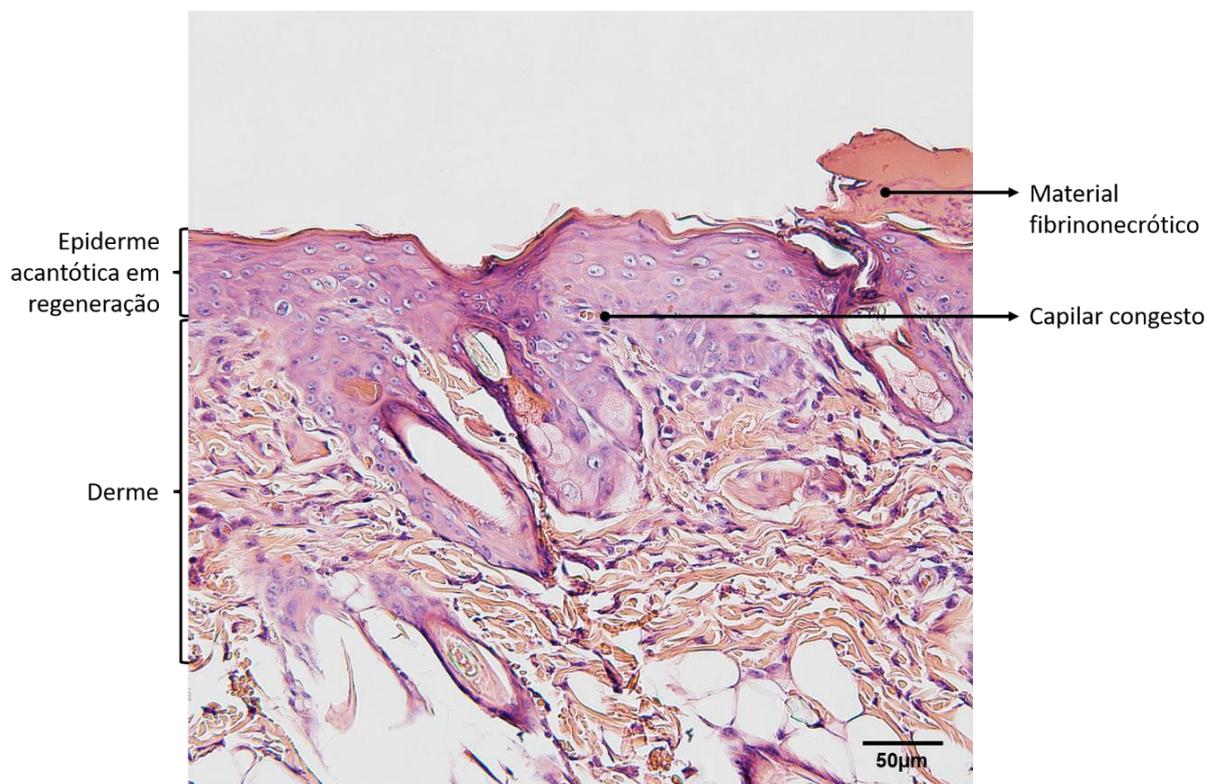


Figura 22. CTRLve: características histomorfológicas.

Região perilesional em fase de regeneração tecidual, com presença de epiderme acantótica grau 3, com camada granulosa ausente e recoberta por material fibrino-necrótico. Presença de capilares sanguíneos congestionados contendo hemácias em seu interior. HE 40x.

Fonte: elaborado pela autora, 2023.

Observa-se a presença de úlceras e crostas em 61% dos fragmentos analisados. É comum a presença, em áreas perilesionais ou sob epiderme acantótica, de espessamento colagenoso e certo paralelismo das fibras colágenas, indicativo de possível processo cicatricial prévio ao momento de coleta da amostra (Figura 22).

Análise morfológica descritiva do grupo CTRL+

No estrato córneo do grupo tratado com dexametasona houve predomínio do aspecto compactado da camada córnea embora, algumas tenham apresentado regiões com disposição paralela das lâminas de ceratina em “trançado de cesto” característico de ortoceratose lamelar. Estes achados, combinados, caracterizaram

68% das lâminas com alteração do processo de ceratinização. Algumas amostras apresentavam regiões ortoceratóticas preservadas.

Observou-se poucas úlceras na avaliação deste grupo. Apenas 14% das amostras apresentavam presença de úlceras ou crostas. O discreto e focal espessamento epidérmico observado neste grupo relacionou-se ao volume celular (hipertrofia) de ceratinócitos mais que ao número de camadas celulares. Das raras vezes em que foi visto presença de acantose, o número de camadas celulares não passava, via de regra, de 3.

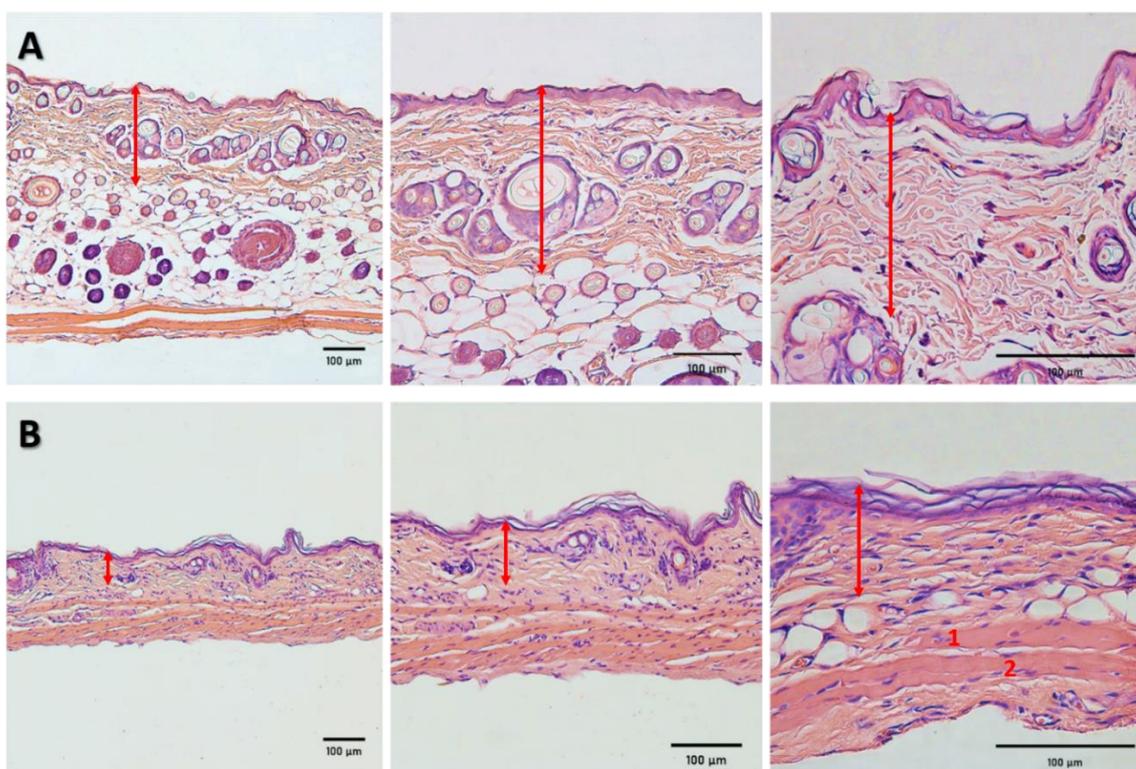


Figura 23. CTRL+: atrofia do epitélio por efeito de corticoterapia tópica.

Comparação entre cortes histológicos de pele hígida de animal NAIVE (A) e de animal CTRL+ (B).

Derme e epiderme representadas pela dupla seta vermelha. Os numerais 1 e 2 indicam, respectivamente, as estruturas do panículo carnoso e musculatura subcutânea, não visíveis em mesmo aumento na figura A. Figuras A e B, HE 10x, 20x e 40x, da esquerda para a direita.

Fonte: elaborado pela autora, 2023.

Uma redução significativa na espessura de todas as camadas celulares do epitélio foi observada em todos os fragmentos analisados para este grupo, caracterizando importante atrofia provocada pelo uso contínuo da corticoterapia tópica em todas as camadas epidérmicas, dificultando a análise morfométrica. Observou-se ausência quase total do tecido celular subcutâneo na maior parte dos fragmentos analisados. Uma comparação está ilustrada na Figura 23.

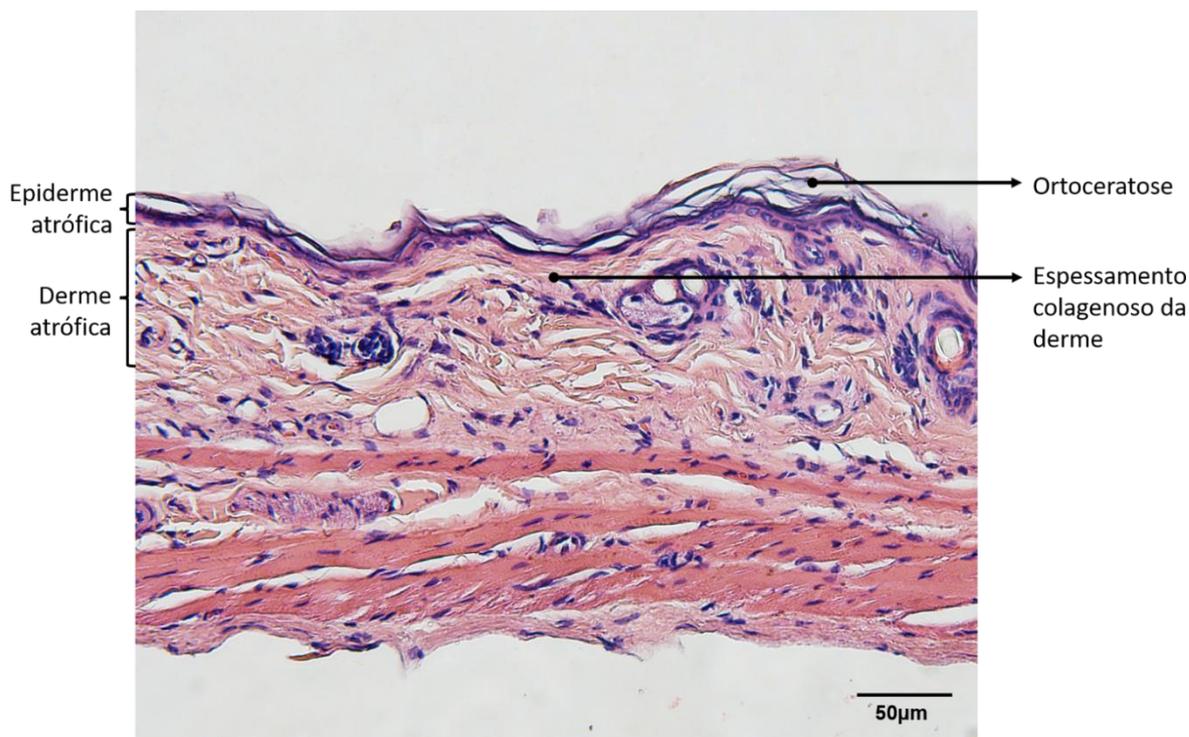


Figura 24. CTRL+: características histomorfológicas.

Região apresentando compactação e paralelismo de fibras colágenas em derme superficial correspondente à regeneração tecidual prévia, com presença de ortoceratose Atrofia de derme e epiderme, com ceratinócitos reduzidos de volume. HE 20x.

Fonte: elaborado pela autora, 2023.

Neste grupo, considerou-se o estrato granuloso com uma ou mais camadas celulares quando pôde ser identificado em alguma área do fragmento, estando ausente ou presente dependendo do campo microscópico observado. Quando ausente em toda extensão da epiderme, foi considerado ausente. Os ceratinócitos epidérmicos assumiam um aspecto fusiforme dando, inclusive, a impressão de ter seu número reduzido, e o estrato granuloso raramente foi identificado (Figura 24). Quando presente, mesmo que focalmente, foi considerada 1 camada celular, sendo por isso classificado como baixa frequência de hipergranulosidade (13%).

Análise morfológica do grupo PERESKIN

A ortoceratose esteve presente na grande maioria as lâminas, caracterizando o índice de 91% deste parâmetro no grupo tratado com PereSkin. Apenas 9% das lâminas avaliadas demonstrou algum grau de paraceratose.

Observou-se, com frequência, uma epiderme com baixo grau de acantose mesmo quando sob escamo-crostas, nas bordas de lesões recentes ou já em fase

avançada de processo cicatricial. Chama atenção as células epidérmicas com hiper cromasia nuclear e provável atividade mitótica. Este estado proliferativo, no entanto, não promoveu acantose tão pronunciada neste grupo quando comparado aos grupos CTRL- e CTRLve. Uma comparação visual das espessuras da derme e epiderme entre estes está ilustrada na Figura 25.

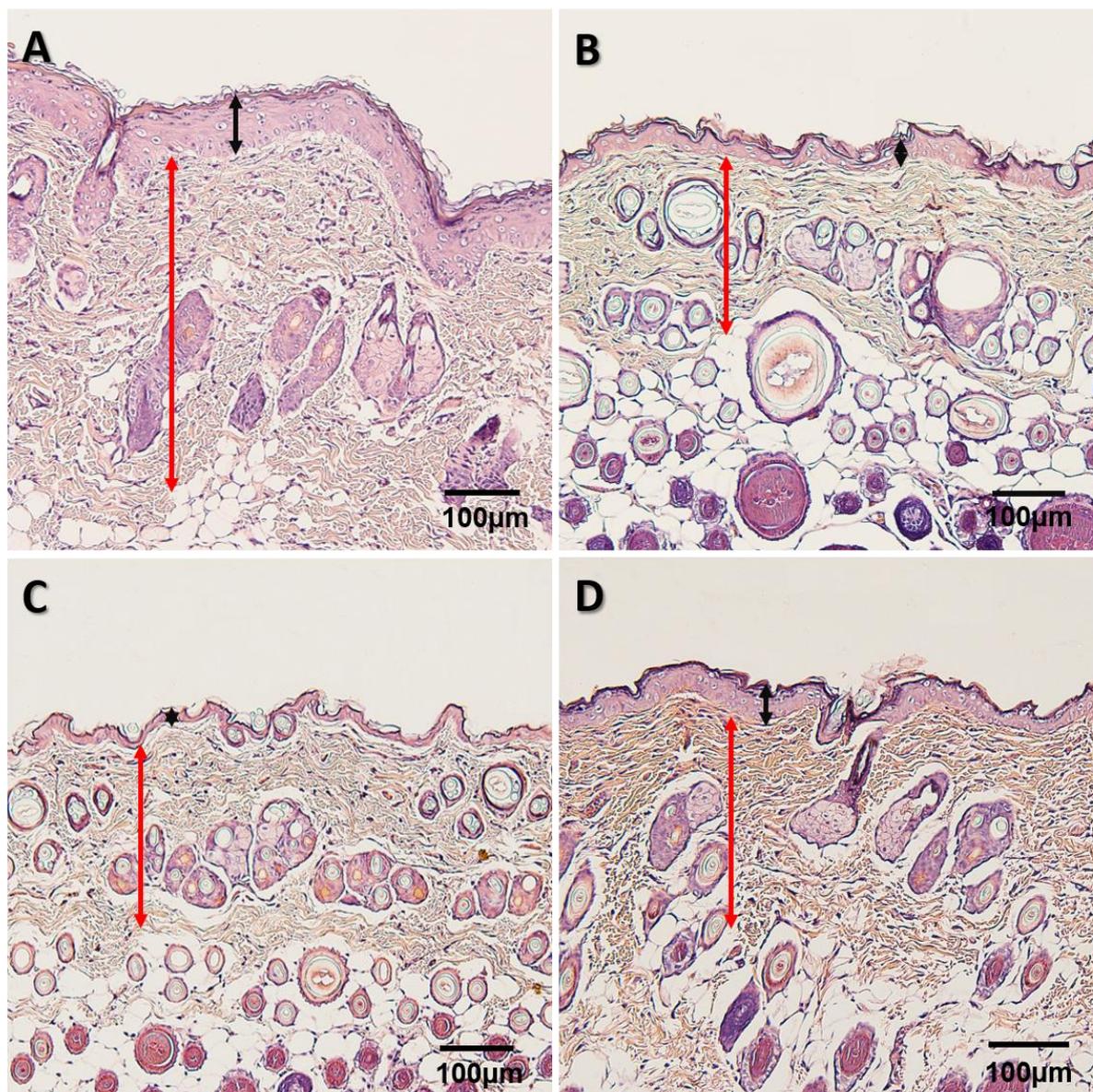


Figura 25. PERESKIN: espessura de derme e epiderme.

Comparação entre espessura aproximada da derme (indicado pela dupla seta vermelha) e epiderme (indicado pela dupla seta preta) de animal CTRL- (A), animal PERESKIN (B), animal NAIVE (C) e animal CTRLve (D). Figuras A, B, C e D, HE 10x.

Fonte: elaborado pela autora, 2023.

A derme, nestes animais, apresentou regiões de espessamento colagenoso sugestivo de reparo tecidual secundário à injúria prévia. Este parâmetro,

no entanto, não se mostrou necessariamente associado a regiões de acantose, como ilustra a Figura 26.

Nas regiões de acantose, muitas vezes foi possível observar um aumento no número de camadas celulares do estrato granuloso. Não foi tão frequente, no entanto, o acúmulo excessivo de grânulos intracelulares de queratohialina, caracterizando 38% de incidência de hipergranulose neste grupo.

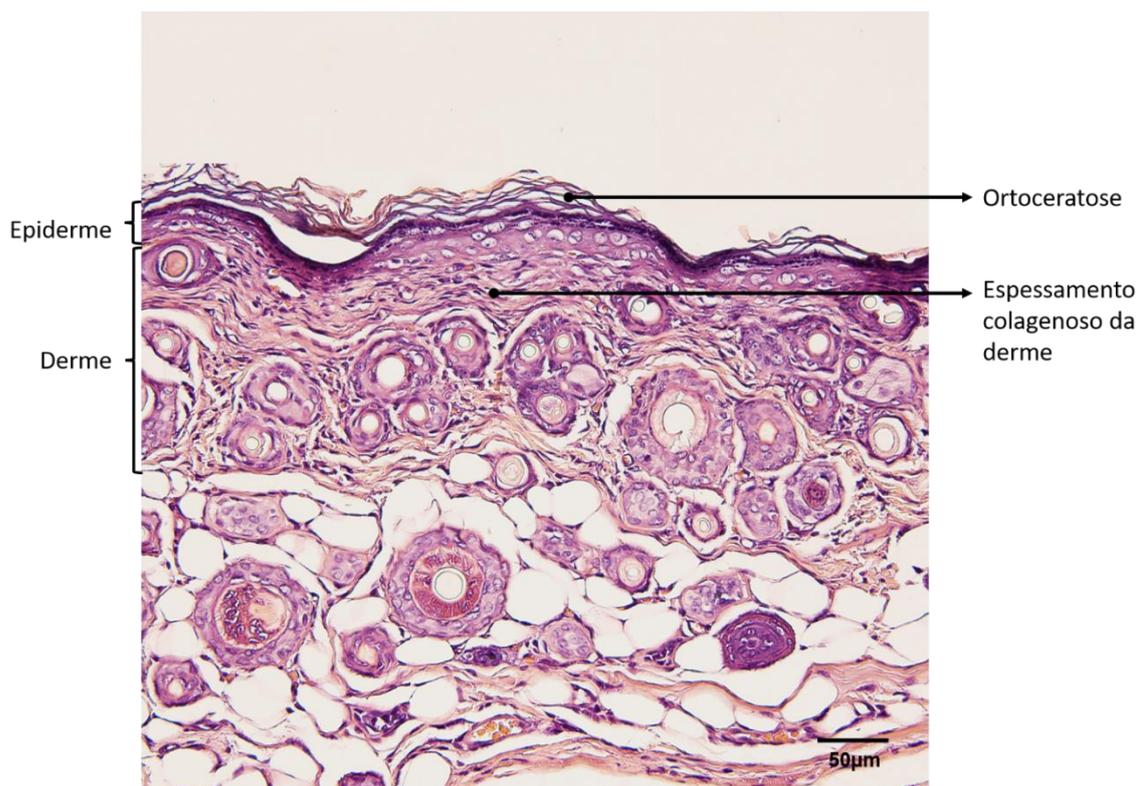


Figura 26. PERESKIN: características histomorfológicas.

Região apresentando compactação e paralelismo de fibras colágenas em quase toda extensão da derme visível, indicativo de regeneração tecidual prévia. Epiderme acantótica grau 1 com presença de ortoceratose. HE 20x.

Fonte: elaborado pela autora, 2023.

Embora seja tão frequente quanto nos demais grupos, excetuando o grupo tratado com glicocorticoides, a observação de úlceras ou crostas em 69% dos fragmentos histológicos avaliados não está necessariamente associada à presença de acantose, cuja distribuição está explicitada no sub item 4.3.2. Observou-se com frequência a presença de capilares ectasiados e congestionados na derme superficial.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, identificamos que o grupo tratado com PereSkin teve as medidas da espessura epidérmica significativamente reduzidas tanto em T1 quanto em T2, demonstrando uma ação de PereSkin relacionada à fatores responsáveis pela hiperproliferação celular dos ceratinócitos. Isso é relevante visto que os ceratinócitos estão envolvidos no desencadeamento do estado imunológico associado à DA. São a linha primária de células envolvidas na patogênese da doença, e é a partir de sua atividade tecidual que se desencadeia a produção de IgE, a migração leucocitária e a ativação de mastócitos e eosinófilos. IL-4 e IL-13 e TSLP estão envolvidos na redução de proteínas epidérmicas como FLG, ceratina e outras proteínas intracelulares, além de participarem da modulação que reduz a produção de peptídeos antimicrobianos e no desbalanço da resposta imune por parte dos ceratinócitos (DAS et al., 2022).

A redução da contagem de mastócitos é um parâmetro comumente utilizado para avaliar a modulação inflamatória de dada intervenção (HAN et al., 2020). Além da capacidade hidratante e emoliente já reportadas para a espécie, PereSkin demonstrou ação anti-inflamatória surpreendente, uma vez que EPA não possui metabólitos secundários geralmente associados a esse tipo de atividade biológica. PereSkin foi capaz de reduzir a contagem de mastócitos identificados por heterocromasia em amostras avaliadas por histoquímica nos animais tratados. A sinalização para recrutamento de células inflamatórias e os níveis de citocinas inflamatórias via células Th2 se encontram aumentados nos indivíduos atópicos. As maiores quantidades de células do infiltrado inflamatório como macrófagos, mastócitos, linfócitos, eosinófilos e células dendríticas e seus mediadores inflamatórios são característicos da doença (DAS et al., 2022).

O comportamento de se coçar está intimamente relacionado ao escore de dermatite na prática clínica, e também ao aumento dos níveis de IgE, bem como da espessura da epiderme (HONG et al., 2022). Os anticorpos IgE induzem a degranulação de mastócitos como marcador inflamatório representativo, além de induzir a diferenciação de células Th2 e o desencadeamento de respostas inflamatórias, como a infiltração de eosinófilos (DAS et al., 2022; HONG et al., 2022). O número reduzido de mastócitos em ambos os tempos de tratamento no grupo tratado com PereSkin parece indicar uma atividade anti-inflamatória decorrente do seu

uso contínuo. Embora tenha sido observada alguma melhora nos animais tratados apenas com o veículo para alguns parâmetros clínicos e histológicos, a contagem de mastócitos identificados por heterocromasia não apresentou redução estatística para este grupo quando comparado ao grupo controle negativo, revelando que não há atividade anti-inflamatória sendo exercida pelo veículo utilizado para a formulação de PereSkin, e que sua atividade se dá provavelmente pelo alívio do desconforto promovido pela hidratação conferida pela glicerina e pelo gel de natrosol de base aquosa. O grupo EPA apresentou significância estatística inclusive quando comparado aos animais NAIVE para a redução de mastócitos, confirmando a atividade anti-inflamatória de PereSkin.

Em relação aos resultados da extração das folhas de *P. aculeata*, os resultados obtidos estão de acordo com a literatura encontrada para a espécie. Foi anteriormente descrita a presença de minerais como cálcio, ferro, manganês, fósforo, zinco, sódio, magnésio e outros (MARTIN et al., 2017; TAKEITI et al., 2009). Isso está de acordo com o teor de cinzas encontrado nos testes realizados para este trabalho. Martin et al. (2017) encontraram valores semelhantes para o teor de carboidratos e proteínas a partir de uma extração que objetivava a conservação da porção mucilagínosa das folhas de *P. aculeata*, semelhantemente ao que foi realizado neste estudo. Os teores obtidos por estes pesquisadores foram de 48% e 19% para carboidratos e proteínas, respectivamente. Sierakowski et al. (1987) relataram a presença de 15% de proteínas e 41% de carboidratos. Outro trabalho, conduzido por Lima et al. (2013) encontrou valores semelhantes, descrevendo um total de 10% de proteínas e 47% de açúcares. Este estudo identificou a presença de aproximadamente 50% de carboidratos e 16% de proteínas, sendo plausível considerar que estas macromoléculas possam estar envolvidas na atividade biológica exercida por PereSkin.

Li et al. (2018) afirmam que um mesmo polissacarídeo pode induzir diferentes respostas celulares. Estudando os polissacarídeos derivados de vegetais, estes pesquisadores demonstraram a ativação de macrófagos principalmente via interação com receptores celulares específicos, conhecidos como receptores de reconhecimento de padrão (RRPs). Através da ativação destes receptores, pode ocorrer uma cascata de sinalização que leva à produção de fatores que modulam a cascata inflamatória, inibindo ou promovendo a inflamação (LI et al., 2018). Agostini-

Costa et al. (2020), Bessa (2020) e Oliveira (2023) também encontraram atividade imunomoduladora para a mucilagem obtida de *P. aculeata*.

Analisando sua atividade sobre o modelo animal da doença, o ganho de peso é um dos principais parâmetros clínicos que podem ser avaliados no estudo dos efeitos de determinada intervenção sobre animais jovens. A curva de ganho de peso esperada varia de acordo com a espécie e com a faixa etária estudada (NEVES, 2013). Neste trabalho, o grupo CTRL+, tratado com creme de dexametasona, um fármaco da classe dos glicocorticoides que constitui o medicamento tópico de eleição no tratamento de ataque à dermatite atópica, atingiu seu peso máximo com uma semana pós-desmame e demonstrou, a partir de então, uma curva com tendência decrescente, indicativa de perda de peso.

A classe dos glicocorticoides é normalmente utilizada na abordagem imediata de algumas doenças com objetivo de modular a resposta inflamatória (KIM et al., 2023; DRAELOS et al., 2019). Não obstante seja considerado um fármaco de ataque, seu uso muitas vezes ultrapassa o período de administração recomendado, tanto na prática da medicina humana quanto veterinária. Estes fármacos possuem efeitos adversos bem descritos na literatura, e interferem sobremaneira no desenvolvimento de indivíduos jovens. Atrofia da pele, redução do desenvolvimento, aumento da predisposição a infecções, hepatotoxicidade, dentre outros, são esperados como achados após tratamentos contínuos prolongados ou intermitentes (DRAELOS et al., 2019). Isto explica a curva de ganho de peso observada nos animais tratados com o fármaco controle positivo, assim como a atrofia de pele observada nesse estudo.

Paralelamente a isso, o grupo NAIVE demonstrou diferença estatística em relação a todos os animais que foram induzidos com o modelo animal por capsaicina, enquanto a menor diferença estatística foi em relação ao grupo CTRL-. Embora deva-se considerar o estresse causado pelo desenvolvimento das lesões não-tratadas, pode-se explicar este fato pela ausência de manipulação excessiva dos animais ao longo do experimento. Sabe-se que a manipulação humana é fator de estresse ambiental para os animais de experimentação (NEVES et al., 2013). O fato de os animais deste grupo não terem sido contidos para administração tópica de nenhum tipo de produto pode ter sido relevante para que se estressassem menos e, dessa forma, expressassem uma curva de ganho de peso melhor.

Alguns estudos avaliam os efeitos do estresse oxidativo através de marcadores biológicos no desenvolvimento da DA (BERTINO et al., 2020). Foi reportada a capacidade antioxidante de EPA, que é mantida em PereSkin, em estudos conduzidos paralelamente no LPNB por Oliveira (2023), por determinação em diferentes ensaios *in vitro*. Esta é uma atividade biológica de grande importância, principalmente em se tratando de um quadro de inflamação crônica de pele. A atividade dos radicais livres no epitélio pode afetar de forma significativa a capacidade de regeneração tecidual, impactando a restauração da barreira cutânea e perpetuando o ciclo de desenvolvimento dos sintomas atópicos. É possível que a atividade antioxidante esteja envolvida na melhora clínica dos animais vista através do escore de dermatite, embora não somente. A melhora no processo de reepitelização e de restauração da função da barreira cutânea também está associada à redução de prurido e do processo inflamatório associado.

De forma a potencializar a utilização de compostos como alternativa terapêutica, a associação de emolientes e/ou hidratantes pode ser incluída dentro da abordagem de controle e manutenção dos sintomas da doença (DAS et al., 2022). Hidratantes com função terapêutica para DA são formulados com ingredientes específicos que possuem ação sobre a manifestação de seus sintomas, como prurido, inflamação e comprometimento da função de barreira cutânea (HEBERT et al., 2020). Por si, a composição da formulação de PereSkin constitui um produto hidratante. A incorporação de agentes umectantes, como a glicerina, também beneficia a condição de hidratação da pele ao reter a água por meio de ligações moleculares (HEBERT et al., 2020). A extração da mucilagem das folhas de *P. aculeata* não foi capaz de tornar EPA um composto destituído de gorduras em sua composição, tornando PereSkin um produto cujo ativo pode incluir a presença de lipídeos, o que a classifica um produto emoliente e oclusivo. Os lipídeos, em suspensão ou emulsão, na composição de formulações de base água reduzem a perda de água transepidermica e exercem função de proteção contra agentes externos que possam desempenhar atividade alergênica (HEBERT et al., 2020). As formulações hidratantes com capacidade oclusiva são recomendadas pela sua capacidade de proteção, podendo estar envolvidas na redução do escore de dermatite ao exercer efeito calmante e melhorando a condição de hidratação, reduzindo a entrada de alérgenos e o prurido associado e, conseqüentemente, os danos provocados pelo estímulo mecânico ocasionado pelo ato de se coçar. Os emolientes são a terapia de primeira linha para

ressecamento da pele e fazem parte das terapias de manutenção na DA (PANAHI et al., 2020).

Considerando que prurido e ressecamento da pele são características marcantes da manifestação da DA, a restauração das condições de hidratação cutânea é um importante alvo terapêutico na manutenção da doença, principalmente ao considerarmos que a capacidade de retenção de água tecidual reflete na condição de disbiose local (BARBOSA et al., 2021). Sendo uma formulação gel de base água, PereSkin exerce efeitos de promoção da hidratação com o adendo de possuir em sua própria composição glicosídeos e proteínas que podem atuar de forma terapêutica sobre a pele atópica. A restauração da condição de hidratação da pele é responsável pelo abrandamento dos sintomas associados à doença, promovendo melhora na capacidade de barreira e reduzindo a entrada de alérgenos que desencadeiam o estado inflamatório crônico, melhorando tanto o aspecto clínico quanto morfológico da doença, como visto na incidência de parâmetros morfológicos e na descrição da morfologia tecidual realizada em conjunto com as análises histopatológicas. Além da atividade anti-inflamatória e antioxidante, a ação sobre as condições de hidratação e manutenção de barreira estão intimamente relacionadas aos efeitos sobre a estrutura da pele e dos sintomas associados à doença.

Hebert et al. (2020) publicaram uma revisão sistemática que revelou que o uso diário de produtos hidratantes é uma recomendação consistente para a manutenção da melhora da DA, sendo prescrita a sua utilização tanto sobre pele lesionada quanto não-lesionada (HEBERT et al., 2020). Outra revisão sistemática com meta-análise de estudos randomizados realizada por Zhong et al. (2022) avaliou a eficácia do tratamento profilático com emolientes nas 6 primeiras semanas de vida com objetivo de prevenir a DA na primeira infância, revelando que, embora não previna o desenvolvimento da doença, já que não é capaz de modular os fatores genéticos e ambientais responsáveis pela sua patogênese, o tratamento retarda o aparecimento dos sintomas e atenua os efeitos deletérios da perda de água transepidérmica na primeira infância (ZHONG et al., 2022). O uso contínuo de produtos como PereSkin pode ter grande impacto na vida de pacientes atópicos, considerando que o pico de manifestação da doença ocorre nos primeiros anos de vida. A promoção do alívio dos sintomas é de importância crucial, visto que a redução no bem estar afeta a condição geral e o pleno desenvolvimento físico e cognitivo de pacientes jovens. Paralelamente a isso, a manutenção das condições de hidratação

da pele ajuda a preservar a aparência do indivíduo, o que afeta sobremaneira suas interações sociais.

As formulações de uso tópico devem considerar, também, sua faixa de pH, idealmente encontrado entre 4-5, com objetivo de restabelecer o pH fisiológico da pele (HEBERT et al., 2020) A faixa de pH de PereSkin é cuidadosamente ajustada para valores no intervalo de 4 a 5. O pH cutâneo é fator importante na manutenção da homeostase, e a disbiose cutânea afeta diretamente a imunidade inata e o quadro inflamatório, além de pré-disponibilizar a região a infecções bacterianas secundárias crônicas (DAS et al., 2022). O microbioma é um dos principais fatores envolvidos na manutenção da barreira cutânea. Sua interação com o epitélio envolve principalmente a ativação de ceratinócitos da epiderme (DAS et al., 2022). Intervenções sobre a microbiota podem oferecer uma alternativa potencial de abordagem terapêutica para a dermatite atópica, sendo uma ferramenta auxiliar segura e benéfica para pacientes em tratamento e em manutenção (AMBROZEJ et al., 2021). Foi identificado um potencial modulador de microrganismos que compõem a microbiota cutânea para EPA em estudo realizado por Oliveira (2023). Conduzido paralelamente no LPNB, este estudo identificou que EPA foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus* e estimular o crescimento de *S. epidermidis* em ensaio *in vitro*, atuando na restauração e preservação da homeostase e da microbiota da pele (OLIVEIRA, 2023). Evidências sugerem que *Staphylococcus* comensais coagulase-negativas sejam responsáveis pela produção de peptídeos capazes de prevenir os danos epiteliais e a inflamação causada por *S. aureus* (DAS et al., 2022), e a modulação do microbioma da pele atópica pode reduzir a inflamação associada ao inibir a infecção por patógenos secundários, melhorando o quadro da doença.

Com os resultados obtidos até aqui, é possível sugerir que PereSkin possui ação sobre o abrandamento da inflamação cutânea, com conseqüente melhora de parâmetros clínicos e morfológicos associados ao desenvolvimento da dermatite atópica. Também é possível considerar que PereSkin possa ter alguma atividade modulatória sobre os ceratinócitos e suas vias de ativação imunológica. A redução da acantose observada em ambos os tempos de tratamento pode indicar que o uso contínuo do produto seja interessante na redução da hiperplasia epidérmica provocada pela inflamação e prurido na pele de indivíduos atópicos, tanto no sentido de evitar quanto de reduzir seu espessamento patológico. Parte dos resultados obtidos no presente trabalho podem ter sua explicação pautada pela regulação do

microbioma da pele através da correção de pH e da promoção do crescimento de microrganismos benéficos, ao mesmo tempo que da inibição da infecção por patógenos oportunistas. É possível que alguma parcela dos efeitos observados com o uso de PereSkin advinha da correção do pH no local de aplicação, além de uma importante atividade antioxidante sobre o sítio de inflamação que pode estar associada à melhora da capacidade de regeneração e manutenção da funcionalidade tecidual. Tomadas em conjunto, as observações resultantes das análises conduzidas neste estudo permitem considerar o produto PereSkin como uma alternativa terapêutica com objetivo de manutenção da dermatite atópica, visando reduzir a intensidade e a frequência das crises atópicas e melhorar a qualidade da pele dos indivíduos atópicos, tanto humanos quanto veterinários. A ausência de toxicidade da planta e a formulação hipoalergênica ao qual EPA é incorporado constituem uma alternativa segura e viável para uso em peles sensíveis. A composição de sua formulação inclui insumos amplamente conhecidos em relação à segurança da sua utilização, além de serem economicamente viáveis pelo seu baixo custo de obtenção, tornando a formulação PereSkin um produto de fácil reprodução e distribuição.

Outros estudos devem ser conduzidos para identificar os mecanismos de ação envolvidos nos resultados obtidos até aqui. A análise dos níveis de citocinas, de ativação celular de linhagens Th2, CD4+ e de ceratinócitos pode ser um alvo interessante para estudos de continuação deste trabalho. Outro possível alvo de investigação da ação de PereSkin sobre a espessura da epiderme e a inibição da inflamação seria em relação à produção de anticorpos IgE, a expressão de FLG e de interleucinas associadas, como IL-4, -5 e -13. Visto que a patogênese da DA está relacionada primariamente a um desbalanço no processo de ativação e diferenciação de ceratinócitos, modulada por IL-1 e IL-4 ou diretamente induzida por alérgenos, a interação de PereSkin com estas células também é de importante elucidação.

As imagens que registram a evolução clínica semanal dos animais corroboram com as conclusões deste estudo, e revelam ainda que pode haver melhora, além de no aspecto da pele, também no aspecto da cobertura pilosa dos animais tratados, o que é de grande interesse para a abordagem veterinária da doença. Maiores estudos devem, entretanto, investigar esta possível atividade.

6 CONCLUSÃO

Com este trabalho conclui-se que PereSkin foi capaz de reduzir os sintomas associados à dermatite atópica induzida por capsaicina em ratos Wistar, exercendo efeitos de imunomodulação e restauração da função de barreira cutânea. Estes resultados indicam que PereSkin pode ser útil no tratamento coadjuvante e de manutenção de pacientes atópicos. Além disto, PereSkin é um produto que possui viabilidade para reprodução industrial. Outros estudos devem ser conduzidos para elucidar as vias de ação envolvidas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINI-COSTA, T. S. Bioactive compounds and health benefits of Pereskioideae and Cactoideae: A review. *Food Chemistry*, v. 327, p. 126961, 2020.

ALMEIDA FILHO, J. de; CAMBRAIA, J. [A study of the nutritive value of *Pereskia aculeata* Mill. [protein source in human and animal consumption]]. [Portuguese]. *Revista Ceres*, 1974.

ALMEIDA FILHO, J.; CAMBRAIA, J. Estudo do valor nutritivo de “Ora-pro-nóbis” (*Pereskia aculeata* Mill). *Revista Ceres*, Viçosa, v. 21, p. 105-111, 1974.

ALMEIDA, M. E. F.; CORRÊA, A. D. Utilização de cactáceas do gênero *Pereskia* na alimentação humana em um município de Minas Gerais. *Ciência Rural*, v. 42, p. 751-756, 2012.

AMARAL, T. N., JUNQUEIRA, L. A., TAVARES, L. S., OLIVEIRA, N. L., PRADO, M. E. T., & de RESENDE, J. V. Effects of salts and sucrose on the rheological behavior, thermal stability, and molecular structure of the *Pereskia aculeata* Miller mucilage. *International journal of biological macromolecules*, v. 131, p. 218-229, 2019.

AMBROŽEJ, D., KUNKIEL, K., DUMYCZ, K., & FELESZKO, W. The use of probiotics and bacteria-derived preparations in topical treatment of atopic dermatitis—A systematic review. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, v. 9, n. 1, p. 570-575. e2, 2021.

ANDRADE, T. C., DE FREITAS, P. H. S., RIBEIRO, J. M., DE FARIA PINTO, P., DE SOUZA-FAGUNDES, E. M., SCIO, E., & RIBEIRO, A. Avaliação da atividade antioxidante e imunomoduladora dos metabólitos primários de *Pereskia aculeata* Miller. *BIOFARM-Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management*, v. 17, n. 2, 2021.

ANTUNES, A. A., SOLÉ, D., CARVALHO, V. O., BAU, A. E. K., KUSCHNIR, F. C., MALLOZI, M. C., & SILVA, L. Guia prático de atualização em dermatite atópica-Parte I: etiopatogenia, clínica e diagnóstico. Posicionamento conjunto da Associação Brasileira de Alergia e Imunologia e da Sociedade Brasileira de Pediatria. *Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia*, v. 1, n. 2, p. 131-156, 2017.

ATIAKSHIN, D.; BUCHWALOW, I.; TIEMANN, M. Mast cells and collagen fibrillogenesis. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 154, n. 1, p. 21-40, 2020.

BACK, S. K., JEONG, K. Y., LI, C., LEE, J., LEE, S. B., & NA, H. S. Chronically relapsing pruritic dermatitis in the rats treated as neonate with capsaicin; a potential rat model of human atopic dermatitis. *Journal of dermatological science*, v. 67, n. 2, p. 111-119, 2012.

BALOGUN, F. O., ASHAFI, A. O. T., SABIU, S., AJAO, A. A. N., PERUMAL, P. C., KAZEEM, M. I., & ADEDEJI, A. A. Pharmacognosy: importance and drawbacks. *Pharmacognosy-Medicinal Plants*, p. 1-19, 2019.

BÁNVÖLGYI, Á., PÁLINKÁS, L., BERKI, T., CLARK, N., GRANT, A. D., HELYES, Z., ... & PINTÉR, E. Evidence for a novel protective role of the vanilloid TRPV1 receptor in a cutaneous contact allergic dermatitis model. *Journal of neuroimmunology*, v. 169, n. 1-2, p. 86-96, 2005.

BARBOSA, A. I., TORRES, T., LIMA, S. A. C., & REIS, S. Hydrogels: A Promising Vehicle for the Topical Management of Atopic Dermatitis. *Advanced Therapeutics*, v. 4, n. 7, p. 2100028, 2021.

BERTINO, L., GUARNERI, F., CANNAVÒ, S. P., CASCIARO, M., PIOGGIA, G., & GANGEMI, S. Oxidative stress and atopic dermatitis. *Antioxidants*, v. 9, n. 3, p. 196, 2020.

BESSA, M. E. Avaliação do potencial prebiótico de *Pereskia aculeata* Miller (Cactaceae) e os efeitos de sua ingestão com linhagens de bactérias ácido lácticas, sobre as desordens metabólicas de ratos Wistar causadas por superalimentação. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2020

BIEBER, T. How to define atopic dermatitis?. *Dermatologic clinics*, v. 35, n. 3, p. 275-281, 2017.

BIEBER, T. Interleukin-13: targeting an underestimated cytokine in atopic dermatitis. *Allergy*, v. 75, n. 1, p. 54-62, 2020.

BRASIL. Portaria Nº 971, de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, 04 maio 2006

BRUNNER, P. M.; GUTTMAN-YASSKY, Emma; LEUNG, Donald YM. The immunology of atopic dermatitis and its reversibility with broad-spectrum and targeted therapies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 139, n. 4, p. S65-S76, 2017.

CABEZÓN-GUTIÉRREZ, L., CUSTODIO-CABELLO, S., PALKA-KOTLOWSKA, M., & KHOSRAVI-SHAHI, P. High-dose 8% capsaicin patch in treatment of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. A systematic review. *Journal of Pain and Symptom Management*, v. 60, n. 5, p. 1047-1054. e1, 2020.

CAMPOLO, M.; CASILI, G.; PTERNITI, I.; FILIPPONE, A.; LANZA, M.; ARDIZZONE, A.; SCUDERI, S.A.; CUZZOCREA, S.; ESPOSITO, E. Effect of a Product Containing Xyloglucan and Pea Protein on a Murine Model of Atopic Dermatitis. *Int. J. Mol. Sci.* V. 21, p. 3596, 2020.

CAÑEDO-DORANTES, L.; CAÑEDO-AYALA, M. Skin acute wound healing: a comprehensive review. *International journal of inflammation*, v. 2019, 2019.

CARRILLO, P., CAMACHO, M., MANZO, J., MARTINEZ-GOMEZ, M., SALAS, M., & PACHECO, P. Cutaneous wounds produced by capsaicin treatment of newborn rats are due to trophic disturbances. *Neurotoxicology and teratology*, v. 20, n. 1, p. 75-81, 1998.

CASTRO SOUZA, J. D., ESTEVÃO, L. R. D. M., BARATELLA-EVÊNCIO, L., VIEIRA, M. G. F., SIMÕES, R. S., FLORENCIO-SILVA, R., ... & EVÊNCIO-NETO, J. Mast cell concentration and skin wound contraction in rats treated with *Ximenia americana* L. *Acta Cirurgica Brasileira*, v. 32, p. 148-156, 2017.

CATERINA, M. J., SCHUMACHER, M. A., TOMINAGA, M., ROSEN, T. A., LEVINE, J. D., & JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, v. 389, n. 6653, p. 816-824, 1997.

CHANDA, S., BASHIR, M., BABBAR, S., KOGANTI, A., & BLEY, K. In vitro hepatic and skin metabolism of capsaicin. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 36, n. 4, p. 670-675, 2008.

CHANG, Q.-X.; LYU, J.-L.; WU, P.-Y.; WEN, K.-C.; CHANG, C.-C.; CHIANG, H.-M. Coffea arabica Extract Attenuates Atopic Dermatitis-like Skin Lesions by Regulating NLRP3 Inflammasome Expression and Skin Barrier Functions. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 24, p. 12367, 2023.

CHEN, X., ZHANG, W., DOU, Y., SONG, T., SHEN, S., & DOU, H. Applications of asymmetrical flow field-flow fractionation for separation and characterization of polysaccharides: A review. *Journal of Chromatography A*, v. 1635, p. 461726, 2021.

CHOI, J. Y., DAWE, R., IBBOTSON, S., FLEMING, C., DONEY, A., & FOERSTER, J. Quantitative analysis of topical treatments in atopic dermatitis: unexpectedly low use of emollients and strong correlation of topical corticosteroid use both with depression and concurrent asthma. *British Journal of Dermatology*, v. 182, n. 4, p. 1017-1025, 2020.

CRUZ, T. M., SANTOS, J. S., DO CARMO, M. A. V., HELLSTRÖM, J., PIHLAVA, J. M., AZEVEDO, L., ... & MARQUES, M. B. Extraction optimization of bioactive compounds from ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) leaves and their in vitro antioxidant and antihemolytic activities. *Food chemistry* v. 361, p. 130078, 2021.

DAS, P.; MOUNIKA, P.; YELLURKAR, M.L.; PRASANNA, V.S.; SARKAR, S.; VELAYUTHAM, R.; ARUMUGAM, S. Keratinocytes: An Enigmatic Factor in Atopic Dermatitis. *Cells*, v. 11, p. 1683, 2022.

DAVIS, J. B., GRAY, J., GUNTHORPE, M. J., HATCHER, J. P., DAVEY, P. T., OVEREND, P., ... & SHEARDOWN, S. A. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*, v. 405, n. 6783, p. 183-187, 2000.

DE MIRANDA SOUZA, M. R., PEREIRA, P. R. G., MAGALHÃES, I. D. P. B., SEDIYAMA, M. A. N., VIDIGAL, S. M., MILAGRES, C. S. F., & BARACAT-PEREIRA, M. C. Mineral, protein and nitrate contents in leaves of *Pereskia aculeata* subjected to nitrogen fertilization. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 46, n. 1, p. 43-50, 2016.

DE MORAES, T. V., MONTENEGRO, J., MARQUES, T. S., EVANGELISTA, L. M., ROCHA, C. B., TEODORO, A. J., ... & MOREIRA, R. F. A. Perfil fitoquímico e atividade antioxidante de flores e frutos de *Pereskia aculeata* Miller. *Scientia Plena*, v. 17, n. 5, 2021.

DENDA, M., SOKABE, T., FUKUMI-TOMINAGA, T., & TOMINAGA, M. Effects of skin surface temperature on epidermal permeability barrier homeostasis. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 127, n. 3, p. 654-659, 2007.

DENDA, M., & TSUTSUMI, M. Roles of transient receptor potential proteins (TRPs) in epidermal keratinocytes. *Transient Receptor Potential Channels*, p. 847-860, 2011.

DRAELOS, Z. D., FELDMAN, S. R., BERMAN, B., OLIVADOTI, M., SIERKA, D., TALLMAN, A. M., ... & BALDWIN, S. Tolerability of topical treatments for atopic dermatitis. *Dermatology and Therapy*, v. 9, p. 71-102, 2019.

DRAGAN, E. S.; DINU, M. V. Polysaccharides constructed hydrogels as vehicles for proteins and peptides. A review. *Carbohydrate polymers*, v. 225, p. 115210, 2019.

DRISLANE, C.; IRVINE, A. D. The role of filaggrin in atopic dermatitis and allergic disease. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, v. 124, n. 1, p. 36-43, 2020.

DRUCKER, A. M., ELLIS, A. G., BOHDANOWICZ, M., MASHAYEKHI, S., YIU, Z. Z., ROCHWERG, B., ... & FLOHR, C. Systemic immunomodulatory treatments for patients with atopic dermatitis: a systematic review and network meta-analysis. *JAMA dermatology*, v. 156, n. 6, p. 659-667, 2020.

DUARTE, M. R.; HAYASHI, S. S. Estudo anatômico de folha e caule de *Pereskia aculeata* Mill. (Cactaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15, p. 103-109, 2005.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Nature*, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

ELIAS, P. M.; WAKEFIELD, J. S.; MAN, M. Q. Moisturizers versus current and next-generation barrier repair therapy for the management of atopic dermatitis. *Skin Pharmacology and Physiology*, v. 32, n. 1, p. 1-7, 2019.

ELOKELY, K., VELISETTY, P., DELEMOTTE, L., PALOVCAK, E., KLEIN, M. L., ROHACS, T., & CARNEVALE, V. Understanding TRPV1 activation by ligands: Insights from the binding modes of capsaicin and resiniferatoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 113, n. 2, p. E137-E145, 2016.

ENGEL, R. G., KRIZ, G. S., LAMPMAN, G. M., & PAVIA, D. L. Química Orgânica experimental: técnicas de escala pequena. *Tradução de Solange Aparecida Visconti*, v. 3, 2012.

EUROMONITOR INTERNATIONAL. Natural and organic beauty: a price segmentation analysis. *In: Health and beauty*. 08 set. 2019. Disponível em: <<http://www.euromonitor.com/article/natural-vs-organic-beauty-a-price-segmentation-analysis>>. Acesso em: 9 fev. 2020.

FANG Z, LI L, ZHANG H, ZHAO J, LU W, CHEN W. Gut Microbiota, Probiotics, and Their Interactions in Prevention and Treatment of Atopic Dermatitis: A Review. *Front Immunol.*, v. 12, p. 720393, 2021.

FATTORI, V., HOHMANN, M. S., ROSSANEIS, A. C., PINHO-RIBEIRO, F. A., & VERRI JR, W. A. Capsaicin: current understanding of its mechanisms and therapy of pain and other pre-clinical and clinical uses. *Molecules*, v. 21, n. 7, p. 844, 2016.

FERREIRA, L. G. B., FARIA, J. V., DOS SANTOS, J. P. S., & FARIA, R. X. Capsaicin: TRPV1-independent mechanisms and novel therapeutic possibilities. *European Journal of Pharmacology*, v. 887, p. 173356, 2020.

GAO, Q. H., FU, X., ZHANG, R., WANG, Z., & GUO, M. Neuroprotective effects of plant polysaccharides: A review of the mechanisms. *International journal of biological macromolecules*, v. 106, p. 749-754, 2018.

GIRÃO, L. V. C., SILVA FILHO, J. C., PINTO, J. E. B. P., & BERTOLUCCI, S. K. V. Avaliação da composição bromatológica de ora-pro-nóbis. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 21, n. 2, p. 411-403, 2003.

GOKARNESHAN, N. Application of natural polymers and herbal extracts in wound management. *Advanced textiles for wound care*, p. 541-561, 2019.

GONÇALVES, B. H. R., MATOS, B. D., FALEIRO, M. B. R., ARNHOLD, E., MATOS, M. P. C., SANTIN, A. P. I., & MOURA, V. M. B. D. D. Correlation between clinical findings, mast cell count and interleukin 31 immunostaining in the skin of dogs with atopic dermatitis. *Ciência Rural*, v. 48, 2018.

GRAN VIEW RESEARCH. Natural cosmetics market size, share, trends analysis report by product (skin care, hair care, fragrance, color cosmetics), by distribution channel (supermarket/hypermarket, online), and segment forecasts, 2019 – 2025. *In: Market Analysis Report*. GVR-2-68038-857-2. 26 abr. 2019. Disponível em: <<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/natural-cosmetics-market>>. Acesso em: 9 fev. 2020.

HAN, E. J., FERNANDO, I. P. S., KIM, H. S., JEON, Y. J., MADUSANKA, D. M. D., DIAS, M. K. H. M., ... & AHN, G. Oral administration of sargassum horneri improves the HDM/DNCB-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Nutrients*, v. 12, n. 8, p. 2482, 2020.

HANSON, S. M., NEWSTEAD, S., SWARTZ, K. J., & SANSOM, M. S. Capsaicin interaction with TRPV1 channels in a lipid bilayer: molecular dynamics simulation. *Biophysical journal*, v. 108, n. 6, p. 1425-1434, 2015.

HEBERT, A. A., RIPPKE, F., WEBER, T. M., & NICOL, N. H. Efficacy of Nonprescription Moisturizers for Atopic Dermatitis: An Updated Review of Clinical Evidence. *Am J Clin Dermatol*. v. 21, p. 641–655, 2020.

HIURA, Akio. Neuroanatomical effects of capsaicin on the primary afferent neurons. *Archives of histology and cytology*, v. 63, n. 3, p. 199-215, 2000.

HOLZER, P.; LIPPE, I. Th. Stimulation of afferent nerve endings by intragastric capsaicin protects against ethanol-induced damage of gastric mucosa. *Neuroscience*, v. 27, n. 3, p. 981-987, 1988.

HONG, S.; KIM, E.-Y.; LIM, S.-E.; KIM, J.-H.; SOHN, Y.; JUNG, H.-S. Dendrobium nobile Lindley Administration Attenuates Atopic Dermatitis-like Lesions by Modulating Immune Cells. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 23, p. 4470, 2022.

INOUE, M.; HAYASHI, S.; CRAKER, L. E. Role of Medicinal and Aromatic Plants: Past, Present, and Future. In: PERVEEN, S.; AL-TAWHEEL, A. *Pharmacognosy-Medicinal Plants*. IntechOpen, 2019.

ISHIDA-YAMAMOTO, A., & IGAWA, S. Genetic skin diseases related to desmosomes and corneodesmosomes. *Journal of Dermatological Science*, v. 74, n. 2, p. 99-105, 2014.

JUNQUEIRA, L. A., AMARAL, T. N., LEITE OLIVEIRA, N., PRADO, M. E. T., & DE RESENDE, J. V. Rheological behavior and stability of emulsions obtained from *Pereskia aculeata* Miller via different drying methods. *International Journal of Food Properties*, v. 21, n. 1, p. 21-35, 2018.

KABAT, E. A.; MAYER, M. M. Kjeldahl nitrogen determination. In C. C. Thomas (Ed.), *Experimental Immunochemistry*. Springfield: Bannerstone House, 1964.

KAWASAKI, H., NAGAO, K., KUBO, A., HATA, T., SHIMIZU, A., MIZUNO, H., ... & AMAGAI, M. Altered stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin-null mice. *Journal of allergy and clinical immunology*, v. 129, n. 6, p. 1538-1546. e6, 2012.

KIM, J.; KIM, B. E.; LEUNG, D. Y. M. Pathophysiology of atopic dermatitis: Clinical implications. In: *Allergy and asthma proceedings*. OceanSide Publications, p. 84. 2019.

KIM, S., BACK, S. K., NA, H. S., & KEE, S. H. Capsaicin induces atopic dermatitis-like manifestations through dysregulation of proteolytic system and alteration of filaggrin processing in rats. *Experimental Dermatology*, v. 27, n. 4, p. 332-339, 2018.

KIM, Y. E., JUNG, H. Y., PARK, N., & KIM, J. Adhesive Composite Hydrogel Patch for Sustained Transdermal Drug Delivery To Treat Atopic Dermatitis. *Chemistry of Materials*, v. 35, n. 3, p. 209-1217., 2023.

KINUPP, V. F.; BARROS, I. B. I. Teores de proteína e minerais de espécies nativas, potenciais hortaliças e frutas. *Food Science and Technology*, v. 28, p. 846-857, 2008.

KLEINMAN, E., LABORADA, J., METTERLE, L., & EICHENFIELD, L. F. What's new in topicals for atopic dermatitis?. *American Journal of Clinical Dermatology*, v. 23, n. 5, p. 595-603, 2022.

KOPARDE, A. A.; DOIJAD, R. C.; MAGDUM, C. S. Natural products in drug discovery. In: *Pharmacognosy-medicinal plants*. IntechOpen, 2019.

KUZNETSOVA, T. A., ANDRYUKOV, B. G., BESEDNOVA, N. N., ZAPOROZHETS, T. S., & KALININ, A. V. Marine algae polysaccharides as basis for wound dressings, drug delivery, and tissue engineering: A review. *Journal of Marine Science and Engineering*, v. 8, n. 7, p. 481, 2020.

LAI-CHEONG, J. E.; MCGRATH, J. A. Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine*, v. 49, n. 6, p. 337-342, 2021.

LAS PEÑAS, M. L., URDAMPILLETA, J. D., LÓPEZ-CARRO, B., SANTIÑAQUE, F., KIESLING, R., & BERNARDELLO, G. Classical and molecular cytogenetics and DNA content in *Maihuenia* and *Pereskia* (Cactaceae). *Plant Systematics and Evolution*, v. 300, p. 549-558, 2014.

LEUENBERGER, B. E. *Pereskia*, *Maihuenia*, and *Blossfeldia*—taxonomic history, updates, and notes. *Haseltonia*, v. 2008, n. 14, p. 54-93, 2008.

LI, Q., NIU, Y., XING, P., & WANG, C. Bioactive polysaccharides from natural resources including Chinese medicinal herbs on tissue repair. *Chinese medicine*, v. 13, n. 1, p. 1-11, 2018.

LIMA, F. A., JR.; CAVALCANTE, C. M.; RESENDE DE, J. V.; JUNQUEIRA, L. A.; PEREIRA, C. G.; PRADO, M. E. T. (2013). Response surface methodology for optimization of the mucilage extraction process from *Pereskia aculeata* Miller. *Food Hydrocolloids*, v. 33, p. 38-47, 2013.

LUK, D., HON, K. L. E., DIZON, M. V. C., LEONG, K. F., TAY, Y. K., KOH, M. J. A., ... & LUGER, T. Practical recommendations for the topical treatment of atopic dermatitis in South and East Asia. *Dermatology and therapy*, v. 11, p. 275-291, 2021.

MARQUES, J. A.; BORGES, C. P. F. *Práticas de Química Orgânica*. Editora Átomo, Campinas-SP, 2007.

MARTIN, A. A., DE FREITAS, R. A., SASSAKI, G. L., EVANGELISTA, P. H. L., & SIERAKOWSKI, M. R. Chemical structure and physical-chemical properties of mucilage from the leaves of *Pereskia aculeata*. *Food Hydrocolloids*, v. 70, p. 20-28, 2017.

MATOS, F.J. A. *Introdução à Fitoquímica Experimental*. 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997, 141p

MENDES, V. A.; STOCCO, P.; DE LARA, A. C.; DE OLIVEIRA, C. M.; LISBOA, H. C. F. Avaliação do uso de produtos naturais na prática do profissional de saúde. *Saúde (Santa Maria)*, v. 44, n. 1, 2018.

MERCÊ, A. L. R., LANDALUZE, J. S., MANGRICH, A. S., SZPOGANICZ, B., & SIERAKOWSKI, M. R. Complexes of arabinogalactan of *Pereskia aculeata* and Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , and Ni^{2+} . *Bioresource Technology*, v. 76, n. 1, p. 29-37, 2001.

MIHARA, K., KURATANI, K., MATSUI, T., NAKAMURA, M., & YOKOTA, K. Vital role of the itch-scratch response in development of spontaneous dermatitis in NC/Nga mice. *British Journal of Dermatology*, v. 151, n. 2, p. 335-345, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares*. Brasília, 2019.

MINJARES-FUENTES, R., FEMENIA, A., COMAS-SERRA, F., & RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, V. M. Compositional and structural features of the main bioactive

polysaccharides present in the Aloe vera plant. *Journal of AOAC International*, v. 101, n. 6, p. 1711-1719, 2018.

MINTAH, S. O.; ASAFO-AGYEI, T.; ARCHER, M. A.; JUNIOR, P. A. A.; BOAMAHD., KUMADOH, D.; APPIAH, A.; OCLOO, A.; BOAKYE, D.; AGYARE, C. Medicinal Plants for Treatment of Prevalent Diseases. In: PERVEEN, S.; AL-TAWEEL, A. Pharmacognosy Medicinal Plants. IntechOpen, 2019

MÓZSIK, G.; SZOLCSÁNYI, J.; RÁCZ, I. Gastroprotection induced by capsaicin in healthy human subjects. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, v. 11, n. 33, p. 5180, 2005.

NAKAHARA, T., KIDO-NAKAHARA, M., TSUJI, G., & FURUE, M. Basics and recent advances in the pathophysiology of atopic dermatitis. *The Journal of dermatology*, v. 48, n. 2, p. 130-139, 2021.

NASERI, V., CHAVOSHZADEH, Z., MIZANI, A., DANESHFARD, B., GHAFFARI, F., ABBAS-MOHAMMADI, M., ... NASERI, M. Effect of topical marshmallow (*Althaea officinalis*) on atopic dermatitis in children: A pilot double-blind active-controlled clinical trial of an in-silico -analyzed phytomedicine. *Phytotherapy Research*, v. 35, n. 3, p. 1389–1398, 2020.

NICZYPORUK, M. Rat skin in experimental medicine. *Prog Health Sci*, v. 8, n. 2, 2018.

NELSON, E. K. The constitution of capsaicin, the pungent principle of capsicum. *Journal of the American Chemical Society*, v. 41, n. 7, p. 1115-1121, 1919.

NELSON, E. K.; DAWSON, L. E. The constitution of capsaicin, the pungent principle of Capsicum. III. *Journal of the American Chemical Society*, v. 45, n. 9, p. 2179-2181, 1923.

NEVES, S. M. P.; FILHO, J. M.; MENEZES, E. W. DE. Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do biotério de produção e experimentação da FCF-IQ/USP. Disponível em: <<https://www.livrosabertos.sibi.usp.br/portaldelivrosUSP/catlog/view/46/39/179>>. Acesso em: 04 jan. 2023.

NYFFELER, R. Phylogenetic relationships in the cactus family (Cactaceae) based on evidence from trnK/matK and trnL-trnF sequences. *American Journal of Botany*, v. 89, n. 2, p. 312-326, 2002.

NYGAARD, U.; DELEURAN, M.; VESTERGAARD, C. Emerging treatment options in atopic dermatitis: topical therapies. *Dermatology*, v. 233, n. 5, p. 333-343, 2017.

OGBURN, R. M.; EDWARDS, Erika J. The ecological water-use strategies of succulent plants. In: *Advances in botanical research*. Academic Press, 2010. p. 179-225.

OLIVEIRA, N. L., RODRIGUES, A. A., NEVES, I. C. O., LAGO, A. M. T., BORGES, S. V., & DE RESENDE, J. V. Development and characterization of biodegradable films based on *Pereskia aculeata* Miller mucilage. *Industrial crops and products*, v. 130, p. 499-510, 2019.

OLIVEIRA, N. N. T. Potencial antioxidante e prebiótico de *Pereskia aculeata* Miller (CACTACEAE) frente a linhagens de bactérias da microbiota da pele humana e desenvolvimento de formulação tópica. 2023. 118 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

OLIVRY, T.; MUELLER, R. S.; INTERNATIONAL TASK FORCE ON CANINE ATOPIC DERMATITIS. Evidence-based veterinary dermatology: a systematic review of the pharmacotherapy of canine atopic dermatitis. *Veterinary dermatology*, v. 14, n. 3, p. 121-146, 2003.

PAIVA-SANTOS, A. C., GAMA, M., PEIXOTO, D., SOUSA-OLIVEIRA, I., FERREIRA-FARIA, I., ZEINALI, M., ... & VEIGA, F. Nanocarrier-based dermopharmaceutical formulations for the topical management of atopic dermatitis. *International journal of pharmaceutics*, p. 121656, 2022.

PANAHI Y, RASTGAR N, ZAMANI A, SAHEBKAR A. Comparing the Therapeutic Effects of Aloe vera and Olive Oil Combination Cream versus Topical Betamethasone for Atopic Dermatitis: A Randomized Double-blind Clinical Trial. *J Pharmacopuncture*. v. 23, n. 3, p. 173-178, 2020.

PINGLE, S. C.; MATTA, J. A.; AHERN, G. P. Capsaicin receptor: TRPV1 a promiscuous TRP channel. *Transient Receptor Potential (TRP) Channels*, p. 155-171, 2007.

PINTO, N. DE C. C.; DUQUE, A. P. DO. N.; PACHECO, N. R.; MENDES, R. DE F.; MOTTA, E. V. DA S.; BELLOZI, P. M. Q.; RIBEIRO, A.; SALVADOR, M. J.; SCIO, E. *Pereskia aculeata*: A plant food with antinociceptive activity, *Pharmaceutical Biology*, v. 53, n. 12, p. 1780-1785, 2015.

PINTO, N. DE C. C.; MACHADO, D. C.; SILVA, J. M. DA; CONEGUNDES, J. L. M.; GUALBERTO, A. C. M.; GSMEIRO, J.; CHEDIER, L. M.; CASTAÑÓN, M. C. M. N.; SCIO, E. *Pereskia aculeata* Miller leaves present in vivo topical anti-inflammatory activity in models of acute and chronic dermatitis, *Journal of Ethnopharmacology*, v. 173, p. 330-337, 2015.

REYES-ESCOGIDO, M. L.; GONZALEZ-MONDRAGON, Edith G.; VAZQUEZ-TZOMPANTZI, Erika. Chemical and pharmacological aspects of capsaicin. *Molecules*, v. 16, n. 2, p. 1253-1270, 2011.

ROCHA, D. D. C., PEREIRA JÚNIOR, G. A., VIEIRA, G., PANTOJA, L., SANTOS, A. D., & PINTO, N. A. V. D. Macarrão adicionado de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller) desidratado. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, v. 19, n. 4, p. 459-465, 2009.

SAEIDY, S., PETERA, B., PIERRE, G., FENORADOSOA, T. A., DJOMDI, D., MICHAUD, P., & DELATTRE, C. Plants arabinogalactans: From structures to physico-chemical and biological properties. *Biotechnology Advances*, v. 53, p. 107771, 2021.

SANTORO, D., FAGMAN, L., ZHANG, Y., & FAHONG, Y. Clinical efficacy of spray-based heat-treated lactobacilli in canine atopic dermatitis: a preliminary, open-label, uncontrolled study. *Veterinary Dermatology*, v. 32, n. 2, p. 114, 2020.

SARTOR, C. F. P., DO AMARAL, V., GUIMARÃES, H. E. T., DE BARROS, K. N., FELIPE, D. F., CORTEZ, L. E. R., & VELTRINI, V. C. Estudo da ação cicatrizante das folhas de *Pereskia aculeata*. *Saúde e Pesquisa*, 3(2).

SARTOR, C. F. P.; AMARAL, V.; GUIMARÃES, H. E. T.; BARROS, K. N.; FELIPE, D. F.; CORTEZ, L. E. R.; VELTRINI, V. C. Estudo da ação cicatrizante das folhas de *Pereskia aculeata*. *Revista Saúde e Pesquisa*, v. 3, n. 2, p. 149-154, maio/ago. 2010.

SHARIATINIA, Z. Pharmaceutical applications of natural polysaccharides. In: *Natural polysaccharides in drug delivery and biomedical applications*. Academic Press, 2019. p. 15-57.

SHARMA, S. K.; VIJ, A. S.; SHARMA, M. Mechanisms and clinical uses of capsaicin. *European journal of pharmacology*, v. 720, n. 1-3, p. 55-62, 2013.

SHERMA, J.; FRIED, B. (Ed.). *Handbook of thin-layer chromatography*. CRC press, 2003.

SIERAKOWSKI, M. R., GORIN, P. A., REICHER, F., & CORRÊA, J. B. Location of O-acetyl groups in the heteropolysaccharide of the cactus *Pereskia aculeata*. *Carbohydrate research* v. 201, n. 2, p. 277-284, 1990.

SIERAKOWSKI, M. R., GORIN, P. A., REICHER, F., & CORRES, J. B. C. Some structural features of a heteropolysaccharide from the leaves of the cactus *Pereskia aculeata*. *Phytochemistry*, v. 26, n. 6, p. 1709–1713, 1987.

SILVA, S. H., NEVES, I. C. O., OLIVEIRA, N. L., DE OLIVEIRA, A. C. F., LAGO, A. M. T., DE OLIVEIRA GIAROLA, T. M., & DE RESENDE, J. V. Extraction processes and characterization of the mucilage obtained from green fruits of *Pereskia aculeata* Miller. *Industrial crops and products*, v. 140, p. 111716, 2019.

SIMON, D.; BIEBER, T. Systemic therapy for atopic dermatitis. *Allergy*, v. 69, n. 1, p. 46-55, 2014.

SKRZYPSKI, M., SASSEK, M., ABDELMESSIH, S., MERGLER, S., GRÖTZINGER, C., METZKE, D., ... & STROWSKI, M. Z. Capsaicin induces cytotoxicity in pancreatic neuroendocrine tumor cells via mitochondrial action. *Cellular signalling*, v. 26, n. 1, p. 41-48, 2014.

SOUZA, L. F., CAPUTO, L., INCHAUSTI DE BARROS, I. B., FRATIANNI, F., NAZZARO, F., & DE FEO, V. *Pereskia aculeata* Muller (Cactaceae) Leaves: chemical composition and biological activities. *International journal of molecular sciences*, v. 17, n. 9, p. 1478, 2016.

SUGAYA, M. The role of Th17-related cytokines in atopic dermatitis. *International journal of molecular sciences*, v. 21, n. 4, p. 1314, 2020.

SZOLCSÁNYI, J. Effect of capsaicin, resiniferatoxin and piperine on ethanol-induced gastric ulcer of the rat. *Acta Physiologica Hungarica*, v. 75, p. 267-268, 1990.

TAKEITI, C. Y.; ANTONIO, G. C.; MOTTA, E. M. P.; COLLARES-QUEIROZ, F. P.; PARK, K. J. Nutritive evaluation of a non-conventional leafy vegetable (*Pereskia*

aculeata Miller). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v. 60 (sup1), p. 148–160, 2009

THAKRE, P. P.; BELLINGHAM, M. C. Capsaicin causes robust reduction in glycinergic transmission to rat hypoglossal motor neurons via a TRPV1-independent mechanism. *Journal of Neurophysiology*, v. 121, n. 4, p. 1535-1542, 2019.

THOMAS, D. A.; DUBNER, R.; RUDA, M. A. Neonatal capsaicin treatment in rats results in scratching behavior with skin damage: potential model of non-painful dysesthesia. *Neuroscience letters*, v. 171, n. 1-2, p. 101-104, 1994.

THRESH, J. C. Capsaicin—the active principle of cayenne pepper. *Analyst*, v. 2, n. 18, p. 108-108, 1877.

TOLOSA, E. M. C., RODRIGUES, C. J., BEHMER, O. A. & NETO, A. G.F. Manual de técnicas para histología normal e patológica. São Paulo: Editora Manole Ltda. 331 p, 2003.

TORRES, T. M. S., ÁLVAREZ-RIVERA, G., MAZZUTTI, S., SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, J. D., CIFUENTES, A., IBÁÑEZ, E., & FERREIRA, S. R. S. Neuroprotective potential of extracts from leaves of ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata*) recovered by clean compressed fluids. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 179, p. 105390, 2022.

VELOSO, J., PREGO, C., VARELA, M. M., CARBALLEIRA, R., BERNAL, A., MERINO, F., & DÍAZ, J. Properties of capsaicinoids for the control of fungi and oomycetes pathogenic to pepper. *Plant Biology*, v. 16, n. 1, p. 177-185, 2014.

WANG, J., SUN, B. L., XIANG, Y., TIAN, D. Y., ZHU, C., LI, W. W., ... & WANG, Y. J. Capsaicin consumption reduces brain amyloid-beta generation and attenuates Alzheimer's disease-type pathology and cognitive deficits in APP/PS1 mice. *Translational psychiatry*, v. 10, n. 1, p. 230, 2020.

WANG, Z.; BABINA, M. MRGPRX2 signals its importance in cutaneous mast cell biology: Does MRGPRX2 connect mast cells and atopic dermatitis?. *Experimental Dermatology*, v. 29, n. 11, p. 1104-1111, 2020.

WEBER, L. V., AL-REFAE, K., WÖLK, G., BONATZ, G., ALTMÜLLER, J., BECKER, C., ... & HATT, H. Expression and functionality of TRPV1 in breast cancer cells. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, p. 243-252, 2016.

YAMAGUCHI, J., AIHARA, M., KOBAYASHI, Y., KAMBARA, T., & IKEZAWA, Z. Quantitative analysis of nerve growth factor (NGF) in the atopic dermatitis and psoriasis horny layer and effect of treatment on NGF in atopic dermatitis. *Journal of dermatological science*, v. 53, n. 1, p. 48-54, 2009.

YANG, G., SEOK, J. K., KANG, H. C., CHO, Y. Y., LEE, H. S., & LEE, J. YSkin barrier abnormalities and immune dysfunction in atopic dermatitis. *International journal of molecular sciences*, v. 21, n. 8, p. 2867, 2020.

YANG, H., CHEN, J. S., ZOU, W. J., TAN, Q., XIAO, Y. Z., LUO, X. Y., ... & WANG, H. Vitamin A deficiency exacerbates extrinsic atopic dermatitis development by

potentiating type 2 helper T cell-type inflammation and mast cell activation. *Clinical & Experimental Allergy*, 50(8), v. 50, n. 8, p. 942-953, 2020.

YANG, H. W., LIU, X. Y., SHEN, Z. F., YAO, W., GONG, X. B., HUANG, H. X., & DING, G. H. An investigation of the distribution and location of mast cells affected by the stiffness of substrates as a mechanical niche. *International Journal of Biological Sciences*, v. 14, n. 9, p. 1142, 2018.

YANG, R., XIONG, Z., LIU, C., & LIU, L. Inhibitory effects of capsaicin on voltage-gated potassium channels by TRPV1-independent pathway. *Cellular and molecular neurobiology*, v. 34, p. 565-576, 2014.

YU, Y., SHEN, M., SONG, Q., & XIE, J. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review. *Carbohydrate polymers*, v. 183, p. 91-101, 2018.

YUN, J. W., SEO, J. A., JEONG, Y. S., BAE, I. H., JANG, W. H., LEE, J., ... & PARK, Y. H. TRPV1 antagonist can suppress the atopic dermatitis-like symptoms by accelerating skin barrier recovery. *Journal of dermatological science*, v. 62, n. 1, p. 8-15, 2011.

ZHANG, S., WANG, D., HUANG, J., HU, Y., & XU, Y. Application of capsaicin as a potential new therapeutic drug in human cancers. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, v. 45, n. 1, p. 16-28, 2020.

ZHONG Y, SAMUEL M, VAN BEVER H, THAM EH. Emollients in infancy to prevent atopic dermatitis: A systematic review and meta-analysis. *Allergy*. v. 77, n. 6, p. 1685-1699, 2022.

ZHU, T. H., ZHU, T. R., TRAN, K. A., SIVAMANI, R. K., & SHI, V. Y. Epithelial barrier dysfunctions in atopic dermatitis: a skin–gut–lung model linking microbiome alteration and immune dysregulation. *British Journal of Dermatology*, v. 179, n. 3, p. 570-581, 2018

ANEXO I – EVOLUÇÃO CLÍNICA

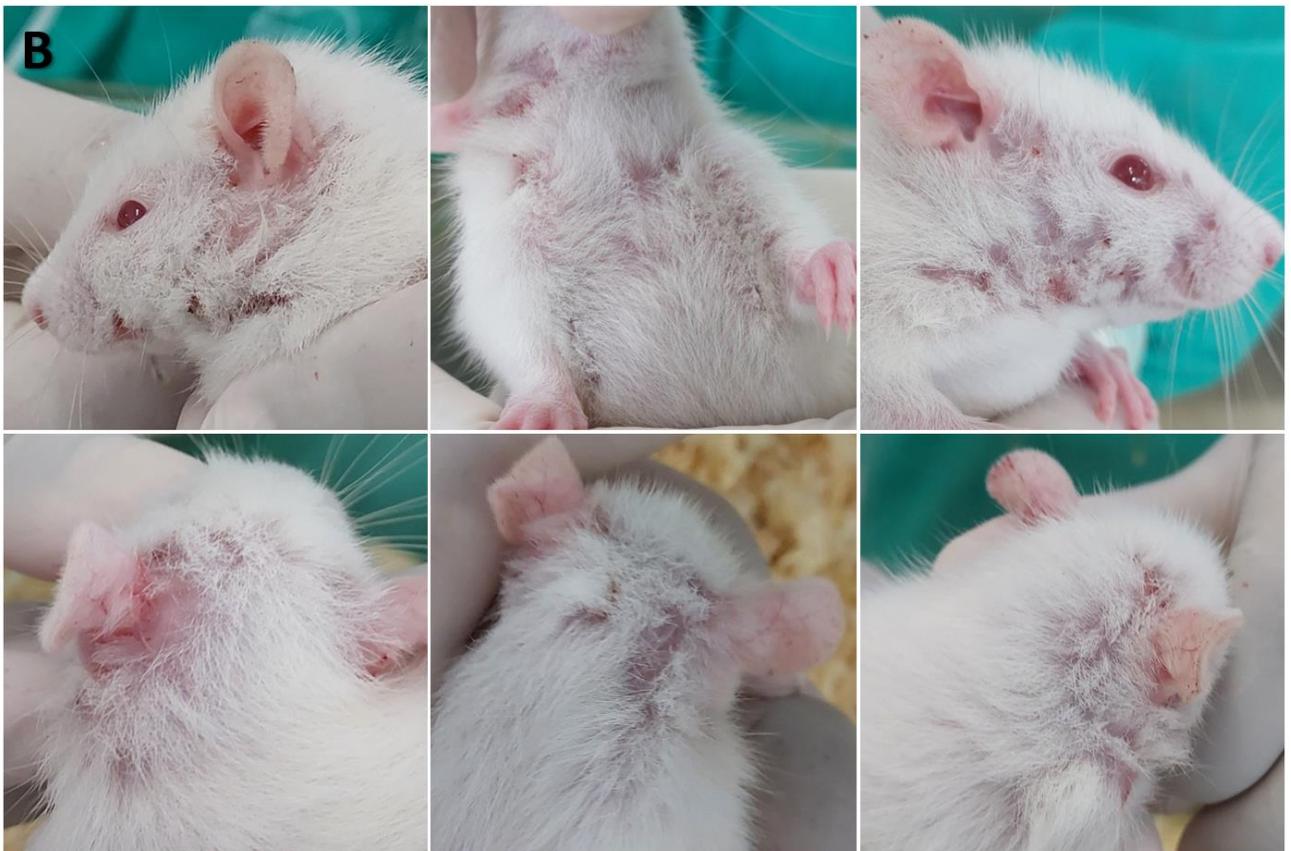
Foram realizados registros fotográficos de todos os animais ao longo de todo o experimento, em todos os dias de tratamento, previamente à aplicação do tratamento correspondente à cada grupo. Este apêndice contempla a evolução semanal de um animal representativo de cada grupo experimental, o que significa que as fotos das regiões de interesse de cada indivíduo foram agrupadas por semana.

As fotos que se seguem foram realizadas por meio de contenção manual dos animais, sem realização de sedação ou utilização de dispositivos de contenção. Todos os animais registrados neste documento foram cedidos por autorização do Comitê de Ética no Uso de Animais de Experimentação do Centro da Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora, em submissão de protocolo citado anteriormente no item 3 deste documento.

Nenhum animal foi maltratado ou lesionado durante a realização dos registros fotográficos.



**Figura 1. Animal NAIVE (não induzido, não tratado – controle hígido).
Fonte: da autora.**



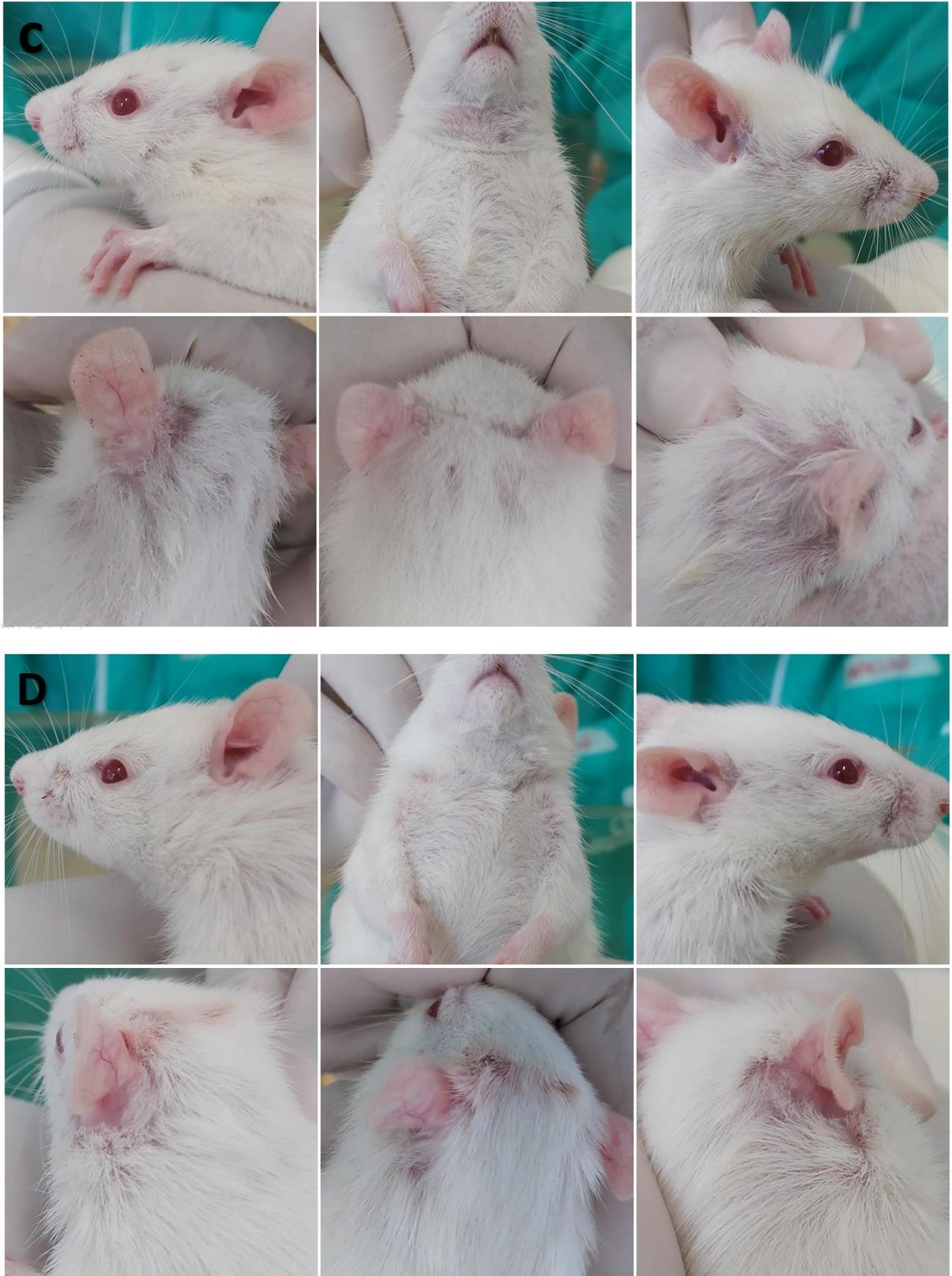


Figura 2. Evolução semanal do grupo CTRL – (induzido, não tratado).
(A) Semana 1. (B) Semana 2. (C) Semana 3. (D) Semana 4.
Fonte: da autora.



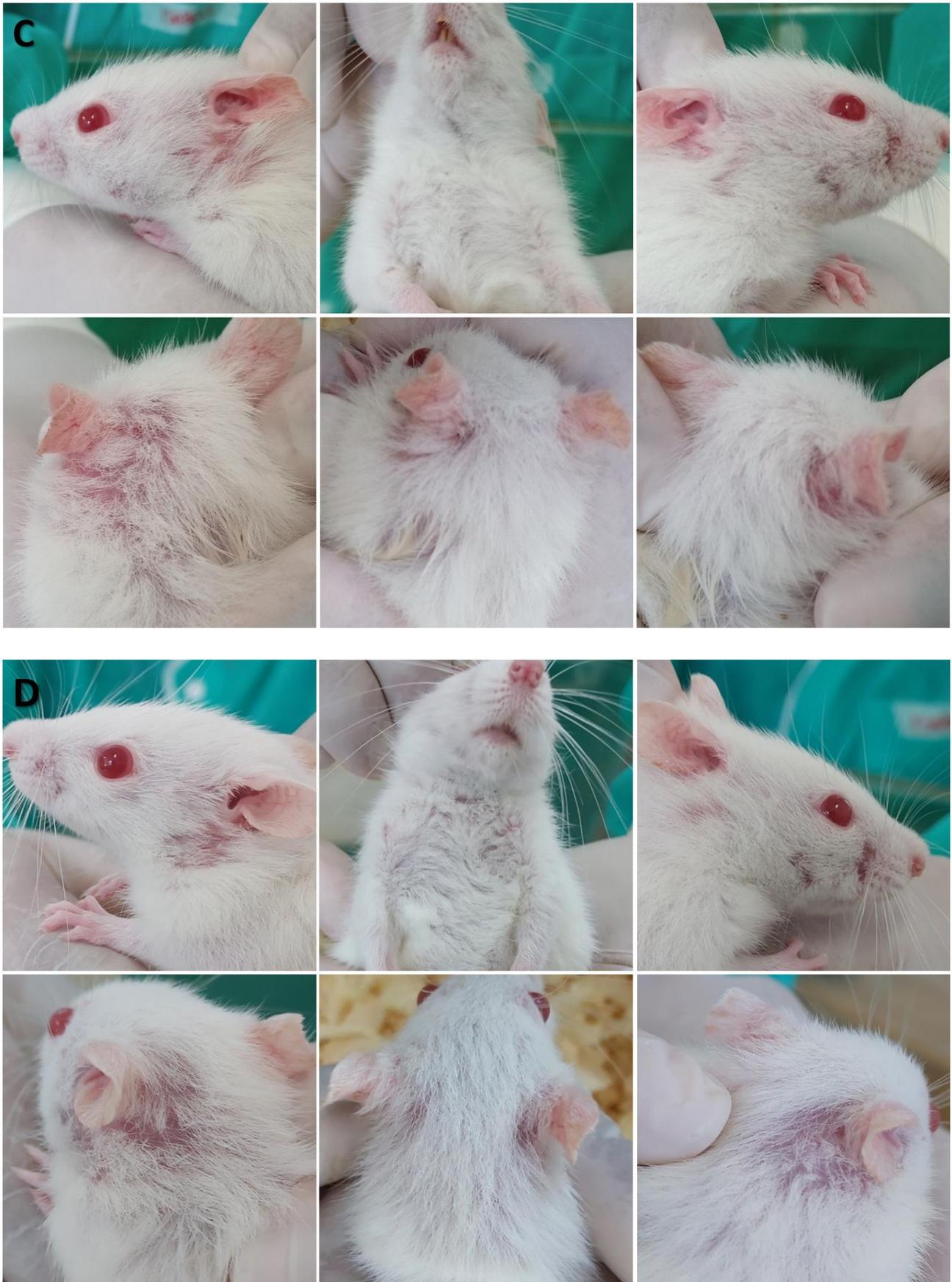


Figura 3. Evolução semanal do grupo CTRL + (tratado com dexametasona creme).
(A) Semana 1. (B) Semana 2. (C) Semana 3. (D) Semana 4.
Fonte: da autora.

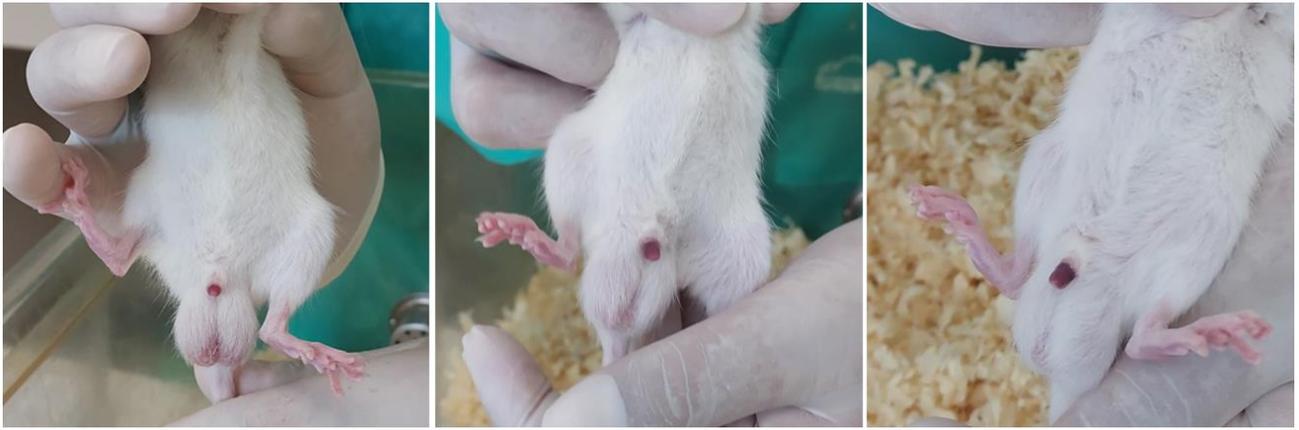
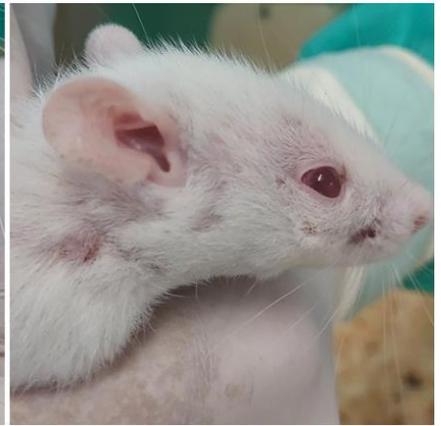
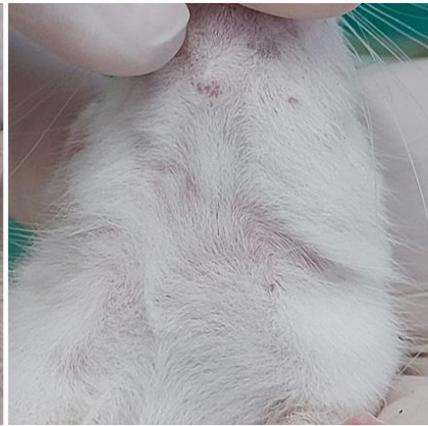
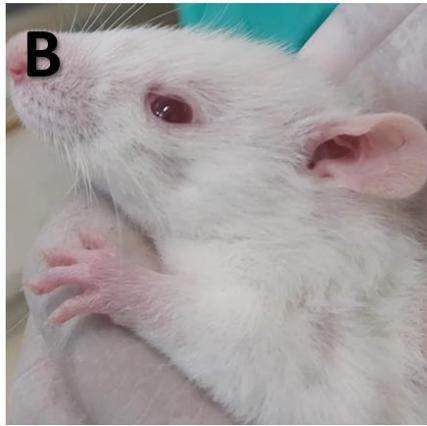
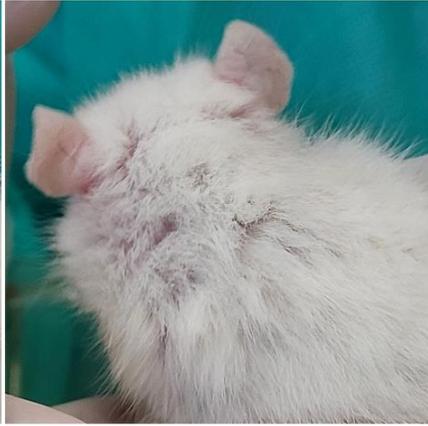
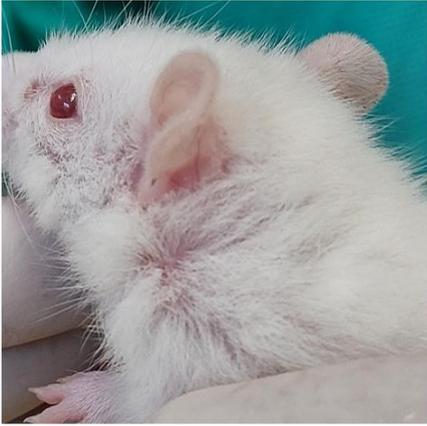
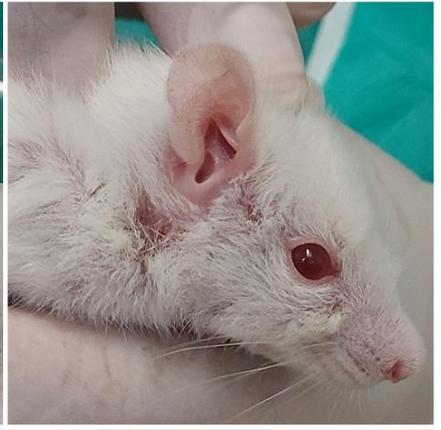
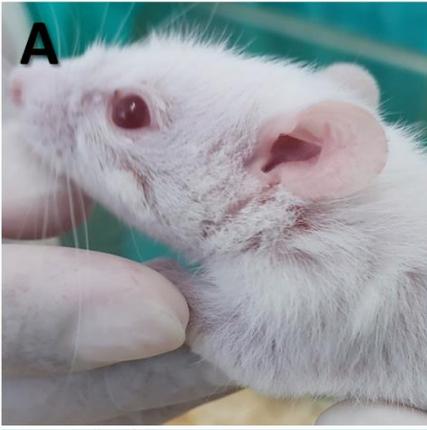
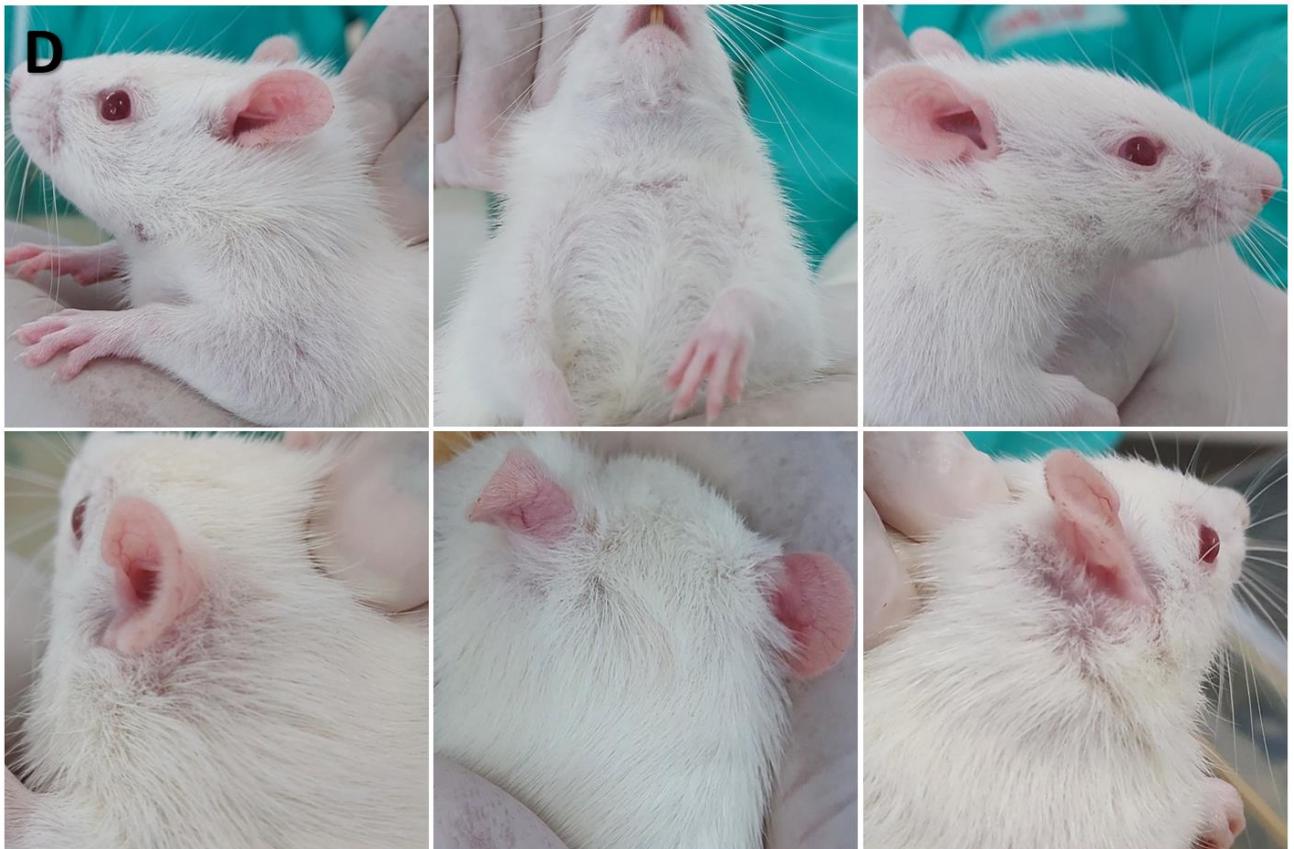
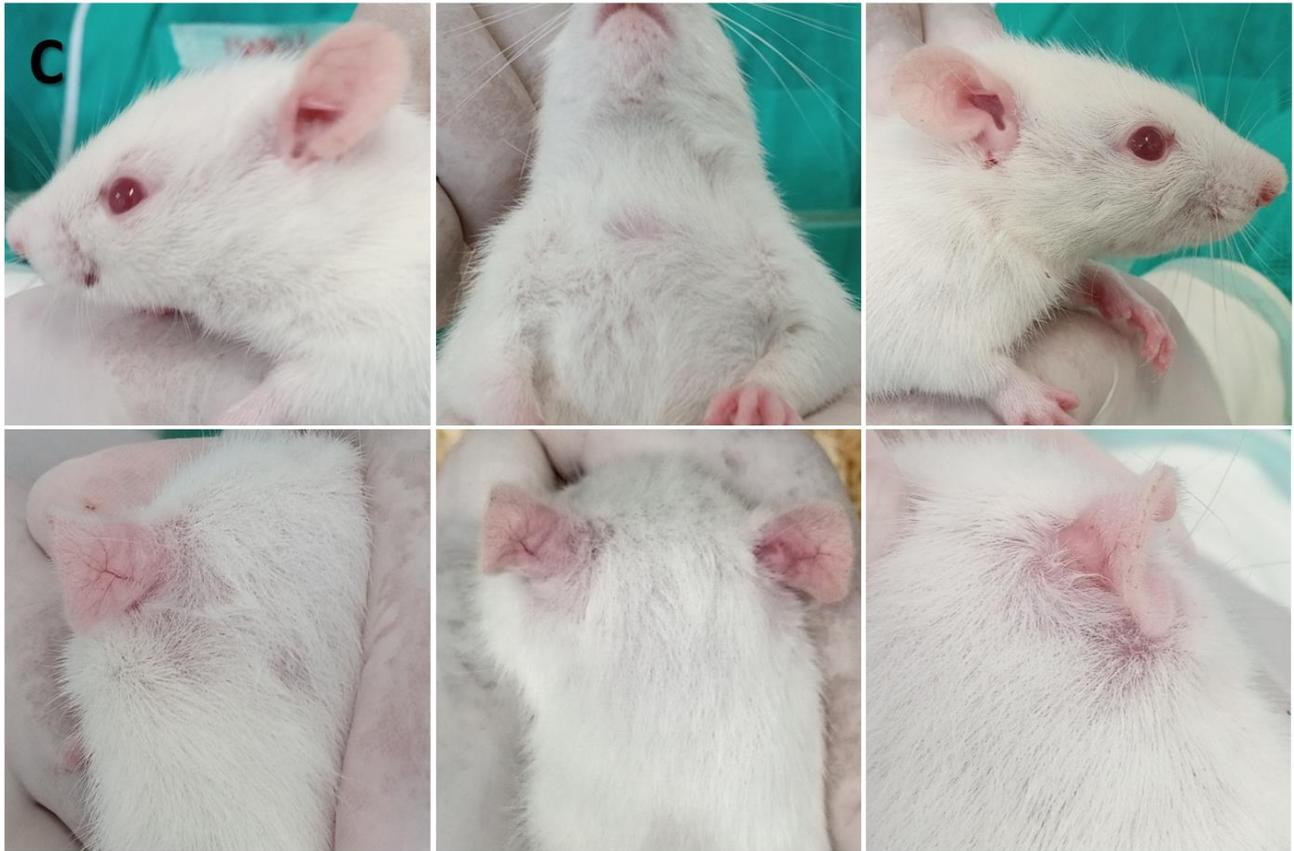
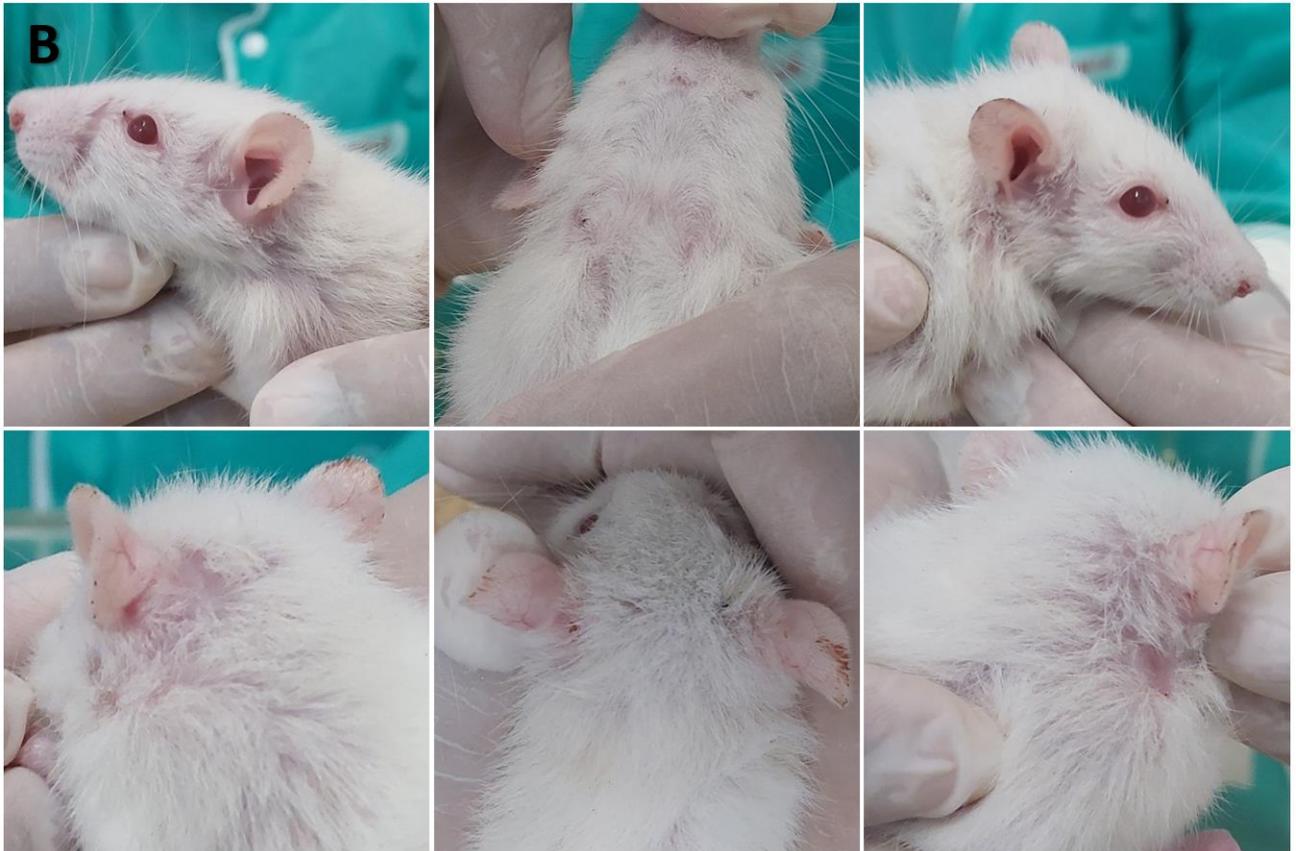


Figura 4. Evolução de balanopostite em animal CTRL + (tratado com dexametasona creme).
Observado nas semanas 3 e 4.
Fonte: da autora.





**Figura 5. Evolução semanal do grupo CTRL ve (tratado com o veículo da formulação).
(A) Semana 1. (B) Semana 2. (C) Semana 3. (D) Semana 4.
Fonte: da autora.**



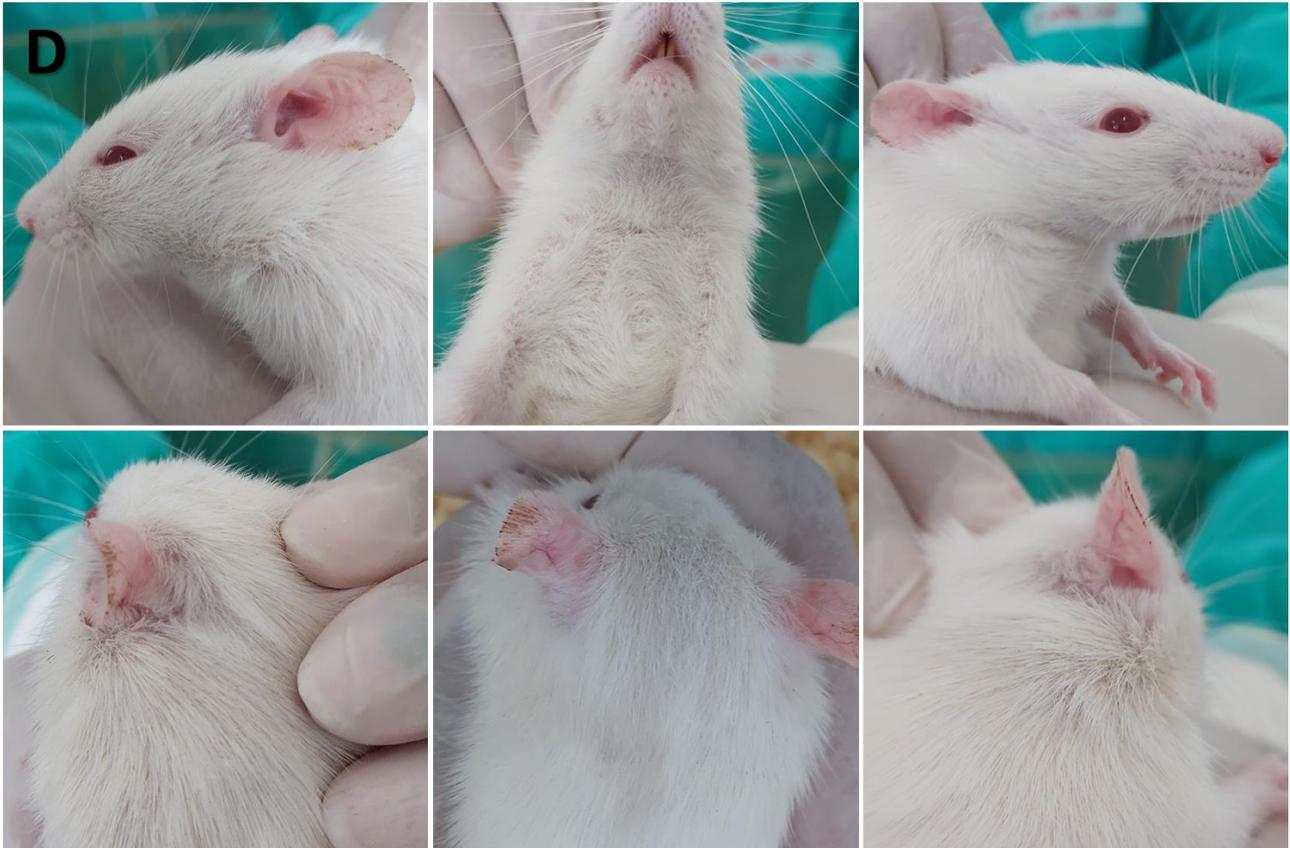


Figura 6. Evolução semanal do grupo EPA (tratado com PereSkin).
(A) Semana 1. (B) Semana 2. (C) Semana 3. (D) Semana 4.
Fonte: da autora.

ANEXO II – CERTIFICADO CEUA



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

CERTIFICADO

A COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 07/12/2021, analisou o protocolo nº. 019/2021 intitulado “Efeitos de uma formulação tópica contendo extrato de *Pereskia aculeata* em modelo animal de dermatite atópica induzida por capsaicina”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de Elita Scio Fontes e colaboração de Isabelle Costa Antoniol e Nicolas de Castro Campos Pinto a ser realizado no período de 16/12/2021 a 16/12/2023. Por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado pela CEUA. Serão utilizados 82 ratos Wistar machos com 24 horas de vida. Projeto a ser realizado no Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da UFJF, Juiz de Fora-MG. O prazo de validade desse certificado é equivalente a vigência do projeto prorrogável por mais um ano, desde que seja enviada justificativa a CEUA durante a vigência do projeto de acordo com orientação técnica do CONCEA.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº. 019/2021-CEUA about “Efeitos de uma formulação tópica contendo extrato de *Pereskia aculeata* em modelo animal de dermatite atópica induzida por capsaicina”, under responsibility of Elita Scio Fontes and collaboration of Isabelle Costa Antoniol and Nicolas de Castro Campos Pinto, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (Concea) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 12/07/2021. For the development of this research 82 males of Wistar rats with 1 day old will be delivered as requested in the period of 12/16/2021 to 12/16/2023. The Project will be performed at Reproduction Biology Center – UFJF, Juiz de Fora-MG. The term of validity of this certificate might be extended for one more year by means of justification during the period of validity.

Juiz de Fora, 15 de dezembro de 2021.

Coordenadora
CEUA

Vice-Coordenadora
CEUA

