



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Ana Merian da Silva

Investigação da participação do receptor TRPV1 no efeito irritativo do ditranol em camundongos

Florianópolis
2021

Ana Merian da Silva

Investigação da participação do receptor TRPV1 no efeito irritativo do ditranol em camundongos

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Juliano Ferreira, Dr.

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

da Silva, Ana Merian

Investigação da participação do receptor TRPV1 no efeito irritativo do ditranol em camundongos / Ana Merian da Silva ; orientador, Juliano Ferreira, 2022.

63 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Irritação de pele . 3. ditranol . 4. receptores de potencial transitório. I. Ferreira, Juliano . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Farmacologia. III. Título.

Ana Merian da Silva

Investigação da participação do receptor TRPV1 no efeito irritativo do ditranol em camundongos

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof, Waldiceu Aparecido Verri Junior Dr.
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Fernando Spiller Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Cássia Regina da Silva Dra.
Universidade Federal de Uberlândia

Daniel Augusto Gasparin Bueno Mendes Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Farmacologia.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Prof. Juliano Ferreira, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2021.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof^o Dr. Juliano Ferreira pela orientação ao longo desses dois anos de mestrado. Muito obrigada pela confiança, por todas as oportunidades, por compartilhar comigo seu conhecimento, seus ensinamentos, me proporcionando uma boa formação científica.

As minhas colegas de laboratório, Roberta, por sempre me ajudar em todos os meus experimentos e acima de tudo sua amizade. Agradeço pelos momentos de desabafo, choros, risadas, conversas e companhia. A Marcella, pelo auxílio e pelos melhores conselhos, não só sobre o laboratório, mas também sobre a vida. E Débora, por ser um exemplo de profissional, dedicada e responsável. Obrigada por me ensinarem todas as práticas de laboratório, trabalho com animais, por compartilhar seus conhecimentos científicos, sua paixão por laboratório e por toda a paciência.

A todos os colegas que passaram pelo Laboratório de Farmacologia Experimental e contribuíram para minha formação, bem como todos os amigos e colegas de departamento.

Aos meus amigos que estiveram comigo tornando essa etapa mais leve. Em especial a Lucilene e Denise, minhas colegas de apartamento, compartilhamos todos nossos momentos de alegria e tristeza dando força uma à outra. Luciane, Stherfanni, Merita, Juliana. Vocês todos me acompanharam e tornaram tudo melhor.

A minha família, Rosimeri, Antônio e Bruno, pelo apoio incondicional, muito obrigada por sempre acreditarem em mim, me incentivarem a sempre lutar pelos meus sonhos e estarem ao meu lado, sem vocês eu não teria conseguido, essa conquista é de vocês também.

Aos professores Waldiceu, Fernando, Cássia e Daniel por aceitarem o convite para compor a banca e avaliar esta dissertação.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Catarina e aos órgãos de fomento CNPq e CAPES pelo suporte financeiro.

Muito obrigada!

RESUMO

O ditranol é um dos medicamentos tópicos mais eficazes para o tratamento da psoríase em placa. Porém, seu uso clínico é limitado por reações adversas irritantes à pele, como edema, eritema e prurido, cujos mecanismos não são compreendidos. A estimulação dos terminais periféricos das fibras sensoriais positivos para TRPV1 pode causar inflamação neurogênica, relacionada ao efeito adverso de alguns medicamentos. Como o componente neurogênico da irritação do ditranol é desconhecido, o objetivo do presente estudo foi verificar se os efeitos adversos do ditranol poderiam estar relacionados à estimulação das fibras positivas para TRPV1. Creme de ditranol foi aplicado topicamente na orelha direita de camundongos machos e fêmeas C57BL/6, sendo uma curva dose-resposta realizada para definir a dose irritativa mínima de ditranol (0,01%, 0,1% e 0,5% - 6 µg/orelha). Nos animais controle, apenas o creme Lanette foi aplicado. Edema (diferença na espessura da orelha após o tratamento em comparação com a linha de base - Δ /mm), eritema (escores) e prurido (coceira após aplicação de filamento de von Frey 0,02 g) foram investigados de 2 horas a 6 dias após a aplicação de ditranol. Para investigar se a desfuncionalização das fibras positivas para TRPV1 reduzia os efeitos irritantes, os animais foram pré-tratados topicamente (3 vezes, em dias alternados) com creme contendo 1% de capsaicina (um agonista do receptor TRPV1) e posteriormente tratados com ditranol. Para investigar o efeito da dessensibilização do TRPV1, o salicilato (2%) foi adicionado a formulação de ditranol. Também foram coletados tecidos de animais tratados com ditranol para verificar a expressão do TRPV1 por qPCR. O tratamento tópico com ditranol (0,5%) causou edema e eritema, mas não prurido, começando às 6 h, com pico em 1 dia e durando até 6 dias após o tratamento em machos. No pico da irritação (1 dia), a dose mínima de ditranol que causou edema foi de 0,5%. Vinte e quatro horas após a aplicação, ocorreu redução do RNAm codificante para o TRPV1 na orelha, aumento no linfonodo drenante, sem nenhuma modificação em neurônios sensoriais. Após o primeiro tratamento, a aplicação tópica de capsaicina 1% produziu uma resposta edematogênica marcada 1 hora após a primeira aplicação quando comparada ao veículo. Demonstrando a desfuncionalização das fibras positivas para TRPV1 na pele aplicada, a capsaicina não foi capaz de causar edema após a segunda e terceira aplicação. Além de não reduzir a fase inicial (6 h a 4 dias) da irritação de pele induzida por ditranol (0,5%), a desfuncionalização das fibras TRPV1 positivas aumentou seu efeito irritante na fase tardia (5-6 dias). O mesmo fenômeno foi observado com a dessensibilização do TRPV1 induzida por salicilato. O presente estudo mostra que a aplicação tópica de ditranol em orelhas de camundongos causa resposta irritativa que é independente da ativação de fibras positivas para TRPV1 na sua fase inicial. Esses resultados sugerem que a irritação cutânea inicial causada pelo ditranol não envolve o componente neurogênico TRPV1.

Palavras-chave: Doença inflamatória de pele. Receptores de potencial transitório. Psoríase. ditranol.

ABSTRACT

Dithranol is one of the most effective topical drugs for the treatment of plaque-type psoriasis. However, its clinical use is limited by irritating adverse reactions at skin, such as edema, erythema and pruritus, whose mechanisms are not understood. The stimulation of TRPV1 positive peripheral terminals of sensory fibers may cause neurogenic inflammation, related to adverse effect of some drugs. Since the neurogenic component of dithranol irritation is unknown, the purpose of the present study was to verify whether the adverse effects of dithranol could be related to the stimulation of TRPV1 positive fibers. Dithranol cream was applied topically to the right ear of male and female C57BL/6 mice, and a dose-response curve was performed to define the minimal irritative dose of dithranol (0.01%, 0.1% and 0.5% - 6µg/ear). In control animals, only Lanette cream was applied. Edema (difference in ear thickness after treatment compared to baseline – Δ /mm), erythema (scores) and pruritus (scratching after von Frey filament 0.02 g application) were investigated from 2 hours to 6 days after dithranol application. To investigate whether the desensitization of TRPV1 positive fibers reduced the irritant effects, animals were topically pretreated repeatedly (3 times, every other day) with cream containing 1% capsaicin (a TRPV1 receptor agonist) and then treated with dithranol. To investigate the desensitizing effect of TRPV1, salicylate (2%) was added to the dithranol formulation. Tissues from animals treated with dithranol were also collected to verify TRPV1 expression by qPCR. Topical treatment with 0.5% dithranol caused edema and erythema, but not pruritus, starting at 6 am, peaking at 1 day and lasting up to 6 days after treatment in males. At the peak of irritation (1 day), the minimum dose of dithranol that caused edema was 0.5%. Twenty-four hours after application, there was a reduction in the mRNA encoding TRPV1 in the ear, an increase in the draining lymph node, without any modification in sensory neurons. After the first treatment, topical application of 1% capsaicin produced a marked edematogenic response 1 hour after the first application when compared to vehicle. Demonstrating the defunctionalization of TRPV1 positive fibers at the applied skin, capsaicin was unable to cause edema after the second and third application. In addition to not reducing the initial phase (6 h to 4 days) of dithranol-induced skin irritation (0.5%), the defunctionalization of TRPV1 positive fibers increased its irritating effect in the late phase (5-6 days). The same phenomenon was observed with salicylate-induced desensitization of TRPV1. The present study shows that the topical application of dithranol in mouse ears causes an irritative response that is independent of the activation of TRPV1-positive fibers in its initial phase. These results suggest that skin irritation caused by dithranol does not involve the neurogenic component TRPV1.

Keywords: Inflammatory skin disease. Transient potential receptors. Psoriasis. dithranol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do ditranol.....	18
Figura 2 - Definição da dose irritativa mínima do ditranol.....	26
Figura 3 – Efeito da aplicação repetida de capsaicina.....	26
Figura 4 – Decurso temporal da irritação da pele aplicada com ditranol 0,5% em machos e fêmeas.....	30
Figura 5 – Determinação da dose mínima irritativa de ditranol em camundongos machos.....	32
Figura 6 – Avaliação da expressão do RNAm para TRPV1 em animais tratados 24 horas antes com ditranol.....	33
Figura 7 – Medidas de edema e eritema de orelha após tratamento com capsaicina.....	35
Figura 8 – Efeito de aplicações tópicas repetidas de capsaicina 1%.....	37
Figura 9 – Tratamento com ditranol 0,5% após dessensibilização de fibras TRPV1 ⁺	39
Figura 10 – Tratamento com ditranol 0,5% associado a ácido salicílico 2%.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Terapias tópicas para psoríase.....	15
Tabela 2 – Lista das sequências senso e antisense dos oligonucleotídeos utilizados no qPCR (5' - 3')	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA - Análise de variância (do inglês, *Analyses of variance*)

ARRIVE - Pesquisa Animal e Relato de Experimentos in vivo (do inglês, *Animal in Research: Reporting in vivo Experiments*)

B – Basal

CAP – capsaicina

CEUA – Comitê de ética no uso de animais

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DRG – Gânglios da Raiz Dorsal (do inglês, *dorsal root ganglion*)

DTN – ditranol

IL – Interleucina

LAFEX – Laboratório de Farmacologia Experimental

qPCR – Reação em Cadeia Polimerase quantitativa em tempo real (do inglês, *Polymerase Chain Reaction Real Time*)

RNA – Ácido Ribonucleico (do inglês, *Ribonucleic acid*)

RNAm – RNA mensageiro

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

TRPs – Receptores de Potencial Transitório (do inglês, *Transient Receptor Potential*)

TRPA1- Receptor de Potencial Transitório anquirina 1 (do inglês, *Transient receptor potential ankyrin 1*)

TRPV1- Receptor de Potencial Transitório vanilóide 1 (do inglês, *Transient receptor potential vanilloid 1*)

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA PSORÍASE	13
1.1.1	Ditranol.....	17
1.2	Receptores de Potencial Transitório Vaniloide 1 (TRPV1)	19
2	OBJETIVOS	22
2.1.1	Objetivo Geral.....	22
2.1.2	Objetivos Específicos	22
3	METODOLOGIA.....	23
3.1	ANIMAIS	23
3.2	Fármacos e reagentes	24
3.3	AVALIAÇÃO DA IRRITAÇÃO TÓPICA INDUZIDA POR DITRANOL.....	24
3.3.1	Edema e eritema de orelha.....	24
3.3.2	Comportamentos pruriginosos evocado por toque.....	24
3.3.3	Determinação da dose irritativa mínima de ditranol	25
3.4	Desfuncionalização de fibras TRPV1+	26
3.5	Dessensibilização de fibras TRPV1+	27
3.6	Reação em cadeia polimerase quantitativa em tempo real (qPCR).....	27
3.7	Análise Estatística.....	28
4	RESULTADOS	29
4.1	Determinação da dose irritativa mínima de ditranol.....	29
4.2	Avaliação da expressão do RNAm para TRPV1 em animais tratados com ditranol	33
5	DISCUSSÃO	42
6	CONCLUSÃO.....	48
	REFERÊNCIAS.....	49
	APÊNDICE A – Papel dos TRPs na irritação causada pelo ditranol.....	58
	APÊNDICE B – Tratamento de animais nocaute para receptores do tipo Toll (TLR-/-).....	60

APÊNDICE C – Comportamentos nocifensivo e pruriginosos espontâneos..62

1 INTRODUÇÃO

A psoríase é uma doença inflamatória crônica da pele, caracterizada por placas espessas e escamosas. Estima-se que a psoríase afete aproximadamente 1–3% da população caucasiana e pode apresentar manifestações cutâneas e sistêmicas e efeitos negativos substanciais na qualidade de vida do paciente (GREB et al., 2016). A psoríase oferece muitos desafios, incluindo alta prevalência, cronicidade, desfiguração, deficiência e comorbidade associada (BOEHNCKE; SCHÖN, 2015). A forma mais comum de psoríase – a psoríase vulgar ou psoríase em placa - é caracterizada pela presença de placas escamosas elevadas e vermelhas que podem cobrir qualquer superfície corporal (GOTTLIEB, 2005).

A patogênese da psoríase é complexa e o mecanismo exato permanece indefinido (DENG; CHANG; LU, 2016). A fisiopatologia é caracterizada por proliferação anormal de queratinócitos e infiltração de células imunes na derme e epiderme envolvendo os sistemas imunes inato e adaptativo, com papéis importantes para células dendríticas e células T (GREB et al., 2016). No entanto, as principais questões permanecem sem solução, incluindo a natureza primária da doença como um distúrbio epitelial ou imunológico, a causa autoimune do processo inflamatório, a relevância dos fatores cutâneos versus sistêmicos e o papel das influências genéticas versus ambientais no início e progressão da doença e resposta à terapia (NESTLE; KAPLAN; BARKER, 2009). Portanto, acredita-se que a psoríase resulte de uma combinação de influências genéticas, epigenéticas e ambientais. A interação entre as células do sistema imunológico e as citocinas é outro fator crítico na patogênese da psoríase. Esses fatores ou vias incluem a homeostase Th1/Th2, o equilíbrio Th17/Treg e o eixo IL-23/Th17 (DENG; CHANG; LU, 2016). Th17 é considerado particularmente importante na psoríase devido aos seus efeitos pró-inflamatórios e seu envolvimento em uma alça inflamatória integrada com células dendríticas e queratinócitos, contribuindo para uma superprodução de peptídeos antimicrobianos, citocinas inflamatórias e quimiocinas que levam à amplificação da resposta imune. Além disso, descobriu-se que outras vias e moléculas de sinalização estão envolvidas, incluindo Th9, Th22, células T reguladoras, células T $\gamma\delta$, células T CD8⁺ e suas citocinas relacionadas (DENG; CHANG; LU, 2016).

Como a maioria dos esforços nas últimas décadas se concentrou na base imunológica das doenças inflamatórias da pele, é recente a ênfase no papel de neurônios sensoriais no processo de doença da psoríase (ZHU et al., 2016). Porém, a pele é inervada por uma rede de terminações periféricas de neurônios sensoriais relativamente esparsas e abundantes na junção derme-epiderme (RIOL-BLANCO et al., 2014). Curiosamente, ocorre penetração de

terminações nervosas sensoriais na epiderme de pacientes psoriáticos comparados a controles (KUBANOV; KATUNINA; CHIKIN, 2015). Além disso, alguns pacientes experimentaram melhora unilateral e até mesmo remissão completa da psoríase após lesão do nervo na região dermatomal afetada, apoiando a via neurocutânea como importante na fisiopatologia da psoríase (ZHU et al., 2016). Finalmente, um estudo em camundongos demonstrou que um subconjunto de neurônios sensoriais que expressam os canais iônicos TRPV1 são essenciais para conduzir a resposta inflamatória em modelo de psoríase, ao interagir com células dendríticas dérmicas, regulando a via IL-23/IL-17 e controlando a resposta imune cutânea (RIOL-BLANCO et al., 2014).

A função anormal de neurônios sensoriais no caso da psoríase pode também induzir uma série de sintomas cutâneos desagradáveis, como dor no local da lesão, desconforto e, principalmente, coceira, que ocorre em 60% a 90% dos pacientes com psoríase (ZHANG; HE, 2020). Esses sintomas desagradáveis podem influenciar negativamente o bem-estar dos pacientes. De fato, o prurido relacionado à psoríase, tem uma associação substancial com a insônia e a qualidade do sono nesses pacientes (KAAZ; SZEPIETOWSKI; MATUSIAK, 2019). O contato com as roupas é um fato desencadeador do prurido psoriático, uma situação agravada por não existir um tratamento universal (SAKAI et al., 2016).

Finalmente, vários fármacos que são utilizados para o tratamento da psoríase, especialmente aqueles utilizados por via tópica, poderiam exercer efeitos terapêuticos e adversos por interação direta com neurônios sensoriais, como veremos a seguir.

1.1 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA PSORÍASE

Embora exista um número relativamente grande de tratamentos farmacológicos, o manejo da psoríase é considerado deficiente, apresentando muitos inconvenientes (GOTTLIEB, 2005). Deve haver sempre uma avaliação da gravidade da doença e, portanto, da escolha terapêutica adequada para o paciente. Mesmo assim, muitos pacientes relatam insatisfação com as terapias atuais e acabam tendo baixa adesão ao tratamento (CHIRICOZZI et al., 2017).

Cerca de 15% dos pacientes apresentam doença grave, que deve ser tratada com medicamentos sistêmicos sintéticos (como metotrexato) ou biológicos (como os antagonistas/neutralizadores do fator de necrose tumoral α , anti-TNF α). Porém, grande parte

desses pacientes são tratados inadequadamente com essas terapias, geralmente havendo perda de eficácia, falha na resposta primária, ou ainda, interrupção devido a efeitos adversos relacionados ao medicamento, bem como outras comorbidades apresentadas pelo paciente (HAWKES et al., 2020). Outro fator está relacionado aos altos custos dessas terapias, com economia anual crescente (SEYEDIFAR et al., 2021).

Por outro lado, cerca de 85% dos pacientes com psoríase têm uma forma leve a moderada da doença, que pode ser tratada com agentes tópicos que são seguros e altamente eficazes (LEBWOHL, 2018). De acordo com a Fundação Nacional de Psoríase dos EUA (do inglês *National Psoriasis Foundation* - NPF), os tratamentos tópicos são sempre a primeira escolha no tratamento da psoríase, que atuam retardando ou normalizando a reprodução celular excessiva, reduzindo assim a inflamação. As terapias tópicas e sua eficácia clínica e efeitos adversos estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Terapias tópicas para tratamento da psoríase

(continua)

Grupo terapêutico	Agente	Eficácia Clínica	Efeitos adversos
Corticosteroides	Clobetasol 0,05% Betametasona 0,05%	Causam redução do inchaço e vermelhidão na psoríase em placas, mas existe número limitado de ensaios em grande escala para eficácia e tolerabilidade (NPF, 2020). Corticosteroides muito potentes, como o clobetasol, mostraram melhora clínica em 68-89% dos pacientes, enquanto os potentes como a betametasona, 45-60% dos pacientes apresentaram melhora completa da lesão (JARRAT et al., 2006).	Existem poucos estudos relacionados à segurança, mas há poucos relatos de atrofia cutânea, com menos de 5% (PAUL et al., 2012). Os efeitos adversos incluem danos à pele, incluindo adelgaçamento, alterações de pigmentação, hematomas, estrias, dilatação dos vasos superficiais, podendo causar efeito rebote, com piora das lesões (MASON et al., 2013).
Análogos da vitamina D	Calcipotriol 0,005% Calcitriol 0,0003%	São muito mais eficazes do que os emolientes (MASON et al., 2013). Estudos de meta-análise mostram que a chance de sucesso é duas vezes maior quando análogos da vitamina D são combinados com esteróides tópicos (PAUL et al., 2012).	Têm maior incidência de efeitos adversos locais quando comparados aos corticosteroides (MASON et al., 2013). As principais reações são irritação cutânea, descamação, erupção cutânea, ressecamento, dermatite e sensação de queimação (KRAGBALLE et al., 2006).
Derivados da vitamina A	Tazaroteno 0,05 – 0,1%	O tazaroteno foi o análogo da vitamina A mais estudado, mostrando 50% de eficácia na melhora do índice de gravidade. Deve ser usado em uma área limitada e pode ser combinado com esteroides em casos mais graves (MASON et al., 2013; PAUL et al., 2012).	Maior suscetibilidade a queimaduras solares e devem ser tomados com mais cuidado (NPS, 2020). Provável que cause efeitos adversos locais, como prurido, eritema e irritação (MASON et al., 2013; NAST et al., 2012).

Tabela 1 – Terapias tópicas para tratamento da psoríase

(conclusão)

Grupo terapêutico	Agente	Eficácia Clínica	Efeitos adversos
Ditranol/ Antralina	Ditranol 0,1 – 3%	Alguns estudos indicam eficácia semelhante entre o ditranol e análogos da vitamina D (MASON et al., 2013). 25% dos pacientes tratados com ditranol não precisam de tratamento adicional (VAN DE KERKHOFF et al., 2006).	Taxas de eventos adversos locais mais altas em comparação com o calcipotriol (MASON et al., 2013). Causa edema, eritema e prurido na área perilesional (DE MARE et al., 1988). Provoca descoloração das unhas e amarelecimento da pele (NAST et al., 2012).
Salicilatos	Ácido salicílico 3 -10%	É o agente ceratolítico mais bem estudado, tendo efeito hidratante e suavizante. Como monoterapia, estudos clínicos relatam que é um tratamento inicial eficaz para a psoríase em placa, reduzindo significativamente o índice de gravidade (JACOBI; MAYER; AUGUSTIN, 2015).	Pode causar irritação na pele quando usado por um longo período. No couro cabeludo, pode enfraquecer os fios de cabelo e torná-los quebradiços, causando queda temporária de cabelo (NPS, 2020). O salicilismo quando aplicado topicamente é raro (MADAN; LEVITT, 2014). Deve-se ter cuidado com a terapia combinada, o ácido salicílico pode aumentar a penetração na pele, aumentando a toxicidade para outros agentes aplicados topicamente (JACOBI; MAYER; AUGUSTIN, 2015).
Inibidores da calcineurina	Tacrolimus 0,03 – 0,1% Pimecrolimus 1%	Estudos clínicos que avaliaram a eficácia e segurança no tratamento da psoríase em placa têm resultados controversos, sendo comum o uso <i>off-label</i> (CHIRICOZZI et al., 2017).	Apresentam boa tolerância, principalmente em áreas sensíveis, como face e área genital, porém, dados de segurança em longo prazo não estão disponíveis (NAST et al., 2012).

Os tratamentos tópicos são usados para doenças limitadas ou mesmo como complemento para terapia sistêmica ou fototerapia, quando a doença é moderada a grave. A seleção de tratamento a ser usado deve levar em consideração o local da doença, a espessura e a escala das lesões, a idade do paciente, as preferências do veículo e o atendimento às necessidades do paciente (LEBWOHL, 2018). Além disso, os tratamentos disponíveis podem ser usados em combinação ou isoladamente (GREB et al., 2016).

Esses tratamentos tópicos podem ser iniciados e prescritos com segurança por médicos de atenção primária e, se não obtiverem uma resposta adequada ou se o paciente não conseguir ter uma boa adesão, apresentar sintomas mais graves e refratários, podendo exigir avaliação adicional de um dermatologista para terapia sistêmica (KIM; JEROME; YEUNG, 2017).

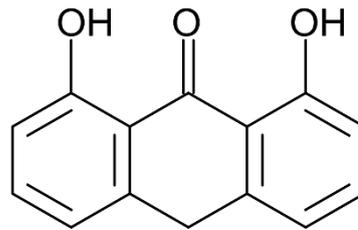
Embora as terapias tópicas ainda desempenhem um papel importante no manejo da psoríase, existem muitas lacunas no conhecimento sobre eficácia e segurança, e sobre as várias combinações, que incluem a terapia tópica com fototerapia ou com agentes sistêmicos (WU et al., 2016). Como o foco do presente estudo é o fármaco ditranol, demonstraremos com mais detalhes as características desse fármaco.

1.1.1 Ditranol

A antralina foi sintetizada pela primeira vez em 1916 por Galewski e Unna. Anteriormente, um produto natural chamado crisarobina, um extrato do Pó de Goa derivado da árvore *Andira araroba*, nativa do Sul da Bahia no Brasil, porém, confundida como originária da colônia de Goa ao sudoeste da Índia a qual o pó era exportado e revendido para o restante da Índia (ASHTON, 1983). O Pó de Goa foi usado pela primeira vez em 1876, por Balmanno Squire em um paciente de Hong Kong, que somente mais tarde descobriu-se tratar de psoríase (STEGER; HOLLAND, 1982). A antralina foi usada pela primeira vez na Alemanha e mais tarde na Grã-Bretanha para tratar doenças de pele, especialmente micoses, no entanto, nunca foi popular entre os dermatologistas americanos. No Brasil, a primeira utilização do Pó foi pelo médico José Francisco da Silva Lima, por volta de 1875, onde era preparado uma pasta misturando Pó de Goa, com vinagre ou glicerina e utilizado para diversas doenças de pele (ASHTON, 1983).

A antralina (1,8-diidroxi-9-antrona) (Figura 1) é o agente terapêutico mais comum entre um pequeno número de pró-oxidantes, as 9-antrones, consideradas eficazes e seguras no tratamento tópico da psoríase. Porém, efeitos adversos, como irritações e manchas na pele, diminuem a utilidade desse medicamento (LANGE et al., 1998; PARSLEW; FRIEDMANN, 1999).

Figura 1- Estrutura química do ditranol



Fonte: PubChem

Mesmo com a introdução de produtos biológicos, o ditranol tópico continua sendo um dos agentes antipsoriáticos mais eficazes. Estudos com modelo de psoríase em animais e biópsias de lesões psoriáticas humanas, mostraram que o ditranol tem como principal alvo os queratinócitos e as principais vias de diferenciação epidérmica, com a redução dos genes da família IL-1 e da alça inflamatória da IL-36 (BENEZEDER et al., 2020). Além disso, concluiu-se que a resposta irritante induzida pelo ditranol não é necessária para sua ação antipsoriática, indicando que a irritação é apenas um efeito adverso do tratamento (BENEZEDER et al., 2020).

Por outro lado, muito pouco é conhecido sobre os mecanismos relacionados aos efeitos adversos do ditranol. De fato, o tratamento com ditranol está associado a alguns eventos adversos de curto prazo, como queimação e irritação da pele, principalmente da pele perilesional não envolvida (VAN DE KERKHOFF et al., 2006). O ditranol também causa vermelhidão (eritema) e inchaço (edema) no local de aplicação, com picos tardios após o tratamento. Outro efeito adverso relacionado ao tratamento é o prurido no local de aplicação. Acredita-se que a oxidação da molécula gerando radicais livres seja responsável por danos nos tecidos biológicos, causando uma irritação profunda, com sensação de queimação e consequentemente prurido (SAVIAN et al., 2015).

Estudos avaliaram se a irritação causada pelo ditranol era influenciada pelos constituintes do creme veículo, assim diversos componentes foram testados clinicamente (PRINS et al., 1988). O ácido salicílico tópico tem propriedades queratolíticas e bacteriostáticas que o torna frequentemente utilizado em condições dermatológicas

(MADAN; LEVITT, 2014). Na clínica, comumente se usa ditranol com ácido salicílico na formulação e estudos indicam que não há alteração da eficácia (DE MARE et al., 1988), mas ocorre aumento na irritação do ditranol com o uso combinado com salicilato (PRINS et al., 1988). Por outro, o ácido salicílico parece melhorar a solubilidade do ditranol e a qualidade do creme, como sua viscosidade e sua estabilidade (KNECZKE; RAHM; LANDERSJO, 1990; WUIS et al., 1999).

Estudos iniciais apontaram que os eventos adversos induzidos pelo ditranol são devidos principalmente a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) após oxidação do fármaco (SWINKELS et al., 2001; VILUKSELA, 1991). De fato, estudo clínico demonstrou que a adição de antioxidantes é capaz de reduzir o edema e o eritema de pele induzida por aplicação tópica ditranol (FINNEN; LAWRENCE; SHUSTER, 1984). Por outro lado, esse resultado foi questionado pelo fato de que os antioxidantes poderiam reagir diretamente com o ditranol na formulação antes deste interagir com a pele (WHITEFIELD; LEEDER; MOSEDALE, 1985). Assim, ainda não são conhecidos os exatos mecanismos moleculares envolvidos no efeito irritativo do ditranol.

Receptores sensíveis a EROs poderiam ser os alvos moleculares responsáveis pelo efeito irritativo do ditranol, como por exemplo, o canal iônico da família de Receptores de Potencial Transitório (do inglês, *Transient Receptor Potential-TRPs*) tipo vanilóide 1 (TRPV1). De fato, o TRPV1 é um sensor para substâncias irritantes (incluindo EROs e alguns fármacos) altamente expresso em neurônios sensoriais e sua estimulação causa, similarmente ao ditranol, sensação de queimação e irritação na pele (STANFORD et al., 2019).

1.2 RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSITÓRIO VANILÓIDE 1 (TRPV1)

Os canais TRP de mamíferos possuem seis subfamílias, incluindo TRPC, TRPV, TRPM, TRPA, TRPML e TRPP (CLAPHAM, 2015). Todos os canais TRPs têm seis domínios transmembrana com as regiões N e C terminais localizadas dentro da célula e são montados como tetrâmeros para formar poros permeáveis a cátions não seletivos (LIAO et al., 2014). Os TRPs medeiam o influxo de cátions monovalentes e/ou divalentes nas células em resposta a estímulos químicos e físicos (CATERINA; PANG, 2016). A ativação dos canais de TRPs geralmente promovem a excitabilidade das células e o influxo de Ca^{2+} em muitas formas de processos celulares (YANG et al., 2013).

Os TRPs são um campo emergente de pesquisa em dermatologia. Além de seu papel clássico na percepção sensorial da pele, também estão envolvidos em várias funções cutâneas. Têm papel como alvo farmacológico em muitas doenças inflamatórias da pele, incluindo a psoríase (VALDES-RODRIGUEZ; KAUSHIK; YOSIPOVITCH, 2013). Além disso, há um crescente corpo de evidências implicando a função anormal do canal TRP, como um produto da atividade excessiva ou deficiente do canal, em condições patológicas da pele, como dor, coceira, dermatite, vitiligo, alopecia e comprometimento da barreira cutânea (CATERINA; PANG, 2016).

A cerca de 50 anos atrás, propôs-se que canais iônicos termicamente ativados estivessem presentes em neurônios sensoriais, mas, foi em 1997 que um canal iônico ativado por calor, o TRPV1, foi clonado e sua função descrita em detalhes. Esta descoberta inovadora levou à identificação e caracterização de várias outras proteínas da família de canais iônicos do TRPs (YANG et al., 2013).

O TRPV1 está entre os TRPs mais amplamente caracterizados. Esse canal iônico é ativado por altas temperaturas (>43 °C), prótons e muitas substâncias irritantes endógenas (como EROs) ou exógenas (como o princípio ativo da pimenta vermelha, a capsaicina) (BASBAUM et al., 2009; CATERINA et al., 1997; GEPPETTI et al., 2008). O TRPV1 é altamente expresso por um subconjunto de terminações nervosas periféricas de fibras sensoriais (fibras TRPV1 positivas - TRPV1+) formadas por neurônios com corpo celular nos gânglios das raízes dorsais, trigeminal ou nodoso, e que funcionam como sensores responsáveis pela detecção de dor, de prurido, além da indução de inflamação neurogênica (CATERINA; PANG, 2016; CEVIKBAS et al., 2014; SHIM et al., 2007).

O TRPV1 é um canal catiônico não seletivo que, quando ativado pelos agonistas citados acima, induz um influxo de sódio e cálcio, que cria um potencial gerador e causa despolarização nas terminações periféricas de fibras TRPV1+ (ARORA; CAMPBELL; CHUNG, 2020). Essas fibras levam a informação periférica para o sistema nervoso central (SNC), incluindo regiões do córtex somatossensorial, onde ocorre o processamento de sensações como a dor e o prurido.

Além de transmitir informações sensoriais da periferia para o SNC (ortodromicamente), as terminações periféricas de fibras TRPV1+ também podem liberar (antidromicamente) peptídeos armazenados em vesículas, como a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (SORKIN et al., 2018). A SP e o CGRP, além de estimular neurônios sensoriais e mastócitos para amplificar a dor e o prurido, ativam células endoteliais e vasculares lisas e induzem vasodilatação vênular e aumento da

permeabilidade vascular e, conseqüentemente, eritema e edema em tecidos como a pele (GEPETTI et al., 2008; JORDT et al., 2004). Esse processo é conhecido como inflamação neurogênica e está relacionado a alguns processos patológicos, incluindo a irritação de pele induzida por alguns fármacos (ARORA; CAMPBELL; CHUNG, 2020; EBERHARDT et al., 2017; PEREIRA et al., 2010).

Apesar de induzir grande irritação dérmica na primeira hora após a aplicação, o tratamento repetido e com altas dose (≥ 1 %) do agonista TRPV1 capsaicina leva à desfuncionalização de longo prazo das fibras TRPV1⁺, com depleção de neuropeptídeos e redução da inervação da pele (ANAND; BLEY, 2011). Essa estratégia pode ser utilizada não somente como ferramenta farmacológica (p.ex. no estudo da inflamação neurogênica induzida por agentes irritantes (SZALLASI; BLUMBERG, 1989), mas também como ferramenta terapêutica (p.ex. para induzir analgesia de longa duração em pacientes com dores neuropáticas, (ARORA; CAMPBELL; CHUNG, 2020).

Além da importância do TRPV1 em neurônios sensoriais, há evidências que esse receptor também está presente em uma variedade de células não neuronais (FERNANDES; FERNANDES; KEEBLE, 2012). Um dos primeiros tipos de células em que a funcionalidade foi identificada pela primeira vez são os queratinócitos epidérmicos, aos quais a estimulação do TRPV1 atua diretamente nas funções de barreira epidérmica (INOUE et al., 2002). Além disso, foi sugerido que, pelo menos em parte, a vasodilatação e o edema induzidos pela ativação do TRPV1 pudessem ser mediados por efeito direto no tecido vascular (KARK et al., 2008).

Estudos recentes demonstram que a expressão dos canais TRPV1 é elevada na pele psoriática (NATTKEMPER et al., 2018). Em um modelo murino de psoríase, a desfuncionalização das fibras TRPV1⁺ resultou em lesões significativamente reduzidas, bem como uma diminuição nas células inflamatórias (ZHANG; HE, 2020). Além disso, camundongos com deleção no gene *trpv1* tiveram redução na hiperplasia epidérmica em modelo de psoríase (ZHOU et al., 2018). Finalmente, a aplicação tópica de capsaicina em pacientes com psoríase moderada e grave causou uma melhora geral na doença (BERNSTEIN et al., 1986; GLINSKI et al., 1991).

Existem várias evidências para participação do receptor TRPV1 e das fibras TRPV1⁺ na irritação de pele induzida pelo ditranol:

- a) Semelhante ao agonista TRPV1 capsaicina, o tratamento tópico com ditranol também causa efeito terapêutico na psoríase;
- b) Semelhante à capsaicina, o tratamento tópico com ditranol também causa irritação de pele (PRINS et al., 1998), além de reduzir sua inervação (OROJAN et al., 2006);
- c) O efeito irritante do ditranol pode ser mediado pela produção de EROs e o TRPV1 é um importante sensor de EROs na pele (CHUANG; LIN, 2009).
- d) O receptor TRPV1 parece ser um alvo importante para efeito irritante de vários fármacos, incluindo alguns tratamentos tópicos da psoríase como o tacrolimus e o tazaroteno (PEREIRA et al., 2010; YIN et al., 2013).

Assim, a hipótese deste trabalho é que a irritação causada pela aplicação tópica de ditranol é causada pela ativação de receptores sensíveis a EROs, como o TRPV1, presente em neurônios sensoriais periféricos.

2 OBJETIVOS

2.1.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi investigar o papel do receptor TRPV1 no efeito irritativo do ditranol em camundongos machos e fêmeas.

2.1.2 Objetivos Específicos

- Determinar a dose mínima, verificar o decurso temporal e examinar o dimorfismo sexual da irritação induzida por um creme contendo ditranol aplicado na orelha de camundongos;
- Verificar o efeito irritante da aplicação do ditranol em animais com desfuncionalização de fibras TRPV1 positivas ou dessensibilização do TRPV1;
- Avaliar a expressão do RNAm codificante para o receptor TRPV1 em tecidos, como orelha, linfonodo auricular e DRG de animais tratados com ditranol.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Os experimentos com animais foram realizados no Laboratório de Farmacologia Experimental (LAFEX) localizado no primeiro andar do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina. Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos e fêmeas com idade entre 8 a 12 semanas pesando 18-30 g, mantidos de 2 a 6 animais em sistema de estantes micro-isoladoras em caixas pequenas de polipropileno transparente (35x20x13 cm), com água filtrada e ração *ad libitum*. Em ciclos controlados claro/escuro (12/12 h) e temperatura ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$). As trocas foram realizadas semanalmente pelo próprio experimentador em capela de fluxo laminar e os animais receberam tubos de PVC (5 cm diâmetro x 10 cm comprimento) e de papel como enriquecimento ambiental.

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos conforme a normatização atual do CONCEA, da CEUA/UFSC e das diretrizes ARRIVE (do inglês, *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*). Alguns procedimentos foram aplicados para aumentar a reprodutibilidade e minimizar vieses experimentais, como cálculo prévio do número de animais por grupo experimental, cegamento, randomização e definição de critérios de exclusão a priori. Além disso, os experimentos foram realizados em forma de blocos (2 a 3 blocos) em dias diferentes para aumentar a reprodutibilidade experimental.

O n amostral foi calculado a partir de experimento piloto considerando os valores obtidos pela medida do edema de orelha como desfecho primário. Foi realizado o cálculo utilizando a média do grupo controle para avaliar a reversão do edema em 30%, a partir do qual foi calculado o tamanho do efeito (1,5), posteriormente o n amostral foi calculado utilizando o programa G*Power 3.1.9.7., onde foram utilizados os parâmetros: nível de significância de 5%, poder do teste de 95%, teste de hipótese bicaudal, encontrando assim o total de 10 animais por grupo.

3.2 FÁRMACOS E REAGENTES

Os compostos capsaicina (N-Vanillynonamide – agonista de TRPV1) e o fármaco ditranol (1,8,9-Anthracenetriol, 1,8-Dihydroxy-9(10H)-anthracenone, 1,8-Dihydroxyanthrone, Anthralin) foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). O creme base para preparo das formulações tópicas foi adquirido em farmácia de manipulação Bio Extrato Farmácia de Manipulação Ltda (Florianópolis, Santa Catarina). O propilenoglicol utilizado para solubilização de drogas em pó foi adquirido da Vetec Química. O ácido salicílico utilizado na formulação com ditranol foi adquirido em farmácia de manipulação Vita Essência (Florianópolis, Santa Catarina).

Os iniciadores (do inglês, *primers*) utilizados na reação de PCR para avaliar expressão gênica foram obtidos da Síntese Biotecnologia (Belo Horizonte, MG) da marca IDT (*Integrated DNA Technologies*).

3.3 AVALIAÇÃO DA IRRITAÇÃO TÓPICA INDUZIDA POR DITRANOL

3.3.1 Edema e eritema de orelha

A medida do edema foi expresso como aumento da espessura da orelha após a aplicação de irritantes químicos. Para obtenção dessa mensuração, a orelha é medida antes (basal) e após indução da resposta inflamatória utilizando um micrômetro digital (Mitutoyo® S-293) em animais anestesiados com isoflurano. O micrômetro é aplicado perto da ponta da orelha, distal dos sulcus cartilagosos e sempre higienizado entre um animal e outro. A espessura é registrada em mm. Para reduzir variações, um único pesquisador realizou todas as medidas ao longo de cada experimento.

O nível de eritema foi pontuado utilizando uma tabela de comparação, contendo manchas vermelhas, da qual foi obtida uma escala de eritema, onde 0, nenhum; 1, leve; 2, moderado; 3, grave; 4, muito grave, como descrito por van der Fits e colaboradores (2009).

3.3.2 Comportamentos pruriginosos evocado por toque

Para avaliação do comportamento pruriginoso evocado por toque externo foi utilizado filamentos de von Frey (CHAPLAN; POGRELAND; YAKSH, 1994; TEODORO et al., 2013). Cada camundongo foi anestesiado com 2% de isoflurano e os pelos de trás da

orelha foram raspados. Para familiarização e habituação, os animais eram colocados na plataforma de von Frey para habituação por uma hora um dia antes do início do teste e 30 minutos por dia durante os dias de avaliação. Um filamento de von Frey (0,02 g) foi aplicado na parte dorsal da orelha. A incidência de respostas de coçar foi determinada em dez ensaios para cada animal de acordo com Huang e colaboradores (2019). O filamento foi aplicado com intervalo de 1 minuto entre as tentativas. Na ausência de resposta pruriginosa foi considerado negativo. Não foi considerada como resposta positiva o movimento de retirada do filamento com a pata dianteira ou comportamento de sacudir no momento ou imediatamente após a estimulação. No caso de 10 respostas positivas desde a primeira aplicação, o teste foi finalizado considerando 100% a resposta.

3.3.3 Determinação da dose irritativa mínima de ditranol

Para avaliação do efeito irritativo do ditranol, os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) em solução salina 0,9% administrados pela via intraperitoneal no quadrante inferior esquerdo do abdômen do animal. Durante aplicação de ditranol, os animais foram mantidos sobre uma manta de aquecimento para evitar uma possível hipotermia induzida pelos anestésicos.

Foram utilizados diferentes concentrações de creme contendo ditranol para avaliar a atividade biológica eficaz que cause o mínimo de irritação, sendo a dose mínima 0,01%/orelha e máxima 0,5%/orelha, como descrito por Lowe e colaboradores (1981) com modificações. A aplicação foi feita por toda orelha do animal, em uma quantidade de aproximadamente 6 µg/orelha, com o auxílio de uma espátula. Após 30 minutos o fármaco foi removido com o uso de algodão, água e sabão próprio para uso animal (ASHTON et al., 1983). O desenvolvimento do edema e eritema foi avaliado de 6 horas até 6 dias após o tratamento, como mostra a figura 1. Para evitar desconforto desnecessário aos animais, foi utilizado a dose irritativa mínima nos experimentos seguintes, ou seja, a menor dose que causa edema e eritema estatisticamente significativo.

Considerando que não é descrito na literatura se a irritação causada pelo ditranol difere entre homens e mulheres, o fármaco foi testado em machos e fêmeas, aumentando assim a qualidade e confiabilidade dos resultados obtidos, bem como obtendo validade dos tratamentos em ambos os sexos (SPRINGATE et al., 2017).

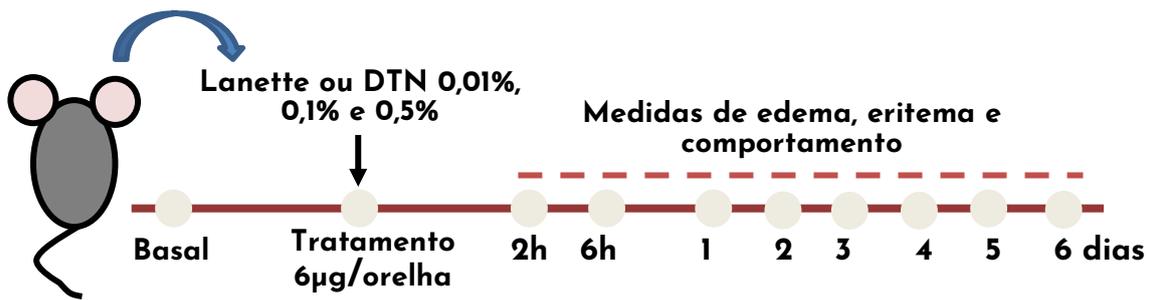


Figura 2 - Definição da dose irritativa mínima (DIM) do ditranol

Legenda – h (Horas); DTN (ditranol); µg (microgramas).

Fonte: Elaborado pelo autor

3.4 DESFUNCIONALIZAÇÃO DE FIBRAS TRPV1+

Para induzir desfuncionalização das fibras TRPV1 positivas da pele, animais foram pré-tratados topicamente na orelha direita nos dias 1, 3 e 7 com creme Lanette (controle, 6 µg/orelha) ou creme contendo capsaicina 1% (6 µg/orelha), como descrito por Inoue e colaboradores (1997) com modificações (Figura 4). Após 8 dias do início das aplicações, os animais de ambos os grupos receberam tratamento com creme contendo ditranol na concentração 0,5% como descrito anteriormente. O desenvolvimento de edema, eritema e o comportamento pruriginoso foram avaliadas por 6 dias como já mencionado (SILVA et al., 2011).

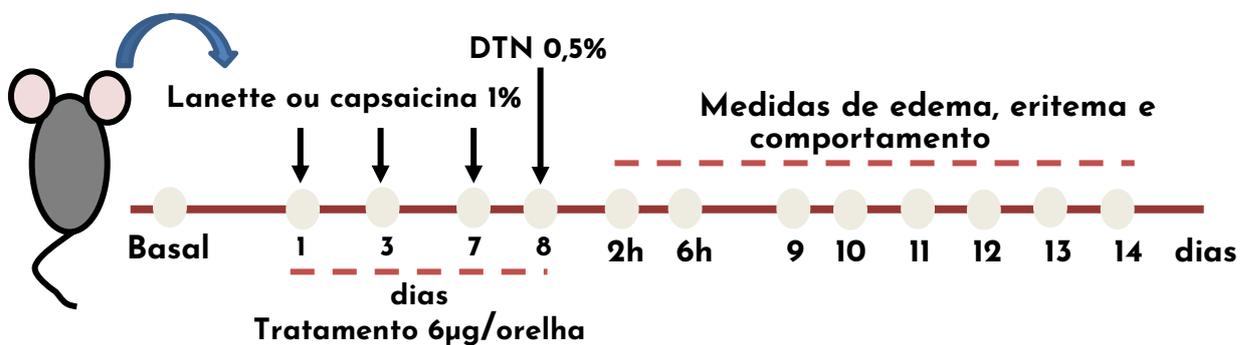


Figura 3 - Efeito da aplicação repetida de capsaicina

Legenda – h (Horas); DTN (ditranol); µg (microgramas).

Fonte: Elaborado pelo autor

3.5 DESSENSIBILIZAÇÃO DE FIBRAS TRPV1+

Para induzir a dessensibilização de fibras TRPV1 positivas e considerando que na prática clínica normalmente se associa ditranol com ácido salicílico (DE MARE et al., 1988), um grupo de animais foi tratado topicamente como descrito anteriormente com creme contendo ditranol 0,5% associado a ácido salicílico 2% (BENEZEDER et al., 2020) e os mesmos parâmetros de edema, eritema e prurido foram avaliados 2 horas até 6 dias após o tratamento.

3.6 REAÇÃO EM CADEIA POLIMERASE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (QPCR)

Para a reação em cadeia polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) foi utilizado o kit ReliaPrepTM RNA tissue Mini Prep System (Promega) baseado no protocolo do fabricante e o RNA foi quantificado utilizando um Nanodrop (ND-1000). Para cada amostra, a razão A260/280 e A260/230 foi utilizada para verificar a pureza do RNA. O cDNA foi sintetizado utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) e utilizado nas reações de qPCR (Reação em Cadeia Polimerase Quantitativa em Tempo Real). A quantificação dos produtos específicos foi realizada utilizando GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega), em um equipamento StepOneTM (Applied Biosystems) de acordo com a reação: 10 min 95 °C e 40 ciclos de amplificação (95 °C por 15 segundos e 60 °C por 60 segundos). Um passo final foi incluído para obter a curva de dissociação (95 °C for 15 segundos, 60 °C for 60 segundos, 95 °C for 15 segundos). Os valores de C_q (ciclos de quantificação) foram normalizados utilizando a média de dois genes de referência, β -actina (*Actb*) e hipoxantina guanina fosforibosil transferase (*Hprt*). A quantidade relativa de RNA foi calculada utilizando o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e a especificidade de cada ologonucleotídeo em todas as amostras foi confirmado por um único pico na análise da curva de melting (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 2 - Lista das sequências senso e antisenso dos oligonucleotídeos utilizados no qPCR (5'-3').

Gene	Sequência senso (5'-3')	Sequência antisenso (5'-3')	Número de acesso NCBI
<i>Trpa1</i>	GCTTTTGGCCTCAGCTTT	CTGGATAATTGATGTCTCCT AGCA	NM_177781
<i>Trpv1</i>	CCCGGAAGACAGATAGCCT GA	TTCAATGGCAATGTGTAATG CTG	NM_001001445
<i>Hprt</i>	GCAGACTTTGCTTTCCTTGG	CAACAACAACTTGTCTGGA	NM_013556
<i>Actb</i>	CATTGCTGACAGGATGCAGA AGG	TGCTGGAAGGTGGACAGTG AGG	NM_007393
<i>Il-1β</i>	CTCAATGGACAGAATATCAA CC	ACAGGACAGGTATAGATTCT	NM_008361.4
<i>Tnfa</i>	GTGCCTATGTCTCAGCCTCT T	ATTTGGGAACTTCTCATCCC T	NM_013693
<i>Cgrp</i>	GGACTTGGAGACAAACCAC CA	GAGAGCAACCAGAGAGGAA CTACA	XM_030242031.1

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados experimentais são expressos como média \pm SEM de n observações, onde n representa o número de animais como indicado na legenda das figuras. O teste de Grubbs disponível na plataforma online do GraphPad Prism foi utilizado para a verificação da existência de valores outliers entre os dados, e os valores identificados como tal foram excluídos das análises estatísticas. Os conjuntos de dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de uma, duas ou três vias, com ou sem medidas repetidas, seguidas pelos testes post-hoc de Dunnett, Sidak ou Tukey conforme necessário, indicado nas legendas das figuras. O teste “t” de Student foi utilizado para avaliação quando dois grupos. O Software GraphPad versão 8.0, San Diego, Califórnia, EUA (GraphPad Software, USA) foi utilizado para fazer as análises. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas com valores de “p” menores que 0,05 ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 DETERMINAÇÃO DA DOSE IRRITATIVA MÍNIMA DE DITRANOL

Inicialmente, investigamos o decurso temporal e o dimorfismo sexual na irritação causada por uma dose de ditranol usada com frequência na clínica (0,5%). Fotos representativas da irritação da pele da orelha direita tratada com creme veículo (controle, 6 µg/orelha) ou creme contendo ditranol 0,5% em diferentes tempos podem ser vistas na Figura 4A. Comparado ao creme veículo, o tratamento tópico com ditranol a 0,5% causou edema e eritema (Fig. 4B-C), mas não prurido (Fig. 4D), começando às 6 h, tendo pico em 1 dia e durando até 6 dias após uma única aplicação em camundongos machos (Figura 4). O creme com ditranol 0,5% também foi capaz de induzir edema e eritema em camundongos fêmeas, porém com perfil de resposta mais tardio, sendo significativos a partir de 1 dia (Figura 4). Para confirmar esses achados aplicamos uma ANOVA de 3 vias, com tempo, tratamento e sexo como fatores e todos esses fatores isoladamente foram significativos para edema (fator sexo: $F(1, 144) = 8,194, P < 0,01$. Fator tempo: $F(7, 144) = 7,630, P < 0,01$. Fator tratamento: $F(1, 143) = 311,2, P < 0,01$. Fator sexo*tempo*tratamento $F(7, 143) = 2,683, P = 0,01$), para eritema (fator sexo: $F(1, 144) = 23,00, P < 0,01$. Fator tempo: $F(7, 144) = 18,86, P < 0,01$. Fator tratamento: $F(1, 144) = 307,8, P < 0,01$. Fator sexo*tempo*tratamento $F(7, 144) = 0,8050, P = 0,5$). Apesar da irritação ainda ser presente, eutanaziamos os animais 6 dias após tratamento para evitar desconforto desnecessário pois as orelhas apresentavam grande descamação (Fig. 4A). Baseado nesses resultados, continuamos nosso estudo verificando a irritação de pele majoritariamente camundongos machos.

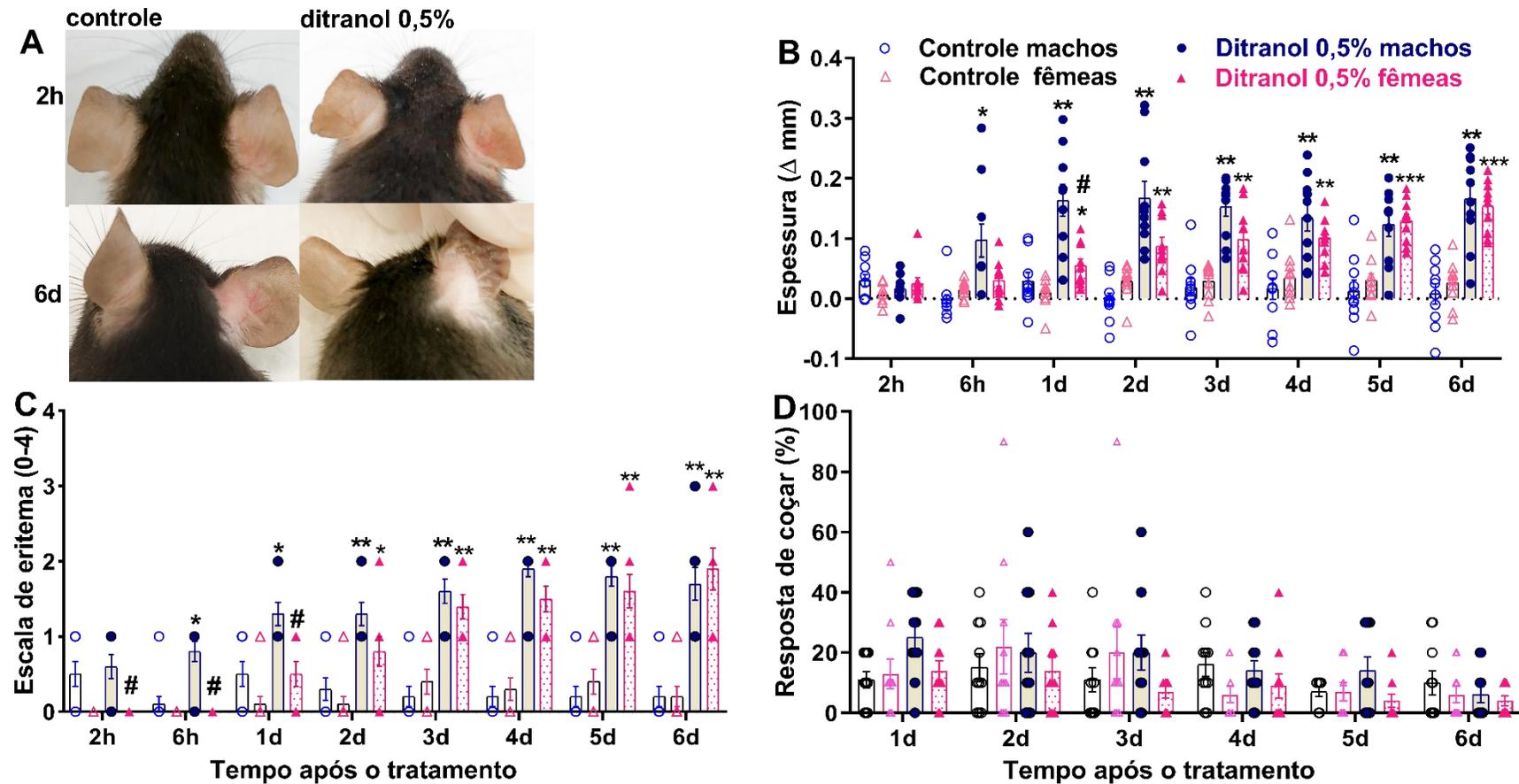


Figura 4. Decurso temporal da irritação da pele aplicada com ditranol 0,5% em machos e fêmeas. Camundongos machos e fêmeas foram tratados com creme veículo (Lanette) ou contendo ditranol 0,5% (n=10). Em A, fotos representativas da irritação. Medidas de edema (B) e eritema (C) foram realizadas 2 horas até 6 dias após o tratamento. A incidência de prurido induzido por estimulação mecânica na pele tratada foi avaliada 24 horas até 6 dias após o tratamento (C). ANOVA de 3 vias (tempo, tratamento e sexo como fatores) com medidas repetidas (fator tempo), seguido por teste post hoc de Tukey. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparado ao grupo controle e cerquilhas quando comparado ao grupo ditranol 0,5% machos. * ou # $p < 0,05$ ** $p < 0,001$ *** $p < 0,0001$. As colunas e as linhas verticais representam a média \pm S.E.M.

Posteriormente, definimos as doses irritativas mínimas para o ditranol no pico do edema e eritema. Fotos representativas da irritação da pele tratada com ditranol 24 horas após e em diferentes doses podem ser vistas na Figura 5A. A dose de ditranol de 0,1% foi suficiente para induzir um eritema estatisticamente significativo, sendo que a dose de 0,5 induziu eritema ainda maior (Fig. 5C). Por outro lado, somente a dose de 0,5% foi capaz de induzir edema (Fig. 5B). Nenhuma dose testada causou prurido nas orelhas tratadas (Fig. 5D). Como o edema de orelha foi escolhido como nosso desfecho primários (por ser uma medida objetiva e quantitativa), utilizamos somente da dose de ditranol 0,5% no decorrer do nosso estudo.

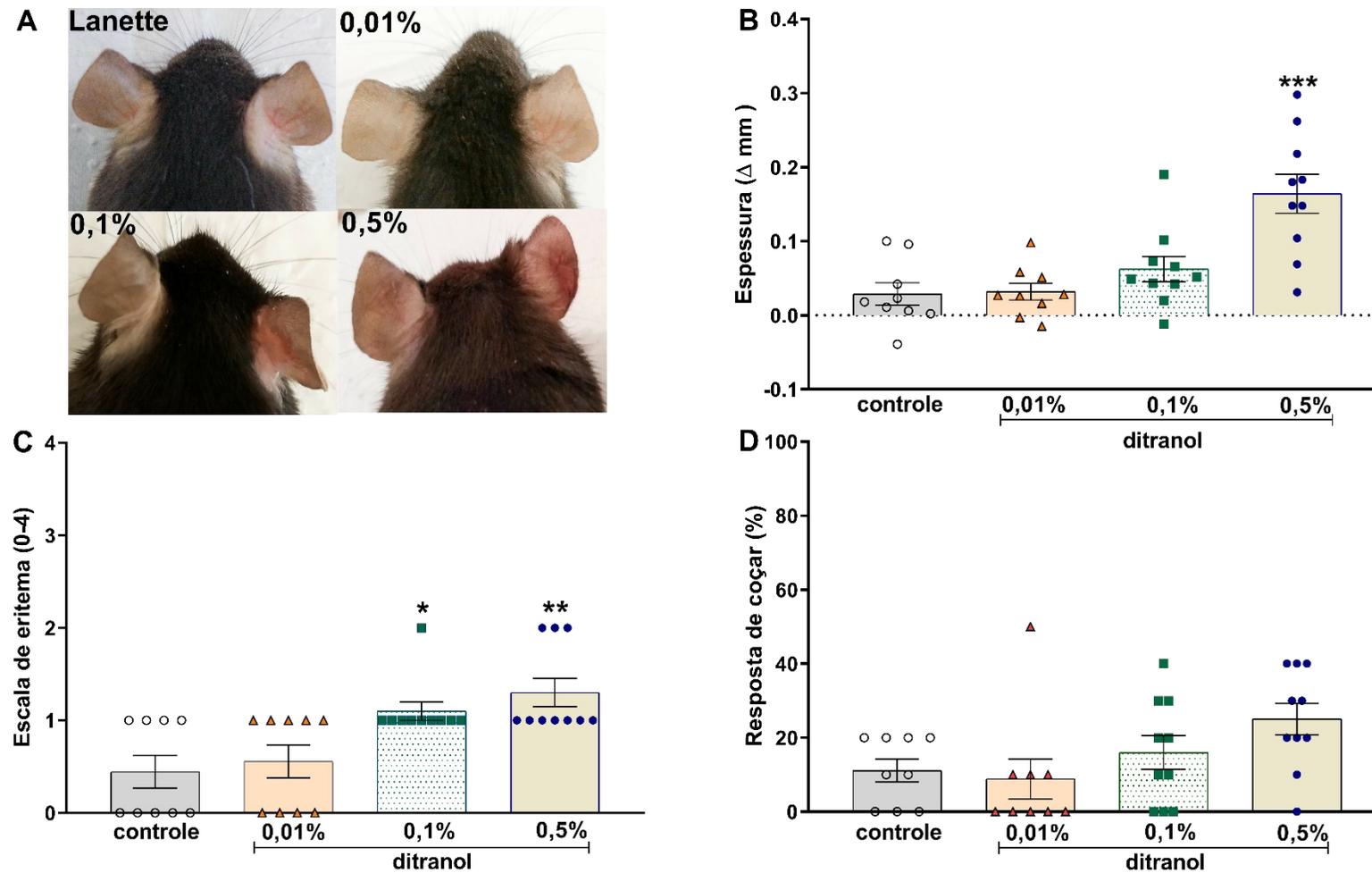


Figura 5. Determinação da dose mínima irritativa de ditranol em camundongos machos. Camundongos machos foram tratados com creme veículo (Lanette) ou contendo ditranol nas concentrações 0,01%, 0,1% e 0,5% (n=10). Em A, fotos representativas da irritação. Em B, C e D são demonstradas, respectivamente, as medidas de edema, eritema e prurido 24 horas após o tratamento. ANOVA de 1 via, seguido por teste post hoc de Dunnett. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparado ao grupo controle. * $p < 0,05$ ** $p < 0,001$ *** $p < 0,0001$. As colunas e as linhas verticais representam a média \pm S.E.M.

4.2 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RNAm PARA TRPV1 EM ANIMAIS TRATADOS COM DITRANOL

Analizamos também a expressão do RNAm codificante para o TRPV1 (*Trpv1*) e para alguns marcadores neuronais (*Trpa1* e *Calca*) e inflamatórios (*IL-1 β* e *Tnf α*) na orelha direita e em linfonodo auricular e gânglios da raiz dorsal (DRG) ipsilaterais, de animais tratados 24 horas antes com ditranol 0,5% ou veículo (Figura 6). A análise de qPCR em tempo real revelou que, comparado aos tecidos dos animais tratados com veículo, o tratamento com ditranol induziu um aumento do *Trpv1* no linfonodo drenante, uma tendência de redução na pele, sem ocorrer alteração no DRG. Como esperado, ocorreu aumento dos RNAm de marcadores inflamatórios nas orelhas e linfonodos auriculares dos animais tratados com ditranol. Curiosamente também foi detectado aumento no *IL-1 β* no DRG dos animais tratados com ditranol. Por outro lado, os RNAm marcadores neuronais não foram detectados nas orelhas ou linfonodos tanto de animais tratados com veículo quanto com ditranol. Porém como esperado, os RNAm de marcadores neuronais foram detectados no DRG de animais tratados com veículo e sua expressão não foi alterada pelo tratamento com ditranol.

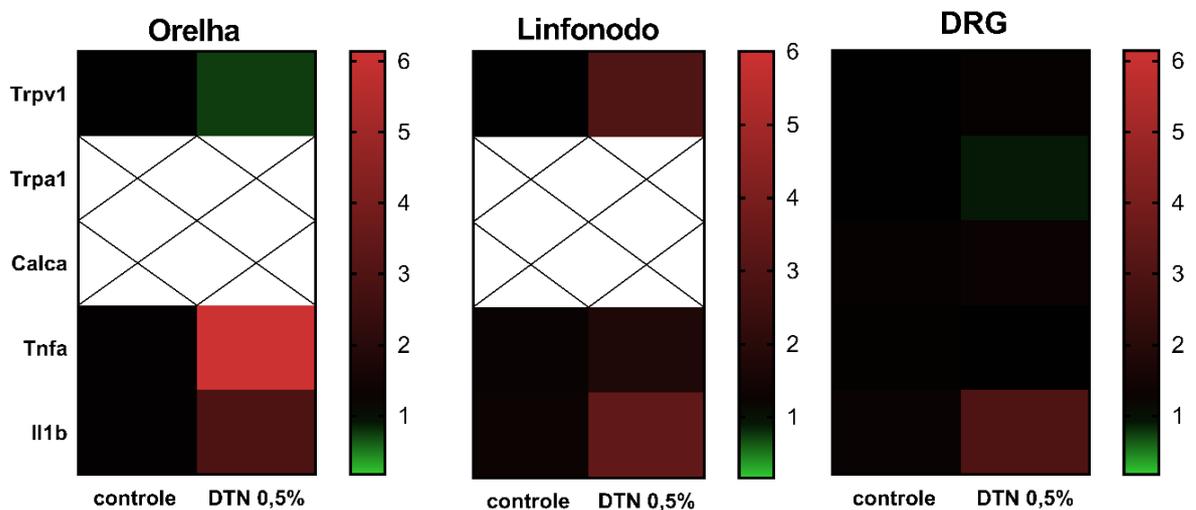


Figura 6. Avaliação da expressão do RNAm para TRPV1 em animais tratados 24 horas antes com ditranol. Mapa de calor a expressão do RNAm codificante para o TRPV1 (*Trpv1*) e para alguns marcadores neuronais (*Trpa1* e *Calca*) e inflamatórios (*IL-1 β* e *Tnf α*) na orelha direita, em linfonodo auricular e gânglios da raiz dorsal (DRG) ipsilaterais, de animais tratados 24 horas antes com ditranol 0,5% ou veículo (controle) (n=2-3 por grupo). Valores de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$), normalizados para *AU* considerando valor de controle igual a 1. X indica que o RNAm indicado não foi detectado no tecido testado.

Posteriormente, investigamos a participação de fibras TRPV1 positivas na irritação de pele causada pelo ditranol. Semelhante ao ditranol, o tratamento tópico com capsaicina (1%, um agonista do receptor TRPV1) induziu edema e eritema, mas não prurido, quando comparado a animais tratados com veículo (Fig. 7). Apesar de apresentar eficácia semelhante ao ditranol, tanto o edema quanto o eritema causado pela capsaicina apareceram muito mais precocemente (tão cedo quanto 30 min após aplicação), mas ocorreram transitoriamente (não sendo mais detectados a partir de 3 horas) (Fig. 7).

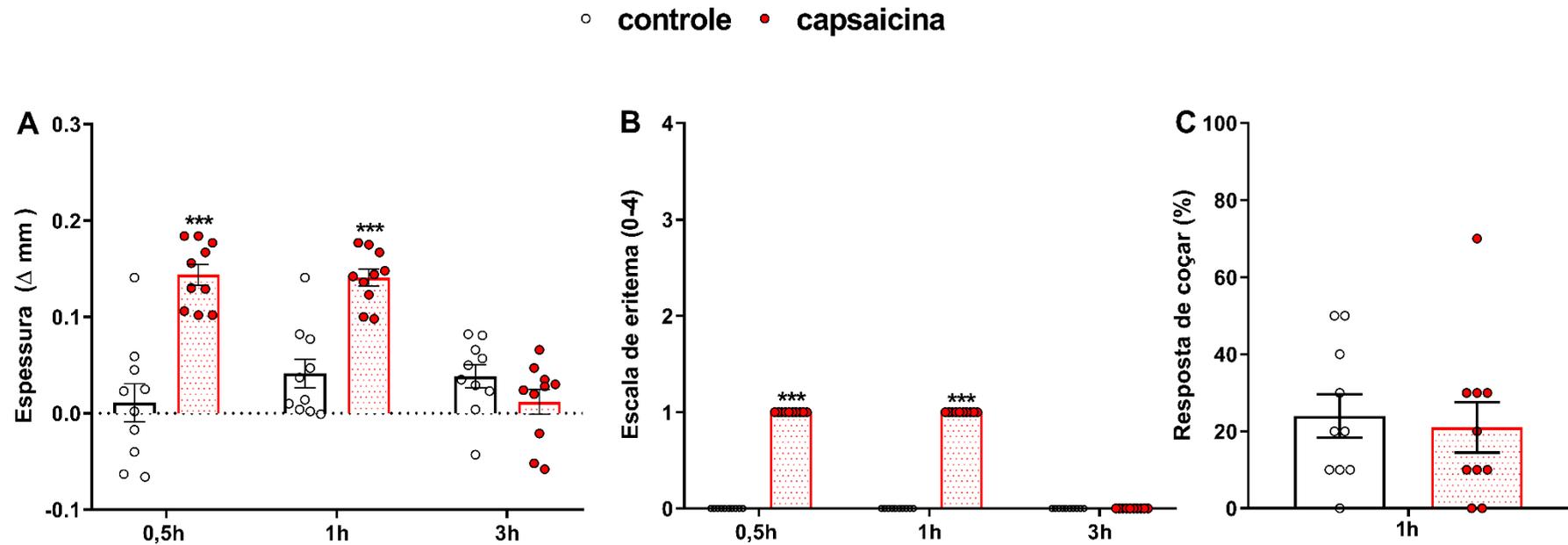


Figura 7. Medidas de edema e eritema de orelha após tratamento com capsaicina 1%. Camundongos machos foram tratados com creme veículo (Lanette) ou contendo capsaicina 1% (n=10). Medidas de edema (A) e eritema (B) foram realizadas 30 minutos, 1 e 3 horas após tratamento. A incidência de prurido induzido por estimulação mecânica na pele tratada foi avaliada 1 hora após o tratamento (C). ANOVA de 2 vias com repetições, seguido por teste post hoc de Sidak. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparado ao grupo controle. * $p=0,01$ ** $p=0,001$ *** $p<0,0001$. Cada coluna representa a média \pm S.E.M.

A seguir, induzimos uma desfuncionalização das fibras TRPV1 positivas por aplicação repetida de capsaicina. De fato, verificamos que, diferente da primeira aplicação, tanto a segunda quanto a terceira aplicação de capsaicina não foram capazes de induzir edema ou eritema (Fig. 8).

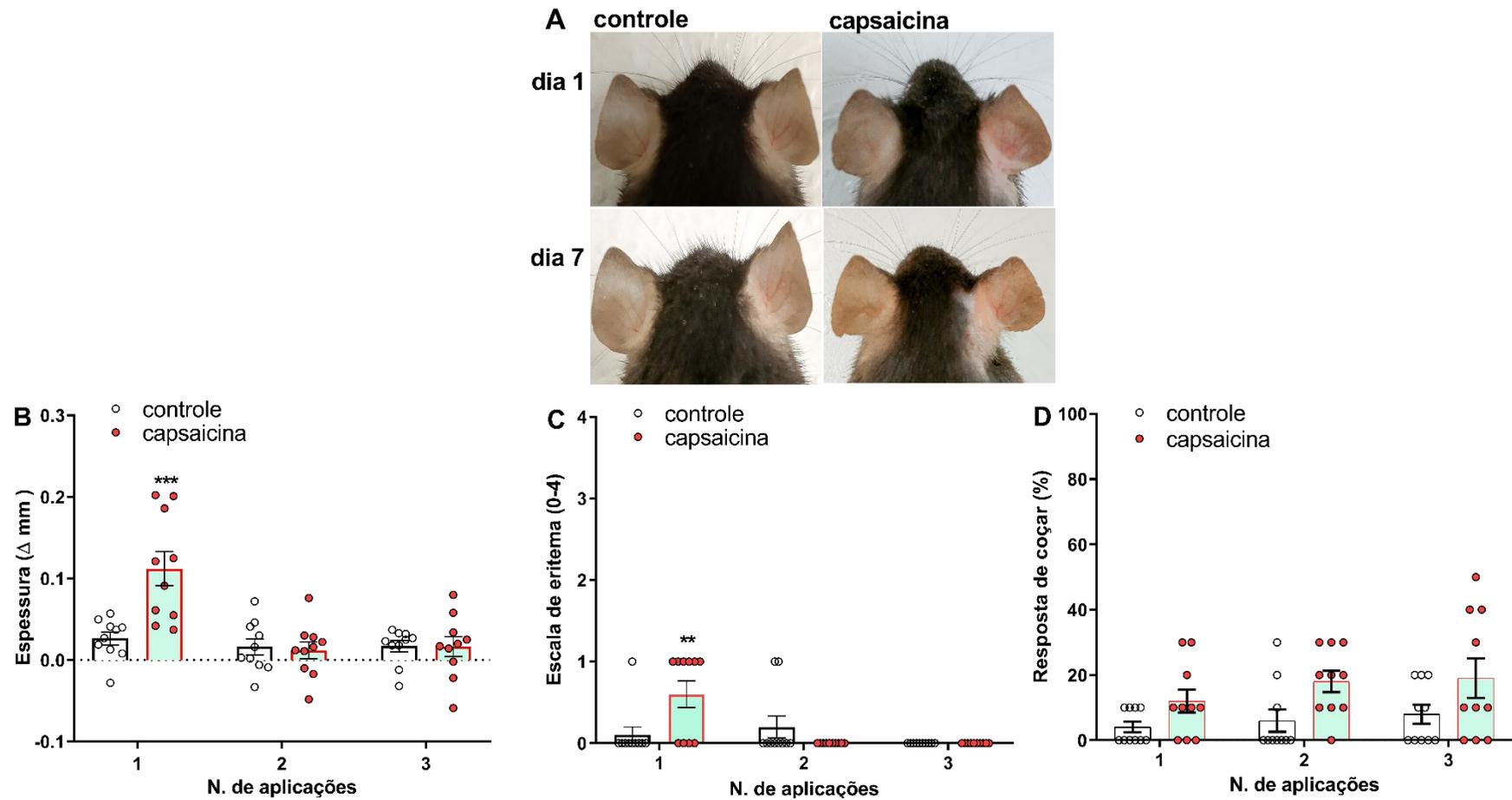


Figura 8. Efeito de aplicações tópicas repetidas de capsaicina 1%. Camundongos machos foram tratados com creme veículo (Lanette) ou contendo capsaicina 1%, 3 vezes em dias alternados (n=10). Em A, fotos representativas da irritação. Medidas de edema (B), eritema (C) e prurido (D) foram realizadas 1 hora após cada tratamento. ANOVA de 2 vias com repetições, seguido por teste post hoc de Sidak. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparado ao grupo controle. *p=0,01 **p=0,001 ***p<0,0001. Cada coluna representa a média \pm S.E.M.

Finalmente, animais pré-tratados com veículo (controle) ou capsaicina foram tratados com ditranol (Figura 9). Ao contrário de nossa hipótese inicial, animais com desfuncionalização das fibras TRPV1 positivas não somente não tiveram alteração da fase inicial (entre 6 horas e 4 dias), mas também tiveram uma piora na fase tardia (entre 5 e 6 dias) da irritação de pele induzida pelo ditranol.

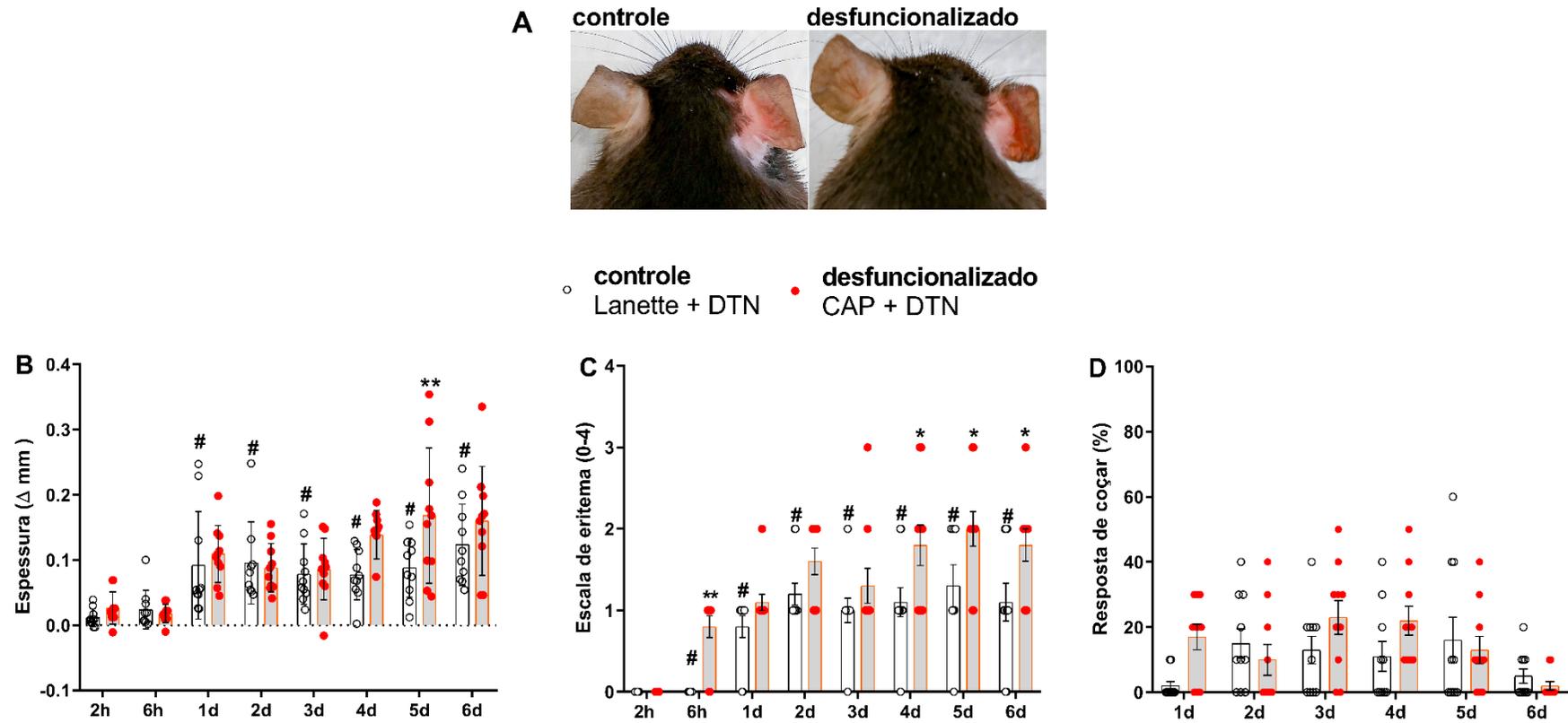


Figura 9. Tratamento com ditranol 0,5% após desfuncionalização de fibras TRPV1⁺: Camundongos machos foram tratados com creme contendo ditranol 0,5% após pré-tratamento com creme veículo (Lanette) ou contendo capsaicina 1% (n=10). Em A, fotos representativas da irritação 6 dias após o tratamento. Medidas de edema (B) e eritema (C) foram realizadas 2 horas até 6 dias após o tratamento. A incidência de prurido induzido por estimulação mecânica na pele tratada foi avaliada 24 horas até 6 dias após o tratamento (D). ANOVA de 2 vias com repetições, seguido por teste post hoc de Sidak. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparado ao grupo controle, e cerquilhas quando comparado com 2 horas após o tratamento. *p=0,01 **p=0,001 ***p<0,0001. Cada coluna representa a média \pm S.E.M.

Sabendo que salicilatos podem dessensibilizar os receptores TRPV1 (MAURER et al., 2014; OHTA; IMAGAWA; ITO, 2009) e alterar propriedades dos cremes contendo ditranol (KNECZKE, RAHM; LANDERSJÖ, 1990), verificamos o efeito da adição de salicilato no efeito irritativo de nossa formulação tópica (Fig. 10). Diferente do ditranol e da capsaicina, a aplicação de creme contendo salicilato isoladamente (2%) não foi capaz de induzir edema ou eritema, tampouco induziu prurido, nos tempos analisados. Apesar da adição de salicilato ao creme de ditranol não ter alterado a fase inicial (de 6 horas até 4 dias), a combinação dos dois fármacos aumentou a intensidade da fase tardia (5-6 dias) da irritação induzida por ditranol, um efeito semelhante ao observado com a desfuncionalização das fibras TRPV1 positivas.

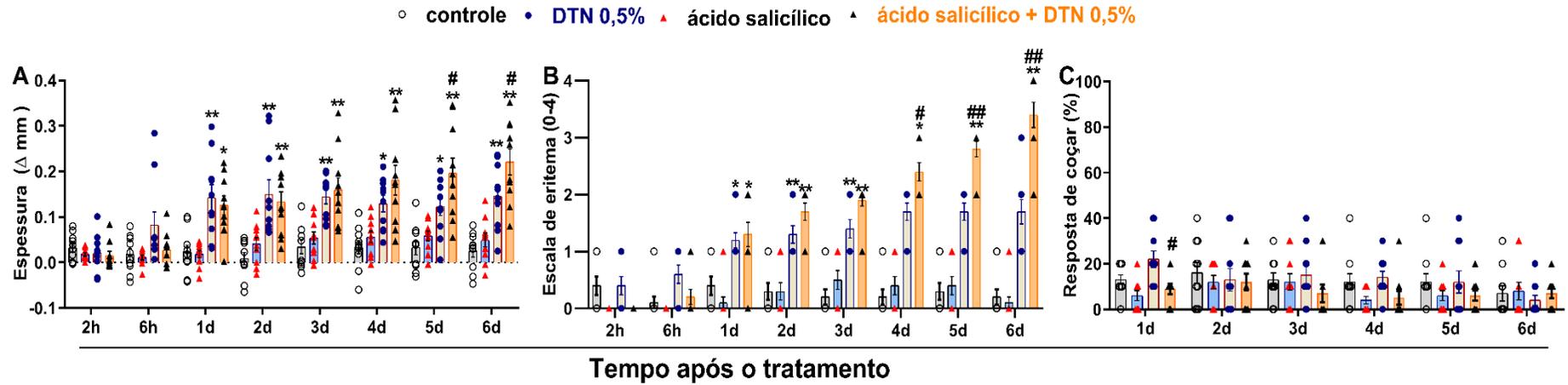


Figura 10. Tratamento com ditranol 0,5% associado a ácido salicílico 2%. Camundongos machos foram tratados com creme veículo (Lanette), creme contendo ácido salicílico 2% e creme contendo ácido salicílico 2% + ditranol 0,5% ou somente ditranol 0,5% (n=10). Medidas de edema (A) e eritema (B) foram realizadas 2 horas até 6 dias após o tratamento. A incidência de prurido induzido por estimulação mecânica na pele tratada foi avaliada 24 horas até 6 dias após o tratamento (C). ANOVA de 2 vias com repetições, seguido por teste post hoc de Tukey. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparado ao grupo controle, e cerquilhas quando comparado ditranol vs ácido salicílico + ditranol. * $p < 0,05$, ** ou ## $p < 0,0001$. Cada coluna representa a média \pm S.E.M.

5 DISCUSSÃO

O ditranol é um dos medicamentos tópicos mais eficazes para o tratamento da psoríase em placa. Além disso, possui outros usos clínicos relevantes, como no tratamento da alopecia areata (NGWANYA et al., 2017). Porém, seu uso é limitado por irritação da pele (perilesional no caso da psoríase), como edema, eritema e prurido, cujos mecanismos não são compreendidos. O presente estudo mostra que a aplicação tópica de ditranol em orelhas de camundongos causa respostas inflamatórias agudas com formação de edema e eritema, mas não prurido, que são independentes da ativação do TRPV1.

O tratamento tópico com ditranol na orelha de camundongos C57Bl/6 causou tanto edema (com dose mínima de 0,5%) quanto eritema (com dose mínima de 0,1%), mas sem induzir prurido detectável por nós. Nossos resultados estão de acordo com um estudo clínico randomizado com 54 pacientes que receberam creme de ditranol (0,25-2%) para tratar psoríase em placa e que demonstrou que o efeito adverso mais frequente produzido foi a irritação da pele (72% com eritema e edema), enquanto somente 8% apresentaram prurido (HUTCHINSON; MARKS; WHITE, 2000). Como não houve respostas a arranhão evocado, também observamos se os animais apresentavam respostas de coceira espontânea. Nossos dados preliminares também indicam que o ditranol também não foi capaz de induzir comportamentos pruriginosos espontâneos 24 horas após o tratamento (Fig. Suplementar 3, Apêndice). Assim como nossos achados, estudos prévios demonstraram que a dose é fator importante não somente para a duração, mas também a intensidade da irritação induzida por ditranol (JUHLIN, 1981; GÖRANSSON, 1987).

Também vimos que, em machos, essa irritação começou após 6 horas, teve pico em 1 dia e continuou intensa até 6 dias após o tratamento, mas em fêmeas o edema e o eritema tiveram início mais tardio (após 1 dia). De fato, o ditranol é conhecido como um dos poucos compostos que causam irritação cutânea retardada em humanos e roedores, com resposta inflamatória máxima 24 a 48 horas e durando até uma semana após a aplicação de uma única dose (JUHLIN, 1981; PARAMSOTHY & LAWRENCE, 1987; VILUKSELA, 1991). O mecanismo dessa inflamação tardia não é completamente compreendido. Inicialmente, foi sugerido estar relacionado à formação de espécies de oxigênio ativo durante a autooxidação do ditranol (SHROOT; BROWN, 1986). Posteriormente, foi relacionado a necrose e a apoptose de queratinócitos, melanócitos e células de Langerhans observadas 24 horas após aplicação de ditranol na pele humana saudável (KANERVA, 1990a).

O efeito irritante prolongado do ditranol tópico (até 8 dias) também foi observado na pele saudável de humanos associado com proliferação epidérmica, aumento de linfócitos T, macrófagos e redução de células de Langerhans (SWINKELS et al., 2002). Assim o aumento da espessura de orelha observada por nós, mesmo em tempos tardios (após 4-5 dias) pode representar não somente edema, mas também hiperplasia de orelha (VILUKSELA, 1991), o que está de acordo com a descamação observada 5 dias após a aplicação. Além disso, o ditranol (antralina) tópico é um conhecido promotor de tumor na pele de camundongos (SEGAL; KATZ; VAN DUUKEN, 1971).

Em relação ao dimorfismo sexual, um estudo clínico não observou diferença entre homens e mulheres na intensidade de edema induzido 48 horas após aplicação tópica de ditranol (LAWRENCE; HOWEL; SHUSTER, 1986). No melhor dos nossos conhecimentos, não existem estudos investigando sexo como um fator a irritação induzida por ditranol em camundongos, apesar de muitos artigos terem usado fêmeas para caracterizar o modelo (p.ex. LANGE et al., 1998; VILUKSELA, 1991; VILUKSELA; KOSMA, 1991). Assim, a irritação de desenvolvimento mais lento observada por nós em fêmeas deve ser levada em consideração em estudos futuros.

Para investigar os fatores que medeiam a inflamação da pele induzida por ditranol, a expressão de vários mRNAs, incluindo do TRPV1, foi analisada por qPCR em tempo real que revelou que o tratamento com ditranol induziu um aumento do *Trpv1* no linfonodo, e apresentou uma tendência de redução na pele, sem ocorrer alteração no DRG, quando comparado aos tecidos dos animais tratados com veículo. De fato, o RNAm para o TRPV1 é altamente expresso nos corpos celulares dos neurônios sensoriais DRG, mas sua expressão não é modificada por infamação periférica (JI et al., 2002). Além de neurônios sensoriais, o TRPV1 também pode ser expresso (em nível de RNAm e de proteína) por várias células da pele, especialmente queratinócitos (STÄNDER et al., 2004). A redução do RNAm para TRPV1 na pele pode estar relacionada com a necrose e a apoptose de queratinócitos 24 horas após a aplicação de ditranol. Semelhante ao ditranol, uma redução do RNAm codificante do TRPV1 também foi observada na pele de humanos 24 horas após a irradiação ultravioleta UV-C, que também produz inflamação de pele tardia (WEINKAUF et al., 2012). Embora haja evidências para a biossíntese local de proteínas em terminações periféricas de neurônios sensoriais, estas não necessariamente contribuiriam para mudanças de expressão devido à diluição maciça de RNA causada por células residentes ou infiltrantes na pele (JIMÉNEZ-

DÍAZ et al., 2008; WEINKAUF et al., 2012). De fato, os RNAm marcadores neuronais (codificantes do TRPA1 e do CGRP) não foram detectados nas orelhas (ou linfonodos) tanto de animais tratados com veículo quanto com ditranol. Curiosamente, ocorreu aumento no RNAm para o TRPV1 no linfonodo drenante das orelhas tratadas com ditranol. Evento semelhante foi descrito nos linfonodos de camundongos tratados repetidamente com o agente irritante formaldeído (SAITO et al., 2011). Fontes desse aumento de RNAm para o TRPV1 poderiam ser linfócitos e células dendríticas, que parecem expressar esse receptor (BASU; SRIVASTAVA, 2005) e estarem ativadas 24 horas após aplicação de ditranol na pele humana (SWINKELS et al., 2002). O aumento dos RNAm de marcadores inflamatórios (codificantes da interleucina-1 β e do fator de necrose tumoral- α) nos linfonodos drenantes dos animais tratados com ditranol não surpreende, já que foram relatados casos de linfadenopatia em pacientes com alopecia e em uso tópico de ditranol (FIEDLER-WEISS; BUYS, 1987). O aumento dos RNAm de marcadores inflamatórios na pele tratada com ditranol também já foi evidenciado previamente na pele murina ou humana tratada com ditranol (BENEZEDER et al., 2021; LANGE et al., 1998).

Após o primeiro tratamento, a aplicação tópica de creme com capsaicina 1% produziu eritema e edema transitórios (observada 0,5 e 1 hora, mas não 3 horas) após a primeira aplicação quando comparada ao veículo, sem ser capaz de induzir prurido. Nossos resultados estão de acordo com o trabalho de Silva e colaboradores (2011) que observou edema de orelha de camundongos tratados com capsaicina 1% diluída em acetona. Esses dados também concordam com achados clínicos que indicam que a aplicação tópica de capsaicina em seres humanos saudáveis causou dor (mas não prurido) e eritema, além de aumentou o fluxo sanguíneo no local de aplicação (MOHAMMADIAN; ANDERSEN; ARENDT-NIELSEN, 1998; SIMONE & OCHOA (1991). A avaliação de segurança a longo com um adesivo de capsaicina 8% em pacientes que apresentavam dor neuropática periférica também demonstrou que os principais efeitos adversos após tratamento com capsaicina são eritema, dor e edema no local de aplicação (SIMPSON et al., 2010).

O trabalho pioneiro do grupo de Gabor Jancso na Hungria mostrou que a capsaicina reduziu a capacidade de resposta das terminações nervosas sensoriais a irritantes químicos em roedores. Eles descobriram que a aplicação repetida de capsaicina na pele e em outros tecidos levava a uma insensibilidade gradual à capsaicina aplicada posteriormente ou a outros irritantes, que durou dias (JANCSO & JANCSO, 1949). Estudos subsequentes em humanos mostraram que a aplicação tópica de capsaicina induziu a perda de sensibilidade não apenas às aplicações seguintes de capsaicina, mas também a vários outros estímulos químicos, como

histamina, bradicinina e mentol (CLIFF; GREEN, 1996; LO VECCHIO; ANDERSEN; ARENDT-NIELSEN, 2018; WALLENGREN; HÅKANSON, 1992). Altas doses de capsaicina tópica ($\geq 1\%$) induzem a perda de sensibilidade que não é prontamente reversível, mas que pode durar por meses. Esta desfuncionalização de longo prazo é provavelmente mediada pela ablação estrutural dos terminais aferentes que expressam o receptor TRPV1 (TRPV1 positivos) (ARORA; CAMPBELL; CHUNG, 2020; HOLZER P., 1991). Em nosso trabalho, assim como outros na literatura (SILVA et al., 2011; INOUE et al., 1997), a capsaicina 1% não foi capaz de causar edema após a segunda e terceira aplicação, demonstrando a desfuncionalização das fibras positivas para TRPV1 na pele aplicada.

Recentemente, percebeu-se que as fibras TRPV1 positivas detectam estímulos nocivos e desempenham um papel fundamental na modulação da imunidade cutânea por meio da liberação de neuropeptídeos (BARAL; UDIT; CHIU, 2019). Na pele, este subconjunto de neurônios pode ser ativado diretamente por produtos derivados de patógenos como *S. aureus*, *C. albicans* e *S. pyogenes*, é necessário o suficiente para fornecer defesa do hospedeiro contra infecção por *C. albicans* (CHIU et al., 2013; COHEN et al., 2019; KASHEM et al., 2015; PINHO-RIBEIRO; CHIU, 2019). Assim, neurônios que expressam TRPV1 parecem desempenhar um papel obrigatório no desenvolvimento de múltiplas respostas inflamatórias cutâneas. Nossos resultados mostraram que a desfuncionalização de fibras TRPV1 positivas piorou a irritação causada por ditranol, principalmente na fase tardia, sugerindo que essas fibras podem influenciar na proteção da pele contra algumas substâncias irritantes. Semelhante ao nosso achado, já foi demonstrado que fibras TRPV1 positivas podem atuar de maneira protetora na pele em modelos de dermatite psoríaseiforme (KEMÉNY et al., 2018). Também já há evidências para um papel protetor de fibras TRPV1 positivas em modelo de dermatite alérgica de contato induzido por oxazolona em orelha de camundongos (BÁNVÖLGYI et al., 2005). Finalmente, as fibras TRPV1 positivas exerceram papel protetor no edema de orelha induzido por dibutiléster de ácido esquárico (SADBE) por meio da modulação da função dos macrófagos dérmicos (FENG et al., 2017).

Posteriormente, verificamos se a dessensibilização do receptor TRPV1 poderia alterar a irritação de pele induzida pelo ditranol. Essa dessensibilização foi induzida pela incorporação de salicilato na formulação tópica, pois é conhecido na literatura que salicilatos podem dessensibilizar os receptores TRPV1 (MAURER et al., 2014; OHTA; IMAGAWA; ITO, 2009). Da mesma forma que a desfuncionalização das fibras TRPV1 positivas, a

incorporação de salicilato (2%) aumentou a intensidade da irritação induzida por ditranol na fase tardia. Esse resultado está de acordo com estudos clínicos que demonstraram que a adição de salicilatos não altera a eficácia, mas aumenta a irritação induzida pelo ditranol (DE MARE et al., 1988; PRINS et al., 1988). Alguns achados apoiam a hipótese de que o TRPV1 desempenha efeito anti-inflamatório em modelos de dermatite de contato, com níveis aumentados de TNF α em camundongos nocautes para TRPV1 (BÁNVÖLGYI et al., 2005). Além disso, o TRPV1 exibiu propriedades anti-inflamatórias por inibir a diferenciação, maturação, fagocitose e produção de citocinas pró-inflamatórias de células dendríticas (TÓTH et al., 2009). Porém, nosso resultado deve ser interpretado com cuidado, pois apesar de produzir efeito semelhante à desfuncionalização do TRPV1, a piora na irritação do ditranol induzida por salicilato também poderia estar relacionada ao seu efeito em alterar propriedades dos cremes contendo ditranol, incluindo sua estabilidade (KNECZKE; RAHM; LANDERSJO, 1990; WUIS et al., 1999).

Em nosso trabalho também avaliamos se o pré-tratamento com antagonista do receptor TRPV1, o 4-tert-butylcyclohexanol, era capaz de alterar a irritação de pele ocasionada por ditranol (Fig. Suplementar 1, Apêndice). Estudos clínicos verificaram que o uso tópico desse antagonista, na mesma dose usado por nós (0,4%), reduziu a irritação de pele induzida por capsaicina e alguns cosméticos (SROUR et al., 2019; SULZBERGER et al., 2016). Porém, nossos resultados preliminares demonstraram que o pré-tratamento com antagonista não foi capaz de diminuir a irritação na pele dos animais após o tratamento com ditranol. Mais blocos experimentais são necessários para confirmarmos esses resultados. Porém, nosso resultado está de acordo com uma triagem de alta capacidade que indicou a inabilidade do ditranol em ativar o TRPV1 expresso em células transfectadas *in vitro* (“National Center for Biotechnology Information”, 2021). Dessa forma, diferente de nossa hipótese inicial, o ditranol não parece causar irritação de pele pela ativação do TRPV1.

Um estudo recente para esclarecer os efeitos do ditranol na pele saudável (BENEZEDER et al. 2021), demonstrou um forte aumento na expressão de mRNA para alguns padrões moleculares associados à dano (DAMPs), incluindo proteínas S100A, na pele tratada com ditranol. Como essas DAMPs podem ser detectados por receptores de reconhecimento de padrões, como os receptores tipo toll (TLRs), avaliamos se animais nocaute para os receptores TLR2 e TLR4 apresentavam diminuição na irritação causada pelo ditranol (Fig. Suplementar 2, Apêndice). No entanto, os resultados prévios de nosso trabalho, mostram que houve pouca alteração do edema e eritema causado pelo ditranol nos animais nocaute quando comparado a animais C57BL/6, com uma redução significativa do edema em

animais TLR4 nocautes em 24 horas e uma tendência de aumento no edema em animais TLR2 nocautes na fase tardia. Assim, o papel do receptor TLR4 na irritação de pele induzida pelo ditranol deve ser melhor estudado no futuro.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo mostra que a aplicação tópica de ditranol em orelhas de camundongos causa respostas inflamatórias agudas com formação de edema e eritema, que são independentes da ativação de fibras positivas para TRPV1. Dessa forma, o exato mecanismo pelo qual o ditranol causa irritação da pele saudável permanece desconhecido.

REFERÊNCIAS

- ANAND, P.; BLEY, K. Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch. **British Journal of Anaesthesia**, v. 107, n. 4, p. 490–502, 1 out. 2011.
- ARORA, V.; CAMPBELL, J. N.; CHUNG, M. K. Fight fire with fire: Neurobiology of capsaicin-induced analgesia for chronic pain, **Pharmacology and Therapeutics**, v.220, p.1-21, 2021.
- ASHTON, R. . Anthralin: historical and current perspectives. **Journal of the American Academy Dermatology**, v. 9, n. 2, p. 173–192, 1983.
- BÁNVÖLGYI, Á. et al. 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, 1 dez. 2005.
- BARAL, P.; UDIT, S.; CHIU, I. M. Pain and immunity: implications for host defence. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 7, p. 433–447, 15 mar. 2019.
- BASBAUM et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, v. 139, p. 267–284, 2009.
- BASU, S.; SRIVASTAVA, P. Immunological role of neuronal receptor vanilloid receptor 1 expressed on dendritic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 14, p. 5120, 5 abr. 2005.
- BENEZEDER, T. et al. Dithranol targets keratinocytes, their crosstalk with neutrophils and inhibits the IL-36 inflammatory loop in psoriasis, **eLife**, v.9, p. 1-31, 2020.
- BENEZEDER, T. et al. Induction of IL- 1 β and antimicrobial peptides as a potential mechanism for topical dithranol. **Experimental Dermatology**, n.00, p. 1–6, 2021.
- BERNSTEIN, J. E. et al. Effects of topically applied capsaicin on moderate and severe psoriasis vulgaris. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 15, n. 3, p. 504–507, 1986.
- BOEHNCKE, W. H.; SCHÖN, M. P. Psoriasis. **The Lancet**, v. 386, n. 9997, p. 983–994, 2015.
- CATERINA, M. J. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, n. 6653, p. 816–824, 1997.
- CATERINA, M. J.; PANG, Z. TRP channels in skin biology and pathophysiology. **Pharmaceuticals**, v. 9, n. 4, 2016.

- CEVIKBAS, F. et al. A Sensory Neuron-expressed Interleukin-31 Receptor Mediates T helper Cell-dependent Itch: Involvement of TRPV1 and TRPA1. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.133, n.2, p.448-460
- CHAPLAN, S. R.; POGRELAND, J. W.; YAKSH, T. L. Role of Voltage-Dependent Calcium Channel Subtypes in Experimental Tactile Allodynia, **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.269, n.3, p.1117-1123, 1994.
- CHIRICOZZI, A. et al. Treatment of psoriasis with topical agents: Recommendations from a Tuscany Consensus. **Dermatologic Therapy**, v. 30, n. 6, p. 1–10, 2017.
- CHIU, I. M. et al. Bacteria activate sensory neurons that modulate pain and inflammation. **Nature**, v. 501, n. 7465, p. 52–57, 21 ago. 2013.
- CHUANG, H.-H.; LIN, S. Oxidative challenges sensitize the capsaicin receptor by covalent cysteine modification. **PNAS**, v.106, n.47, p. 20097-20102, 2009.
- CLAPHAM, D. E. TRP channels as cellular sensors. **Nature**, v. 520, p. 439-441, 2015.
- CLIFF, M. A.; GREEN, B. G. Sensitization and desensitization to capsaicin and menthol in the oral cavity: Interactions and individual differences. **Physiology & Behavior**, v. 59, n. 3, p. 487–494, 1 mar. 1996.
- COHEN, J. A. et al. Cutaneous TRPV1+ Neurons Trigger Protective Innate Type 17 Anticipatory Immunity. **Cell**, v. 178, n. 4, p. 919- 932.e14, 8 ago. 2019.
- DE MARE, S. et al. The relevance of salicylic acid in the treatment of plaque psoriasis with dithranol creams. **Skin Pharmacology and Physiology**, v.1, n.4, p.259-64, 1988.
- DENG, Y.; CHANG, C.; LU, Q. The Inflammatory Response in Psoriasis: a Comprehensive Review. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 50, n. 3, p. 377–389, 2016.
- EBERHARDT, M. J. et al. Reactive metabolites of acetaminophen activate and sensitize the capsaicin receptor TRPV1. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.
- FENG, J. et al. Sensory TRP channels contribute differentially to skin inflammation and persistent itch. **Nature Communications** 2017 8:1, v. 8, n. 1, p. 1–12, 30 out. 2017.
- FERNANDES, E. S.; FERNANDES, M. A.; KEEBLE, J. E. The functions of TRPA1 and TRPV1: Moving away from sensory nerves, **British Journal of Pharmacology**, v. 166, p.510-521, 2012.
- FIEDLER-WEISS, V. C.; BUYS, C. M. Evaluation of Anthralin in the Treatment of Alopecia Areata. **Archives of Dermatology**, v. 123, n. 11, p. 1491–1493, 1987.
- FINNEN, M. J.; LAWRENCE, C. M.; SHUSTER, S. Inhibition of Dithranol Inflammation By Free-Radical Scavengers. **The Lancet**, v. 324, n. 8412, p. 1129–1130, 1984.
- GEPPETTI, P. et al. The concept of neurogenic inflammation. **BJU International**, v. 101, p. 2-6, 2008.

GLINSKI, W.; GLINSKA-FERENZ, M.; PIEROZYNSKA-DUBOWSKA, M. Neurogenic inflammation induced by capsaicin in patients with psoriasis. **Acta Dermato-Venereologica**, v.71, n.1, p.51-4, 1991.

GÖRANSSON, A. Irritation and staining by dithranol (anthralin) and butantrone (10-butyryl dithranol): further short contact and tape stripping experiments. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 67, n. 1, p. 72-76, 1987.

GOTTLIEB, A. B. Psoriasis: Emerging therapeutic strategies. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 1, p. 19–34, 2005.

GREB, J. E. et al. Psoriasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 1-17, 2016.

HAWKES, J. E. et al. Discovery of the IL-23/IL-17 Signaling Pathway and the Treatment of Psoriasis. **The Journal of Immunology**, v. 201, p. 1605–1613, 2020.

HOLZER P. Capsaicin : Cellular Selectivity Targets , for Thin Mechanisms of Action , Sensory Neurons. **Pharmacological Review**, v. 43, n. 2, p. 143–201, 1991.

HUANG, T. et al. Identifying the pathways required for coping behaviours associated with sustained pain. **Nature**, 2019.

HUTCHINSON, P. E.; MARKS, R.; WHITE, J. The Efficacy, Safety and Tolerance of Calcitriol 3 µg/g Ointment in the Treatment of Plaque Psoriasis: A Comparison with Short-Contact Dithranol. **Dermatology**, v. 201, n. 2, p. 139–145, 2000.

INOUE, H. et al. Mechanism of mustard oil-induced skin inflammation in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 333, n. 2–3, p. 231–240, 27 ago. 1997.

INOUE, K. et al. Functional Vanilloid Receptors in Cultured Normal Human Epidermal Keratinocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 291, n. 1, p. 124–129, 15 fev. 2002.

JACOBI, A.; MAYER, A.; AUGUSTIN, M. Keratolytics and Emollients and Their Role in the Therapy of Psoriasis: a Systematic Review. **Dermatologic Therapy**, v. 5, p. 1–18, 2015.

JANCSO, N., & JANCSO, A. Desensitization of sensory nerve endings. **Orvostudomány**, v. 2, p. 1–43. 1949.

JL, R. R. et al. p38 MAPK Activation by NGF in Primary Sensory Neurons after Inflammation Increases TRPV1 Levels and Maintains Heat Hyperalgesia. **Neuron**, v. 36, n. 1, p. 57–68, 26 set. 2002.

JIMÉNEZ-DÍAZ, L. et al. Local Translation in Primary Afferent Fibers Regulates Nociception. **PLOS ONE**, v. 3, n. 4, p. e1961, 9 abr. 2008.

JORDT, S. E. et al. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. **Nature**, v. 427, n. 6971, p. 260–265, 2004.

- JUHLIN L. Factors influencing anthralin irritancy. **British Journal of Dermatology**, v. 105, p. 87–91, 1981.
- KAAZ, K.; SZEPIETOWSKI, J. C.; MATUSIAK, Ł. Influence of itch and pain on sleep quality in atopic dermatitis and psoriasis. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 99, n. 2, p. 175–180, 2019.
- KANERVA, L. Electron microscopic observations of dyskeratosis, apoptosis, colloid bodies and fibrillar degeneration after skin irritation with dithranol. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 17, n. 1, p. 37–44, 1990.
- KARK, T. et al. Tissue specific regulation of microvascular diameter: opposite functional roles of neuronal and smooth muscle located vanilloid receptor-1 (TRPV1). **Molecular Pharmacology Fast Forward. Published on February**, v. 6, 2008.
- KASHEM, S. W. et al. Nociceptive Sensory Fibers Drive Interleukin-23 Production from CD301b+ Dermal Dendritic Cells and Drive Protective Cutaneous Immunity. **Immunity**, v. 43, n. 3, p. 515–526, 15 set. 2015.
- KEMÉNY, Á. et al. TRPA1 Acts in a Protective Manner in Imiquimod-Induced Psoriasiform Dermatitis in Mice. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 138, n. 8, p. 1774–1784, 2018.
- KIM, W. B.; JEROME, D.; YEUNG, J. Diagnosis and management of psoriasis. **Canadian Family Physician**, v. 63, n. 4, p. 278–285, 2017.
- KNECZKE, M.; RAHM, C.; LANDERSJÖ, L. The influence of salicylic acid on the in vitro release of anthralin from an o/w cream. **Acta Pharmaceutica Nordica**, v.2, n.5, p.313-8, 1990.
- KODJI, X. et al. Sensory nerves mediate spontaneous behaviors in addition to inflammation in a murine model of psoriasis. **FASEB Journal**, v. 33, n. 2, p. 1578–1594, 2019.
- KRAGBALLE, K. et al. A 52-week randomized safety study of a calcipotriol/betamethasone dipropionate two-compound product (Dovobet/Daivobet/Taclonex) in the treatment of psoriasis vulgaris. **British Association of Dermatologists**, v. 154, p. 1155–1160, 2006.
- KUBANOV, A. A.; KATUNINA, O. R.; CHIKIN, V. V. Expression of Neuropeptides, Neurotrophins, and Neurotransmitters in the Skin of Patients with Atopic Dermatitis and Psoriasis. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 159, n. 3, p. 295–299, 2015.
- KUEPER, T. et al. Inhibition of TRPV1 for the treatment of sensitive skin. **Experimental Dermatology**, v. 19, n. 11, p. 980–986, 2010.
- LAMOTTE, R. H.; SHIMADA, S. G.; SIKAND, P. Mouse models of acute, chemical itch and pain in humans. **Experimental Dermatology**, v. 20, p. 778-782, 2011.
- LANGE, R. W. et al. Antioxidants attenuate anthralin-induced skin inflammation in BALB/c mice: Role of specific proinflammatory cytokines. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 64, n. 2, p. 170–176, 1998.
- LAWRENCE, C. M.; HOWEL, D.; SHUSTER, S. Site variation in anthralin inflammation on forearm skin. **British Journal of Dermatology**, v. 114, n. 5, p. 609–613, 1986.

LEBWOHL, M. Psoriasis. **Annals of internal medicine**, v. 168, n. 7, p. ITC49–ITC64, 2018.

LIAO, M. et al. Single particle electron cryo-microscopy of a mammalian ion channel. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 27, n. 1, p. 1–7, ago. 2014.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LO VECCHIO, S.; ANDERSEN, H. H.; ARENDT-NIELSEN, L. The time course of brief and prolonged topical 8% capsaicin-induced desensitization in healthy volunteers evaluated by quantitative sensory testing and vasomotor imaging. **Experimental Brain Research**, v. 236, n. 8, p. 2231–2244, 1 ago. 2018.

LOWE, NICHOLAS J; BREEDING, J. Anthralin Different Concentration Effects on Epidermal Cell DNA Synthesis Rates in Mice and Clinical Responses in Human Psoriasis. **Archives of Dermatology Research**, v. 117, p. 698–700, 1981.

MADAN, R. K.; LEVITT, J. A review of toxicity from topical salicylic acid preparations. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 70, n. 4, p. 788–792, 2014.

MASON, A. et al. Topical treatments for chronic plaque psoriasis: An abridged Cochrane Systematic Review. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 69, n. 5, p. 799–807, 2013.

MAURER, K. et al. Acetylsalicylic acid enhances tachyphylaxis of repetitive capsaicin responses in TRPV1-GFP expressing HEK293 cells. **Neuroscience Letters**, v. 563, p. 101–106, 20 mar. 2014.

MOHAMMADIAN, P.; ANDERSEN, O. K.; ARENDT-NIELSEN, L. Correlation between local vascular and sensory changes following tissue inflammation induced by repetitive application of topical capsaicin. **Brain Research**, v. 792, n. 1, p. 1–9, 4 maio 1998.

NAST, A. et al. S3 - Guidelines on the treatment of psoriasis vulgaris (English version). Update. **JDDG - Journal of the German Society of Dermatology**, v. 10, n. SUPPL.2, p. 1–95, 2012.

National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 30 nov. 2021.

NATTKEMPER, L. A. et al. The Genetics of Chronic Itch: Gene Expression in the Skin of Patients with Atopic Dermatitis and Psoriasis with Severe Itch. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 138, n. 6, p. 1311–1317, 2018.

NESTLE, F; KAPLAN, D.H; BARKER, J. Psoriasis. **The New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 5, p. 496-509. 2009.

NGWANYA, M. R. et al. Higher concentrations of dithranol appear to induce hair growth even in severe alopecia areata. **Dermatologic Therapy**, v. 30, n. 4, p. e12500, 1 jul. 2017.

- OHTA, T.; IMAGAWA, T.; ITO, S. Involvement of Transient Receptor Potential Vanilloid Subtype 1 in Analgesic Action of Methylsalicylate. **Molecular Pharmacology**, v. 75, n.2, p. 307-317, 2009.
- OROJAN, I. et al. Dithranol abolishes UCH-L1 immunoreactivity in the nerve fibers of the rat orofacial skin. **Brain Research**, v. 1121, n. 1, p. 216–220, 22 nov. 2006.
- PARAMSOTHY, Y.; LAWRENCE, C. M. Time course and intensity of anthralin inflammation on involved and uninvolved psoriatic skin. **British Journal of Dermatology**, v. 116, p. 517–519, 1987.
- PARSLEW, R.; FRIEDMANN, P. S. The irritancy of anthralin is inhibited by repeat applications of a subirritant concentration. **British Journal of Dermatology**, v. 141, n. 3, p. 469–474, 1999.
- PAUL, C. et al. Evidence-based recommendations on topical treatment and phototherapy of psoriasis: Systematic review and expert opinion of a panel of dermatologists. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 26, n. SUPPL. 3, p. 1–10, 2012.
- PEREIRA, U. et al. Mechanisms of the sensory effects of tacrolimus on the skin. **British Journal of Dermatology**, v. 163, n. 1, p. 70–77, 2010.
- PINHO-RIBEIRO, F. A.; CHIU, I. M. Nociceptor nerves set the stage for skin immunity. **Cell Research**, v. 29, n. 11, p. 877, 1 nov. 2019.
- PRINS, M. et al. Skin Irritation by Dithranol. **Acta Dermato Venereologica**, v. 78, p. 262–265, 1998.
- RIOL-BLANCO, L. et al. Nociceptive sensory neurons drive interleukin-23-mediated psoriasiform skin inflammation. **Nature**, v. 510, n. 7503, p. 157–161, 2014.
- SAITO, A. et al. Characterization of skin inflammation induced by repeated exposure of toluene, xylene, and formaldehyde in mice. **Environmental Toxicology**, v. 26, n. 3, p. 224–232, 1 jun. 2011.
- SAKAI, K. et al. Mouse model of imiquimod-induced psoriatic itch. **Pain**, v. 157, n. 11, p. 2536–2543, 2016.
- SAVIAN, A. L. et al. Dithranol-loaded lipid-core nanocapsules improve the photostability and reduce the in vitro irritation potential of this drug. **Materials Science and Engineering C**, v. 46, p. 69–76, 2015.
- SEGAL, A.; KATZ, C.; VAN DUUKEN, B. L. Structure and tumor-promoting activity of anthralin (1,8-dihydroxy-9-anthrone) and related compounds. **Journal of medicinal chemistry**, v. 14, n. 12, p. 1152–1154, 1 dez. 1971.
- SEYEDIFAR, M. et al. Cost-utility and budget impact analysis of adding-on apremilast to biologic therapy in the treatment of moderate to severe plaque psoriasis, an Iranian payer perspective. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n.4, p.381-390, 2021.

- SHIM, W.-S. et al. Cellular/Molecular TRPV1 Mediates Histamine-Induced Itching via the Activation of Phospholipase A 2 and 12-Lipoxygenase. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, p. 2331–2337, 2007.
- SHROOT, B; BROWN, C. Free radicals in skin exposed to dithranol and its derivatives. **Arzneimittelforschung Drug Research**, v. 36, n. 8, p. 1253-1255. Aug 1986.
- SILVA, C. R. et al. The involvement of TRPA1 channel activation in the inflammatory response evoked by topical application of cinnamaldehyde to mice. **Life Sciences**, v. 88, n. 25–26, p. 1077–1087, 2011.
- SIMONE, D. A.; OCHOA, J. Early and late effects of prolonged topical capsaicin on cutaneous sensibility and neurogenic vasodilatation in humans. **Pain**, v. 47, n. 3, p. 285–294, 1991.
- SIMPSON, D. M. et al. Long-Term Safety of NGX-4010, a High-Concentration Capsaicin Patch, in Patients with Peripheral Neuropathic Pain. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 39, n. 6, p. 1053–1064, 1 jun. 2010.
- SORKIN, L. S. et al. Origins of antidromic activity in sensory afferent fibers and neurogenic inflammation. **Seminars in Immunopathology**, v. 40, p. 237–247, 2018.
- SPRINGATE, D. A. et al. Incidence, prevalence and mortality of patients with psoriasis: a U.K. population-based cohort study. **British Journal of Dermatology**, v. 176, n. 3, p. 650–658, 2017.
- SROUR, J. et al. Efficacy of a skin care cream with TRPV1 inhibitor 4-t-butylcyclohexanol in the topical therapy of perioral dermatitis. **Journal of Cosmetic Dermatology**, n. March, p. 1–6, 2019.
- STÄNDER, S. et al. Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures. **Experimental Dermatology**, v. 13, n. 3, p. 129–139, 1 mar. 2004.
- STANFORD, K. R. et al. Antimycin A-induced mitochondrial dysfunction activates vagal sensory neurons via ROS-dependent activation of TRPA1 and ROS-independent activation of TRPV1. **Brain Research**, v. 1715, n. March, p. 94–105, 2019.
- STEGER, J.W.; HOLLANDER, A. Anthralin. **Archives of Dermatology**, v.119, p. 626, 1982
- SULZBERGER, M. et al. Effective treatment for sensitive skin: 4-t-butylcyclohexanol and licochalcone A. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 30, p. 9–17, 2016.
- SWINKELS, O. Q. J. et al. The influence of a topical corticosteroid on short-contact high-dose dithranol therapy, **British Journal of Dermatology**. v.145, p. 63-69, 2001.

SWINKELS, O. Q. J. et al. An immunohistochemical assessment of the response of the psoriatic lesion to single and repeated applications of high-dose dithranol cream. **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**, v. 15, n. 6, p. 393–400, 2002.

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P. M. Neurogenic Component of Phorbol Ester-induced Mouse Skin Inflammation. **Cancer Research**, v. 49, n. 21, p. 6052–6057, 1989.

TEODORO, F. C. et al. Peripheral substance P and neurokinin-1 receptors have a role in inflammatory and neuropathic orofacial pain models. **Neuropeptides**, v. 47, n. 3, p. 199–206, 1 jun. 2013.

Topicals for Psoriasis and Psoriatic Arthritis: National Psoriasis Foundation. Disponível em: <<https://www.psoriasis.org/topical-treatments/>>. Acesso em: 29 set. 2021.

TÓTH, B. I. et al. Transient receptor potential vanilloid-1 signaling inhibits differentiation and activation of human dendritic cells. **FEBS Letters**, v. 583, n. 10, p. 1619–1624, 19 maio 2009.

VALDES-RODRIGUEZ R, KAUSHIK SB, YOSIPOVITCH G. Transient receptor potential channels and dermatological disorders. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 13, n.3, p. 335-343, 2013.

VAN DE KERKHOF, P. C. M. et al. A comparison of twice-daily calcipotriol ointment with once-daily short-contact dithranol cream therapy: a randomized controlled trial of supervised treatment of psoriasis vulgaris in a day-care setting. **British Journal of Dermatology**, v. 155, p. 800–807, 2006.

VAN DER FITS, L. et al. Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice Is Mediated via the IL-23/IL-17 Axis. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 9, p. 5836–5845, 2009.

VILUKSELA, M. Characteristics and modulation of dithranol (anthralin)-induced skin irritation in the mouse ear model. **Archives of Dermatological Research**, v. 283, n. 4, p. 262–268, 1991.

VILUKSELA, M.; KOSMA, V. -M. Dithranol (Anthralin)-induced Skin Irritation in C57BL/6, NMRI and SENCAR Mice. **Pharmacology & Toxicology**, v. 69, n. 2, p. 96–104, 1991.

WALLENGREN, J.; HÅKANSON, R. Effects of capsaicin, bradykinin and prostaglandin E2 in the human skin. **British Journal of Dermatology**, v. 126, n. 2, p. 111–117, 1 fev. 1992.

WEINKAUF, B. et al. Local Gene Expression Changes after UV-Irradiation of Human Skin. **PLOS ONE**, v. 7, n. 6, p. e39411, 22 jun. 2012.

WHITEFIELD M; LEEDER GMA;MOSEDALE. Inhibition of dithranol inflammation by free-radical scavengers. **The Lancet**, v. 1, n. 8421, p. 173, 1985.

WU, J. J. et al. Identification of key research needs for topical therapy treatment of psoriasis – a consensus paper by the International Psoriasis Council. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 30, n. 7, p. 1115–1119, 2016.

WUIS, E. W. et al. Stability of dithranol in creams. **Pharmacy World & Science**, 1999, v.21, n.6, p.275-7, 1999.

YANG, R. et al. Mustard seed (*Sinapis Alba Linn*) attenuates imiquimod-induced psoriasiform inflammation of BALB/c mice. **Journal of Dermatology**, v. 40, n. 7, p. 543–552, 2013.

YIN, S. et al. Retinoids activate the irritant receptor TRPV1 and produce sensory hypersensitivity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 9, p. 3941–3951, 2013.

ZHANG, X.; HE, Y. The Role of Nociceptive Neurons in the Pathogenesis of Psoriasis. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020.

ZHOU, Y. et al. TRPV1 mediates inflammation and hyperplasia in imiquimod (IMQ)-induced psoriasiform dermatitis (PsD) in mice. **Journal of Dermatological Science**, v. 92, n. 3, p. 264–271, 2018.

ZHU, T. H. et al. The Role of the Nervous System in the Pathophysiology of Psoriasis: A Review of Cases of Psoriasis Remission or Improvement Following Denervation Injury. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 17, n. 3, p. 257–263, 2016.

APÊNDICE A – Papel dos TRPs na irritação causada pelo ditranol

Para verificar a participação do receptor TRPV1 na irritação induzida pelo ditranol, foi utilizado antagonista seletivo para esse receptor, 4-tert-butylcyclohexanol 0,4%. A dose deste antagonista foi escolhida em dados prévios da literatura (KUEPER et al., 2010). Os animais foram pré-tratados topicamente com veículo (acetona 20 µL/orelha) ou antagonista de TRPV1, 4-tert-butylcyclohexanol (20 µL/orelha - 0,4%) 15 min antes da aplicação de creme contendo ditranol 0,5%, como descrito anteriormente. A espessura da orelha foi medida 24 horas após o tratamento com ditranol e veículo ou antagonista foi reaplicado em seguida. Uma nova medida foi realizada 1 hora após cada reaplicação de veículo ou antagonista, sendo repetida durante 3 dias. O antagonista de TRPV1 - 4-tert-butylcyclohexanol, não foi capaz de inibir a formação de edema ou eritema em orelhas de camundongos tratados com ditranol 0,5%, mesmo após reaplicações diárias desse antagonista (Fig. 1 A-B). O edema e eritema se iniciou 24 horas após o tratamento com ditranol, persistindo após tratamento com antagonista e apresentou pico em 3 dias

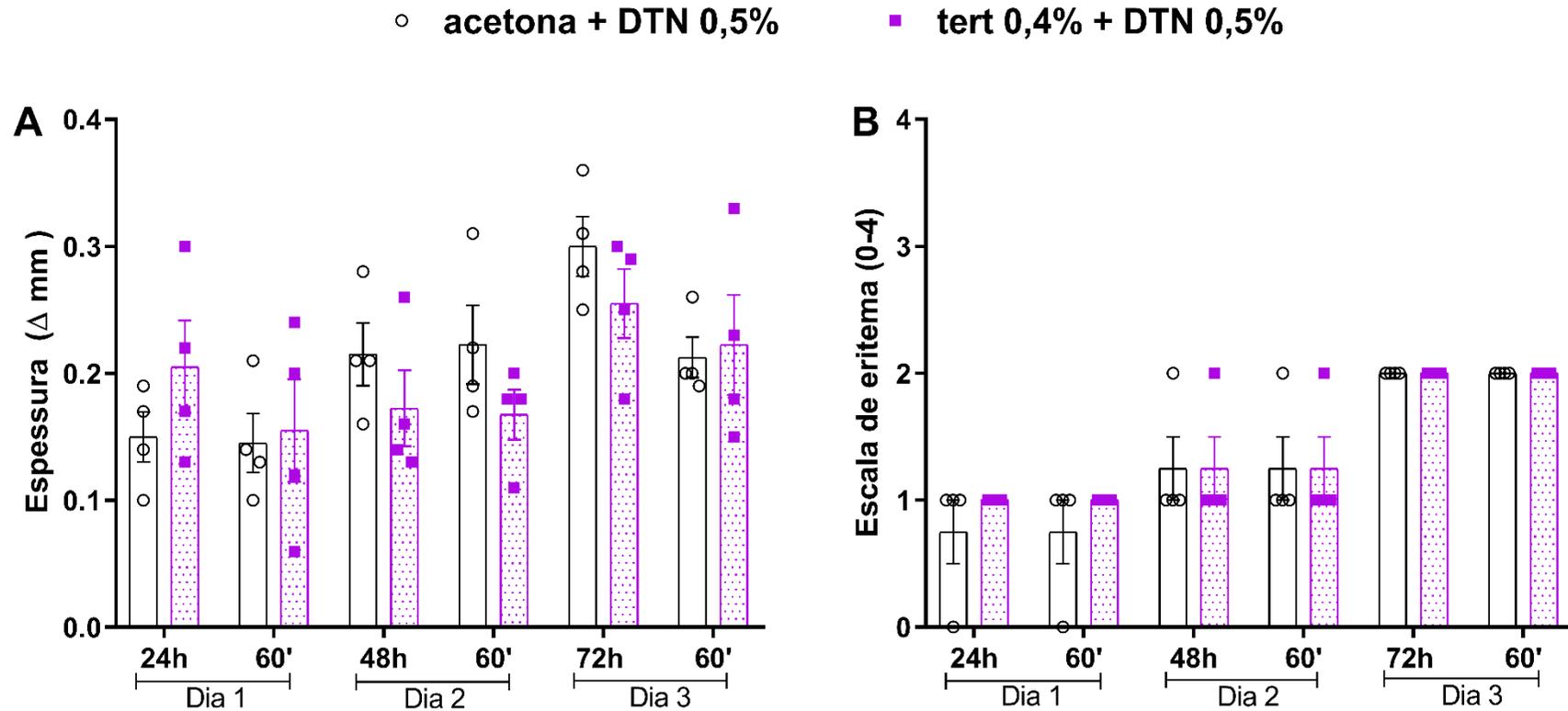


Figura 1. Efeito do antagonista de TRPV1 na pele tratada com dinitroclorobenzol 0,5%. Camundongos machos foram pré-tratados com veículo (acetona) ou antagonista de TRPV1, 4-tert-butylcyclohexanol 0,4% (n=4). Medidas de edema (A) e eritema (B) foram realizadas 24 horas até 3 dias após o tratamento. Veículo ou antagonista foram reaplicados diariamente e uma nova medida foi realizada 1 hora após. ANOVA de 2 vias (tempo e tratamento) com medidas repetidas (fator tempo), seguido por teste post hoc de Sidak. Não houve diferença entre os grupos pré-tratados com veículo ou antagonista.

APÊNDICE B – Tratamento de animais nocaute para receptores do tipo Toll (TLR-/-)

Com a finalidade de avaliar a função desses receptores no tratamento com ditranol, grupos de animais nocaute para receptores TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-} foram tratados com creme veículo (Lanette) ou creme contendo ditranol 0,5% como descrito anteriormente. Animais C57BL/6 foram usados como controle. Os mesmos parâmetros de edema, eritema e prurido foram avaliados 2 horas até 6 dias após o tratamento. O tratamento tópico com ditranol a 0,5% causou edema e eritema (Fig. 2 A-B), mas independente de animais WT, TLR2 ou TLR4, começando 24 horas e durando até 6 dias após uma única aplicação. Houve uma diferença no perfil de resposta de TLR4 e TLR2 4 e 6 dias após o tratamento, mostrando uma tendência de o edema ser maior em camundongos nocaute para TLR2 quando comparado a TLR4. Não houve diferença para eritema entre os grupos.

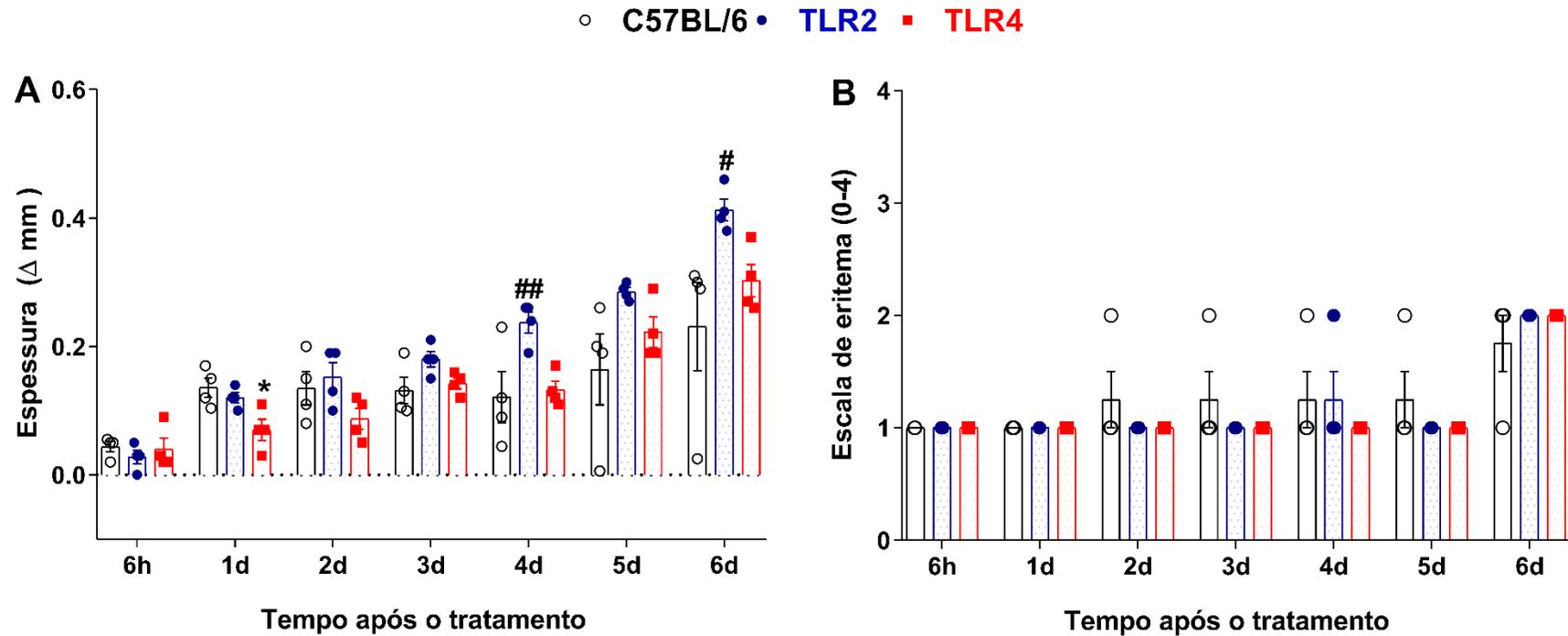


Figura 2. Efeito do tratamento com dinitrofenol 0,5% em animais nocaute. Camundongos machos c57bl/6 ou nocautes para os genes TLR2 ou TLR4 foram tratados com creme contendo dinitrofenol 0,5% (n=4). Medidas de edema (A) e eritema (B) foram realizadas 6 horas até 6 dias após o tratamento. ANOVA de 2 vias com medidas repetidas seguido por teste post hoc de Tukey. Os asteriscos denotam o nível de significância quando comparado ao grupo controle e as cerquilhas demonstram o nível de significância quando comparado os grupos TLR2 vs TLR4. *p=0,04, # p<0,05, ##p<0,01. As colunas e as linhas verticais representam a média \pm S.E.M.

APÊNDICE C – Comportamentos nocifensivo e pruriginosos espontâneos

Para avaliar se os animais apresentavam comportamentos espontâneos após tratamento, os camundongos foram aclimatados à sala comportamental por pelo menos uma hora antes das observações. As observações subsequentes foram realizadas em uma câmara de comportamento transparente (20 × 20 × 14 cm; Ugo Basile, Gemonio, Itália) forrada com espelhos. Os comportamentos foram observados logo após o tratamento para capsaicina ou 24 horas após o tratamento com ditranol, seguindo a metodologia descrita por Kodji e colaboradores (2019) com alterações. Uma observação de 30 minutos de comportamentos nocifensivos / pruriginosos foi realizada, observando: 1) coçar a orelha com a pata traseira, 2) esfregar/limpar o local: 1 evento foi definido pelo toque com as patas dianteiras na área tratada, 3) estremecimento do animal/sacudir o local. Coçar a região tratada com a pata traseira pode indicar sensações pruriginosas, enquanto os eventos como esfregar, sacudir, estremecer, podem ser indicativos de desconforto cutâneo e comportamentos nocifensivos. Essas respostas do animal têm como objetivo aliviar ou eliminar os efeitos do estímulo e/ou irritação local (LAMOTTE; SHIMADA; SIKAND, 2011).

O tratamento com ditranol mediou comportamentos espontâneos em camundongos, como coçar com pata traseira, limpar a área tratada e sacudir a orelha (Fig. 3), indicativo de comportamentos nocifensivo, porém, as respostas de coçar e limpar o local se apresentaram variáveis ao longo da avaliação em animais que receberam ditranol, visto que alguns animais apresentaram pouco ou nenhum comportamento.

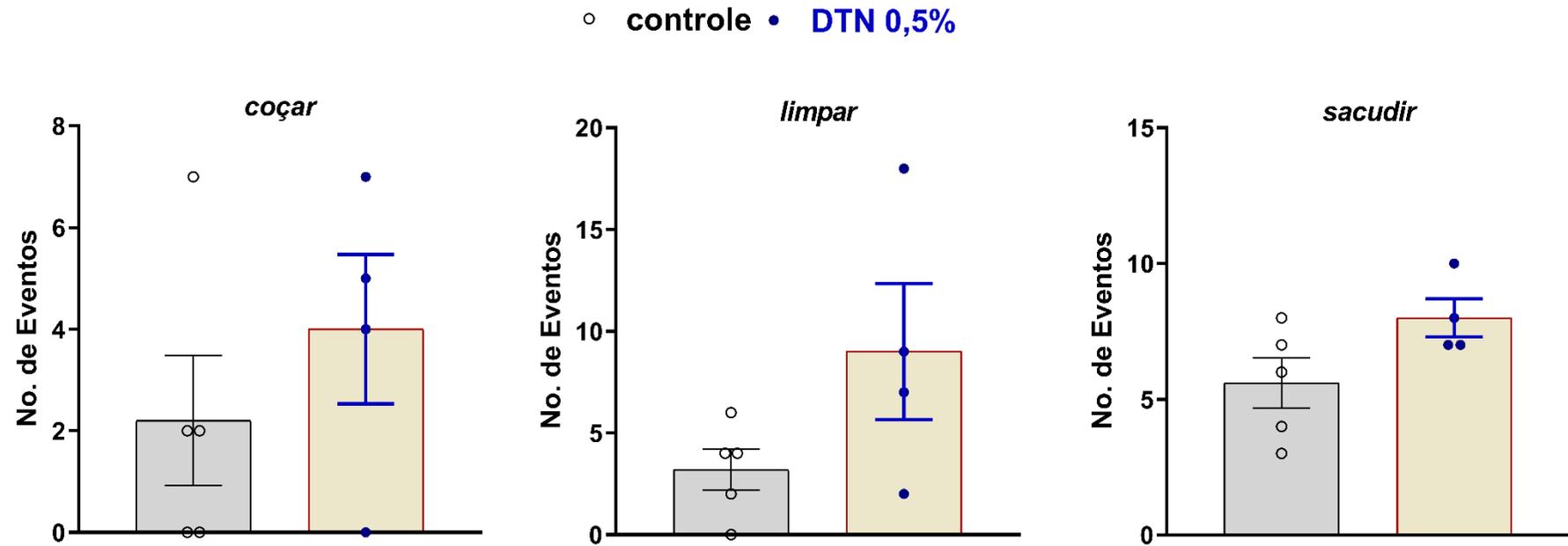


Figura 3. Avaliação de comportamentos nocifensivo/pruriginosos após tratamento com ditranol 0,5%. Camundongos machos foram tratados com creme veículo (Lanette) ou contendo ditranol 0,5% e foram avaliados nas respostas de comportamentos espontâneos de coçar, limpar ou sacudir a orelha tratada 24 horas após o tratamento. O número total de eventos foi determinado para cada animal (n=4-5). Os dados foram analisados por teste t de Student. Não houve diferença no número de eventos entre os grupos

