

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VITOR HÉLIO DE SOUZA OLIVEIRA

EFEITO ANTIPROLIFERATIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO DO CREME DE
BACLOFENO NA INFLAMAÇÃO DE PELE EM CAMUNDONGOS

CURITIBA

2020

VITOR HÉLIO DE SOUZA OLIVEIRA

EFEITO ANTIPROLIFERATIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO DO CREME DE
BACLOFENO NA INFLAMAÇÃO DE PELE EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dra Eunice André

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Oliveira, Vitor Hélio de Souza

Efeito antiproliferativo e anti-inflamatório do creme de baclofeno na inflamação de pele em camundongos. / Vitor Hélio de Souza Oliveira. – Curitiba, 2020.

72 p.: il.

Orientadora: Eunice André

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Pele – Doenças 2. Anti-inflamatórios 3. Baclofeno 4. Queratinócitos
5. Psoríase I. Título II. André, Eunice, 1972- III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (22. ed.) 573.539



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA -
40001016038P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **VITOR HELIO DE SOUZA OLIVEIRA** intitulada: **EFEITO ANTIPROLIFERATIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO DO CREME DE BACLOFENO NA INFLAMAÇÃO DE PELE EM CAMUNDONGOS**, sob orientação da Profa. Dra. EUNICE ANDRÉ, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Fevereiro de 2020.

EUNICE ANDRÉ

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

CINTIA DELAI DA SILVA HORINOUCI

Avaliador Externo (INSTITUTO CARLOS CHAGAS)

ALEXANDRA ACCO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico essa dissertação aos meus pais, Vânia e Jorge, por serem meus amigos, os pais maravilhosos que me oferecem condições e oportunidades para eu seguir em frente e que mesmo na distância conseguem ser minhas armas e minha luz que me guia todos os dias com muito carinho. Obrigado pai e mãe, por sempre acreditarem em mim, por serem minha inspiração e minha motivação de ser alguém melhor.

Dedico essa dissertação ao meu querido sobrinho, Gustavo, que ao tentar ser um exemplo pra ele a cada dia, consegui observar mais minhas qualidades e confiar mais no meu potencial, te amo meu sobrinho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente A **Deus**, por ele sempre me guiar a todos os momentos. Por me dar garra para permanecer em pé a cada batalha que eu enfrento para chegar nas minhas metas e por me fazer enxergar o lado bom da vida e desfrutar coisas boas com pessoas maravilhosas.

À minha família...Mãe, Pai, Gustavinho, Vó Joana, Tia Vicentina e meu falecido irmão Fábio, pois vocês são minha estrutura, e sentido real da palavra "família"! Aos meus primos Bruna e Murilo que hoje posso considerar como irmão, só a gente sabe o que a gente passou e viveu, as dores que passamos, ao invés de nos enfraquecermos, nos tornaram ainda mais fortes. Também devo agradecer a Edna, Lucimar, Padrinho Gilmar e Gustavo.

Aos meus amigos de Uberlândia, Gustavo Camargo, Mariana Thees, Kassio, Noemi, Gabriel, Ernane, Nilson Neto que me fizeram realmente saber o significado da palavra amigo!

À minha orientadora Eunice, por ter me aceitado em seu laboratório sem me conhecer, pela paciência que tens comigo e com meus devaneios, e pelas "injeções" de ânimo que me dava quando os experimentos não davam certo.

A todos os integrantes do meu laboratório: Jani, Mayara, Larissa, Nicolly, obrigado por tudo que vocês me proporcionaram dentro do laboratório, tudo que sei também é graças a cada um de vocês.

Aos boys and girls do LAFPEL (Jú, Bruna, Maggie, Fer, Fernando, Priscila, Kauê, Ana), mesmo não sendo do lab, aos poucos fui me tornando um pouco laboratório também, me ajudaram muito na minha caminhada, vocês são nota 1000!

As meninas da limpeza, principalmente a Iraci, que conseguiu transformar meus dias tristes nos dias mais alegres.

À professora Ale, que é um amor de pessoa e um exemplo de figura acadêmica a ser seguida, só admiração que fica a essa pessoa.

Às secretárias Gabi, Ely e Ivonete, e a técnica Gisele que são muito prestativas e afetuosas

A Universidade Federal do Paraná, aos servidores do Biotério e aos camundongos. As agências de fomento e aos que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho.

Ninguém nasce odiando outra pessoa pela cor de sua pele, por sua origem ou por sua religião. Para odiar, as pessoas precisam aprender, e se podem aprender a odiar, elas podem ser ensinadas a amar.

Nelson Mandela

RESUMO

O número de indivíduos que desenvolvem doenças inflamatórias de pele tem aumentado. Dentre essas patologias, destacam-se a dermatite atópica, dermatite de contato e a psoríase. Estudos anteriores têm demonstrado a participação do receptor GABA_B em problemas relacionados à pele e processos dolorosos, contudo a maioria dos estudos enfatiza efeitos do receptor GABA_B no sistema nervoso central (SNC). Baseado nessas considerações, o objetivo do presente estudo foi avaliar a possível atividade anti-inflamatória do creme de baclofeno em modelos animais de inflamação de pele. Assim, o efeito tópico do baclofeno foi avaliado usando modelos agudos e crônicos de inflamação, induzido por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), nas orelhas dos camundongos. No modelo de inflamação aguda, creme de baclofeno (2,5%, 5% e 7,5%) ou dexametasona tópica (1%) foram administrados topicamente imediatamente após aplicação de TPA (2,5 µg/orelha), e 6h após a administração do agente flogístico a espessura da orelha foi mensurada. A resposta inflamatória crônica foi induzida pela múltipla aplicação de TPA por nove dias alternados. Nesse modelo, o tratamento com baclofeno (duas vezes por dia) começou a partir do quinto dia do modelo experimental, e o edema foi avaliado diariamente. Ao final do protocolo experimental, as amostras das orelhas dos animais submetidos ao modelo de edema de orelha foram submetidas a análises histológicas e imuno-histoquímicas. Semelhantemente, foi avaliado o efeito do baclofeno sobre a proliferação de queratinócitos da linhagem PAM 212. Os resultados obtidos mostram que uma única aplicação do creme baclofeno 5% e 7,5% ou dexametasona 1% inibiu o edema agudo de orelha induzido pelo TPA (54,64% ± 6,08%, 47,73% ± 11,26%, 87,33% ± 4,59%, respectivamente), sendo que esses resultados foram confirmados pelas análises histológicas, na qual o creme baclofeno foi capaz de reduzir o edema de orelha (39,14 ± 5%). No tratamento do creme baclofeno na orelha contralateral, foi observado que o fármaco não inibiu o edema induzido pelo TPA, ao contrário do grupo dexta 1%. No modelo crônico, baclofeno 5% ou dexametasona 1% inibiram o edema de orelha (54,60% ± 6,15%, 71,68% ± 3,26%, respectivamente) e as análises histológicas confirmaram que o creme baclofeno 5% foi eficaz em reduzir o edema de orelha (50,82 ± 7,33%), espessura da epiderme (47,5 ± 5,52%), o infiltrado celular (61,80 ± 6,68%), e reduziu a expressão do antígeno celular de proliferação celular (PCNA) (62,01% ± 6,65%). Entretanto, baclofeno não foi capaz de inibir tanto a proliferação dos queratinócitos quanto alterar a viabilidade celular *in vitro*. Os resultados obtidos demonstraram que baclofeno possui uma relevante ação anti-proliferativa e anti-inflamatória, portanto, esse fármaco poderia ser uma alternativa para o tratamento de doenças inflamatórias de pele e hiperproliferativas.

Palavras-chave: Baclofeno tópico; doenças de pele; proliferação de queratinócitos; Psoríase.

ABSTRACT

The number of individuals that develop inflammatory skin diseases has increased; among these pathologies, we highlight atopic dermatitis, contact dermatitis and psoriasis. Previous studies have demonstrated the participation of GABA_B receptor in skin problems and painful processes, although the majority of studies are focused on the main effects of receptor GABA_B in the Central Nervous System. Based on these considerations, the aim of this study was to evaluate if topical baclofen could reduce skin inflammation. The effect of topical baclofen was evaluated using acute and chronic models of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin inflammation in mice ears. In the acute skin inflammation model, baclofen (2.5%, 5% and 7.5%/ear) or dexamethasone (positive control 1%/ear) were applied immediately after TPA (2.5 µg/ear) and 6 h later the ear thickness was measured. The chronic inflammatory response was induced by multiple topical applications of TPA (2.5 µg/ear) for nine alternate days. In this model, the treatment with baclofen (twice a day) started at 5th day of TPA application and the edema was evaluated daily. Baclofen and dexamethasone were incorporated in non-ionic cream, and a group treated with non-ionic cream alone (vehicle) was used as control. Histological and immunohistochemical evaluation were performed in mice subjected to the ear edema assay. The effect of baclofen was also assessed on keratinocyte proliferation in murine keratinocytes cell line (PAM 212). A single topical application of baclofen 5% and 7.5%, or dexamethasone 1% inhibited the acute TPA-induced ear edema (54.64% ± 6.08%, 47.73%±11.26%, 87.33% ± 4.59%, respectively) and these results were confirmed by histological analysis, mice topically treated with baclofen (5%) presented a reduction in the ear edema (39.14 ± 5%) and epidermis thickness (91.49 ± 6.63%), when compared with the vehicle group. In the contralateral experiment, when TPA was instilled in right ear and baclofen (5%) or dexamethasone (1%) applied on the contralateral, only dexamethasone was able to reduce the ear thickness. In the chronic model, baclofen 5% or dexamethasone 1% inhibited ear thickness (54.60%±6.15%, 71.68%±3.26%, respectively), epidermis thickness (47.20%± 5.52%, 33.43% ± 8.16%, respectively), cellular infiltrate (61.80 ± 6.68%) and reduced the proliferating cell nuclear antigen expression (62.01%±6.65%, 70.42±6.11%, respectively). However, baclofen did not inhibit the keratinocyte proliferation in culture nor produced alteration in cell viability *in vitro*. These results demonstrated that baclofen exhibits relevant topical anti-proliferative and anti-inflammatory properties and it could constitute a potential alternative for the treatment of inflammatory and proliferative skin diseases.

Keywords: topical baclofen, skin diseases, keratinocyte proliferation, psoriasis,

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Desenho esquemático das camadas da pele	16
FIGURA 2 – Esquema representativo dos processos inflamatórios de pele	19
FIGURA 3 – Estrutura do receptor GABA _B	28
FIGURA 4 –Estrutura química do fármaco Baclofeno	35
FIGURA 5 – Representação esquemática do modelo de inflamação aguda de pele induzido pelo TPA	37
FIGURA 6 – Representação esquemática do modelo de inflamação crônica de pele induzido pelo TPA	38
FIGURA 7 – Efeito anti-inflamatório do creme baclofeno no modelo de inflamação de pele aguda induzido pelo TPA.....	42
FIGURA 8 – Imagens histológicas do efeito anti-inflamatório através da aplicação do creme baclofeno no modelo de inflamação aguda de pele.....	43
FIGURA 9 – Avaliação quantitativa das lâminas histológicas do efeito anti-inflamatório através da aplicação do creme baclofeno no modelo de inflamação aguda induzida pelo TPA	44
FIGURA 10 – Efeito contralateral da aplicação do baclofeno tópico sobre a indução da inflamação de pele produzida pelo TPA	45
FIGURA 11 – Efeito do baclofeno tópico na inflamação crônica de pele induzida pela aplicação do TPA	47
FIGURA 12 – Imagens representativas em histologia do efeito anti-inflamatório do creme baclofeno no modelo de inflamação crônica induzida pelo TPA.....	48
FIGURA 13 – Avaliação quantitativa das lâminas histológicas d efeito anti-inflamatório através da aplicação do creme baclofeno no modelo de inflamação crônica induzida pelo TPA.....	49
FIGURA 14 – Imagens da imuno-histoquímica mostrando a atividade antiproliferativa do creme baclofeno nos queratinócitos epidermais.....	51
FIGURA 15 – Análise quantitativa da atividade antiproliferativa do creme baclofeno nos queratinócitos epidermais.....	52
FIGURA 16 – Influência do baclofeno na viabilidade e profileração celular na cultura de queratinócitos	53

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

TPA	- 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
IL-1(α e β)	- Interleucina 1(α e β)
IL-4	- Interleucina 4
IL-6	- Interleucina 6
IL-8	- Interleucina 8
IL-10	- Interleucina 10
IL-11	- Interleucina 11
IL-12	- Interleucina 12
IL-13	- Interleucina 13
IL-17	- Interleucina 17
IL-18	- Interleucina 18
IL-20	- Interleucina 20
IL-22	- Interleucina 22
IL-23	- Interleucina 23
DEXA	- Dexametasona
PEG 400	- Polietilenoglicol 400
HTAB	- Brometo de hexadeciltrimetilamônio
TMB	- Tetrametilbenzidina
PBS	- Tampão fosfato
H&E	- Hematoxilina e Eosina
DAB	- Diaminobenzidina
ALFAC	- Solução de Álcool, Formalina e Ácido Acético
BSA	- Albumina sérica bovina
ANOVA	- Análise de variância
PCNA	- Antígeno Nuclear de Células em Proliferação
COX	- Cicloxigenase
LOX	- Lipoxigenase
PLA2	- Fosfolipase A2
PKC	- Proteína Quinase C
TNF- α	- Fator de necrose tumoral alfa
IL-1 β	- Interleucina-1-beta
LT	- Linfócito T

LTB4	- Leucotrieno B4
K1	- Queratina 1
K5	- Queratina 5
K10	- Queratina 10
K15	- Queratina 14
KGF	- Fator de crescimento de queratinócitos
IFN- γ	- Interferon-gama
LFA-1	- Antígeno 1 associado a função linfocitária
ICAM-1	- Molécula de adesão intercelular 1
MHC	- Complexo principal de histocompatibilidade
TGF- β	- Fator de transformação de crescimento beta
PD-1	- Proteína de morte celular programada 1
CLA	- Antígeno linfocitário cutâneo
LPS	- Lipopolissacarídeo
IgE	- Imunoglobulina E
NF- κ B	- Fator nuclear κ B
GABA	- Ácido gama-aminobutírico
GIRKs	- Canais de potássio retificadores internos
NGF	- Fator de crescimento do nervo
SNC	- Sistema Nervoso Central
BCL	- Baclofeno
MAPK	- Proteína quinase ativada por mitógeno
DNFB	- 2,4-dinitrofluorobenzeno
CGRP	- Peptídeo relacionado ao gene de calcitonina
TRPV1	- Receptor Potencial Transitório Vanilóide 1

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 PELE	14
1.1.1 <i>Inflamação cutânea</i>	18
1.1.2 <i>Abordagens terapêuticas nas doenças inflamatórias de pele</i>	26
1.2 RECEPTOR GABA _B E INFLAMAÇÃO	27
2. JUSTIFICATIVA	34
3. OBJETIVOS	35
3.1 OBJETIVOS GERAIS	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 ANIMAIS	36
4.2 DROGAS E REAGENTES	36
4.3 MODELOS DE INFLAMAÇÃO DE PELE	36
4.3.1 <i>Inflamação aguda de pele induzida pelo TPA</i>	36
4.3.2 <i>Inflamação crônica de pele induzida pelo TPA</i>	38
4.4 ANÁLISES HISTOLÓGICAS.....	38
4.5 IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	39
4.6 ANÁLISE DE VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR	39
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
5. RESULTADOS	41
5.1 EFEITO DO CREME BACLOFENO NO MODELO AGUDO DE INFLAMAÇÃO DE PELE	41
5.2 EFEITO DA APLICAÇÃO TÓPICA DO BACLOFENO NO MODELO DE INFLAMAÇÃO CRÔNICA DE PELE INDUZIDA	45
5.3 EFEITO ANTIPROLIFERATIVO DO CREME BACLOFENO NA EPIDERME... 50	
5.4 EFEITO DO BACLOFENO NOS QUERATINÓCITOS NO MODELO IN VITRO	52
6. DISCUSSÃO	54
7. CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS	63

1. INTRODUÇÃO

1.1 PELE

A pele é um órgão que corresponde a 15% do seu peso corporal, possui a capacidade de revestir e delimitar um organismo, além de, manter uma plasticidade que é determinada pela sua resistência e flexibilidade, assim apresenta alterações constantes, com uma extensa capacidade renovadora e de reparação definindo um grau de impermeabilidade (BRODELL; ROSENTHAL, 2008;HWA; BAUER; COHEN, 2011).

As funções naturais da pele consistem em: estabelecer a termorregulação, interagir com o ambiente externo, manter a função sensorial da pele, proteger o nosso corpo contra agentes químicos, físicos e agentes biológicos e desempenhar o papel de prevenção na perda de substâncias endógenas e fluidos corporais, como a água (BRAFF et al., 2005;BRODELL; ROSENTHAL, 2008; VERDIER-SÉVRAIN; BONTÉ, 2007). A pele ainda é compreendida como maior órgão neuro-imuno-endócrino por participar em processos que possuem funções sensoriais, endócrinas e imunológicas (OLÁH; SZOLLOSI; BÍRÓ, 2012)

Esse órgão é contínuo com revestimento de membranas compreendendo a superfície do corpo e é composta por três diferentes camadas: a epiderme, derme e o tecido subcutâneo (hipoderme) (NGUYEN; SOULIKA, 2019).

A epiderme é a camada mais externa da pele, é um tecido epitelial queratinizado com estruturas e funções significativas de acordo com a localização anatômica. É constituído por células epiteliais chamadas de queratinócitos, que são responsáveis pela estrutura da epiderme e seus anexos como pelos, unhas e glândulas (LOWES; SUÁREZ-FARIÑAS; KRUEGER, 2014;MCGRATH; UITTO, 2010;OLÁH; SZOLLOSI; BÍRÓ, 2012). Muitos estudos apontam os queratinócitos como um dos principais responsáveis na produção e expressão de substâncias pró-inflamatórias, sugerindo assim que a pele age como um órgão do sistema imune (ALBANESI et al., 2005; WILLIAMS; KUPPER 2003).

Existe ainda na epiderme o sistema melânico, que compreende os melanócitos que são células dendríticas que sintetizam pigmentos derivados da crista neural e armazenados na pele predominantemente à camada basal. Os melanócitos são responsáveis pela produção do pigmento de melanina e sua transferência para os queratinócitos (LIN; FISHER, 2007).

Outro tipo de célula distribuído nessa camada é a célula de Langerhans, que possui função imunológica e que está envolvida nas respostas inflamatórias induzidas pelas células T. Esta célula está distribuída na camada granulosa e em pouca quantidade é encontrada também na camada basal. As células de Langerhans são conhecidas por solubilizar através da endocitose os antígenos encontrados na epiderme e apresenta-los as células T imaturas (HIERONYMUS et al., 2015; MASOTTI; FORTES; SUFFREDINI, 2014)

Fornecendo a interligação entre epiderme e o sistema nervoso as células de Merkel são conhecidas como mecanorreceptores (sensibilidade tátil). Estas células existem em maior proporção nas peles espessas como na palma das mãos e da planta dos pés e estão localizadas na parte profunda da epiderme, distribuídas e ancoradas na membrana basal (NGUYEN; SOULIKA, 2019; OLÁH; SZOLLOSI; BÍRÓ, 2012)

Vale ressaltar que a epiderme ainda subdivide-se em: camada córnea, camada granulosa, camada espinhosa e camada basal (BRODELL; ROSENTHAL, 2008; LAI-CHEONG; MCGRATH, 2013).

A camada basal é feita por células que se repousam sobre a membrana basal que divide a epiderme da derme. Esta camada possui uma abundância de células-tronco que apresenta intensa atividade mitótica que juntamente com a camada espinhosa é responsável pela renovação da epiderme. A camada basal possui filamentos intermediários de queratina provenientes das células que estão presentes, e se tornam mais numerosos quando as células avançam para a superfície, isto é, quando formam a camada córnea (LAI-CHEONG; MCGRATH, 2013).

A camada espinhosa ou também conhecida como a camada malpighiana é constituída por células escamosas que vão se achatando progressivamente em direção à superfície, estrutura padrão de diferenciação epitelial que progride à queratinização (MENON, 2002).

A próxima camada é a granulosa, constituída por células granulosas caracterizadas por um excesso de grânulos basofílicos de cerato-hialina no citoplasma indicando uma perda do núcleo dos queratinócitos. Nessa camada ocorre uma intensa atividade metabólica, resultando a cornificação que é o surgimento da camada córnea(BRODELL; ROSENTHAL, 2008).

A camada córnea é a camada mais externa da epiderme, a qual delimita o meio ambiente com o indivíduo (BUCKS, 1984). As células dessa camada costumam ser acidófilas, anucleadas e planas e o citoplasma preenchido por queratina (BRODELL; ROSENTHAL, 2008; NG, 2015).

Dentre essas camadas a proliferação acontece apenas na camada basal, os queratinócitos após a mitose passam por uma diferenciação progressiva em medida que vão atravessando as camadas da epiderme até chegar à camada córnea. Os queratinócitos em cada camada expressa diferentes tipos de biomarcadores. Queratina 5 (K5) e 14 (K14) são predominantes expressos na camada basal. Já na camada espinhosa os biomarcadores presentes são Queratina 1 (K1) e 10 (K10) (TU et al., 2004)

Outra camada que faz parte da pele é a derme, a qual apoia a epiderme e une ao tecido subcutâneo (hipoderme). É constituído de uma camada de tecido conjuntivo composta por um sistema integrado de estruturas filamentosas, fibrosas e amorfas, e nela estão inseridos vasos, anexos epidérmicos (glândulas e pelos) e nervos. Apresenta uma superfície externa irregular que é caracterizado por umas saliências chamadas de papilas dérmicas e são mais frequentes nas áreas sujeitas a pressões e atritos (MASOTTI; FORTES; SUFFREDINI, 2014; NGUYEN; SOULIKA, 2019)

Constitutivamente a derme é formada por três camadas distintas: superficial ou papilar, com grande quantidade de células e predominâncias de feixes finos fibrilares de colágeno dispostos verticalmente, camada profunda ou reticular, formada por feixes espessos de colágenos ondulados e distribuídos no sentido horizontal e ainda temos a camada perianexial, que é distribuída em volta dos vasos e anexos e é feita através de feixes finos de colágeno, como na derme papilar (MENON, 2002).

As células presentes na derme são representadas por células mesenquimais primitivas, fibroblastos, macrófagos e mastócitos, em que células mesenquimais são as únicas existentes ao começo da vida fetal, transformando/diferenciando em outras células posteriormente (MCGRATH; UITTO, 2010; NGUYEN; SOULIKA, 2019).

Os fibroblastos são células fusiformes e possuem uma forma de estrela, com núcleo volumoso e citoplasma lúcido, tem-se uma importante ação enzimática, que é síntese e degradação das proteínas do tecido conjuntivo e outras substâncias

presentes nela que servem como transmissores de informação para epiderme e estruturas adjacentes. Estas células ainda respondem a diversas substâncias do sistema imunológico como interleucinas (IL-1 α e β), que estimulam a produção dos mesmos e outros mediadores como fator de crescimento de queratinócitos, IL-1 (α e β) e interleucina 8 (IL-8) (NGUYEN; SOULIKA, 2019; WILLIAMS; KUPPER, 2003).

Os macrófagos presentes no tecido conjuntivo da derme derivam de células precursoras da medula óssea que se dividem, formando os monócitos, os quais circulam pelo sangue e ao cruzar os vasos entram no tecido conjuntivo, logo em seguida amadurecem e adquirem características estruturais e funcionais de macrófagos. São células de vida longa e constituem o sistema fagocitário mononuclear, com capacidade de fagocitar, apresentar antígenos e secretar moléculas imunomoduladoras (SINDRILARU et al., 2011).

Os mastócitos possuem ampla distribuição pelo corpo, contudo apresenta uma abundância em sua quantidade na derme e nos tratores respiratório e digestivo (KIM, M. S. et al., 2013). Esta célula é identificada pelo seu núcleo arredondado e pela grande proporção de grânulos escuros no seu citoplasma. Os grânulos dessas células podem conter heparina, triptase, histamina, quimase, fator quimiotático para neutrófilos e eosinófilo (NGUYEN; SOULIKA, 2019; WILLIAMS; KUPPER, 2003).

Ainda, estas células conseguem secretar algumas substâncias imunomodulatórias como citocinas, leucotrienos, fator ativador de plaqueta e alguns fatores de crescimento, sendo assim, acabam desempenhando um papel importante em alguns casos como na reação de hipersensibilidade do tipo I, reparação tecidual, ação antitumoral e angiogênese (WILLIAMS; KUPPER, 2003).

A camada mais profunda da pele a hipoderme, como observado na (figura 1) possui uma espessura variável, composta por tecido adiposo, que são células preenchidas por gorduras. Funcionalmente, a hipoderme participa no modelamento do corpo, e além de servir como uma reserva energética consegue promover proteção contra o frio (isolamento térmico) (GONCHOROSKI; CÔRREA, 2005).

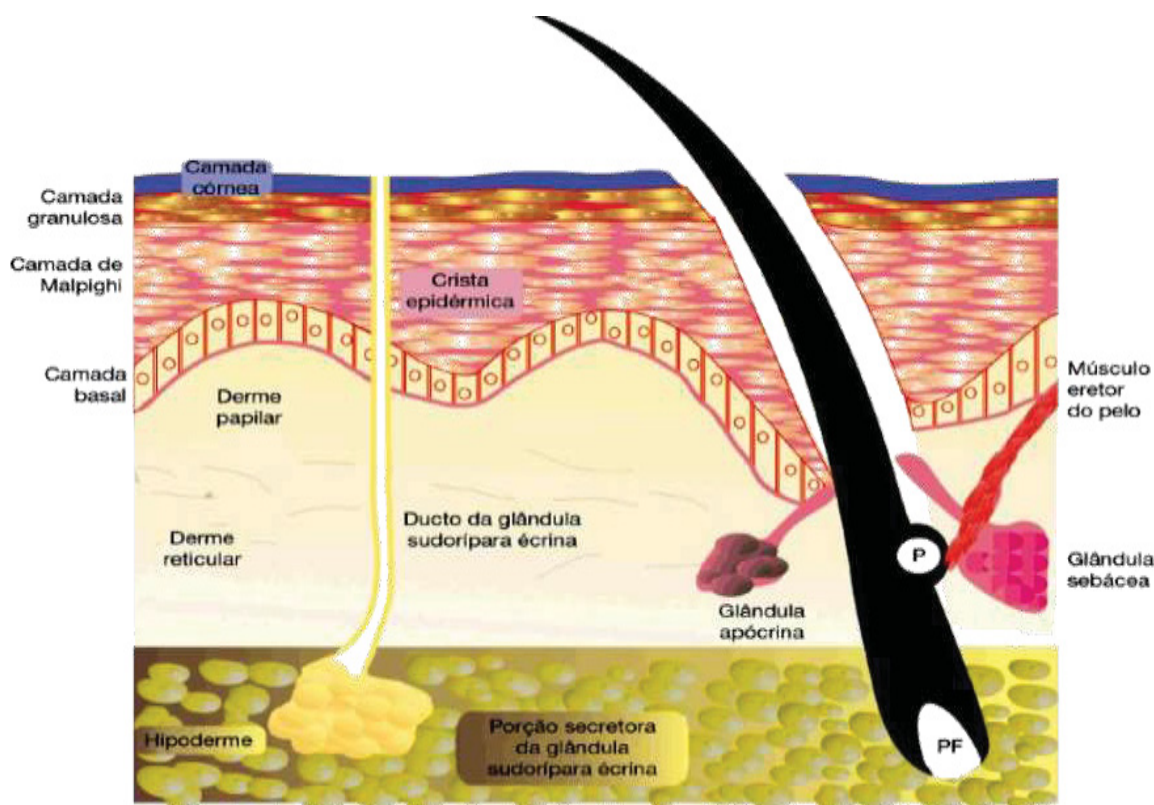


Figura 1: Desenho esquemático das camadas da pele.

Fonte: Adaptado de AZULAY, R.D.; AZULAY (2011).

1.1.1 Inflamação cutânea

A inflamação é um processo complexo que os leucócitos são recrutados para o tecido em resposta de lesão tecidual ou permeação de algum patógeno (BURMAN et al., 2005). Assim, as primeiras células a atuarem na resposta inflamatória aguda são as plaquetas, que fazem o processo de coagulação e liberam substâncias que atraem os neutrófilos, como demonstrado na figura 2, em que sua função compreende fagocitar os patógenos presentes na região e por conseguinte secretar fatores quimiotáticos e pró-inflamatórios que estimulam outras células, como fibroblastos e queratinócitos, além de atrair outros leucócitos para a área danificada (GURTNER et al., 2008).

A citocina IL-1 produzida pelos neutrófilos promove quimiotaxia de mais neutrófilos, leucócito mononuclear (monócitos) e células T, o que ocasiona em rubor, síntese de colágeno e estimulação de crescimento e atividade secretória dos fibroblastos (MACLEOD; MANSBRIDGE, 2016).

Como visto, os queratinócitos são as células predominantes na epiderme. As funções dos queratinócitos versam em: formação da barreira mecânica, perda de água e líquidos do organismo, defesa imunológica contra patógenos e outros estímulos de exógenos (DENNING, 2004). Sabe-se que a produção de mediadores imunes e inflamatórios pelos queratinócitos é baixa em condições normais, porém a expressão dessas moléculas pode aumentar quando estimulados (ALBANESI et al., 2005). Essas células podem fazer a transdução dos múltiplos estímulos através de citocinas, que são transmitidas para outros linhagens de células da pele e outras do sistema imune. Citocinas primárias podem induzir a expressão de moléculas de adesão de leucócitos e em células endoteliais, e estimular a liberação de fatores quimiotáticos (WILLIAMS; KUPPER, 2003).

Ainda essas células expressam receptores para citocinas. O mediador Interferon-gama (IFN- γ), uma citocina derivada das células T, é um importante regulador da resposta inflamatória na pele, e os queratinócitos são um alvo primário para este mediador. Quando exposto ao IFN- γ , os queratinócitos expressam altamente a proteína ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1), um mediador importante para realizar a compartimentalização para LFA-1 (Antígeno 1 associado a função linfocitária), uma integrina que auxilia na diapedese e conseqüentemente serve como um acessório relevante e um sinal para ativar os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (ALBANESI et al. 2005).

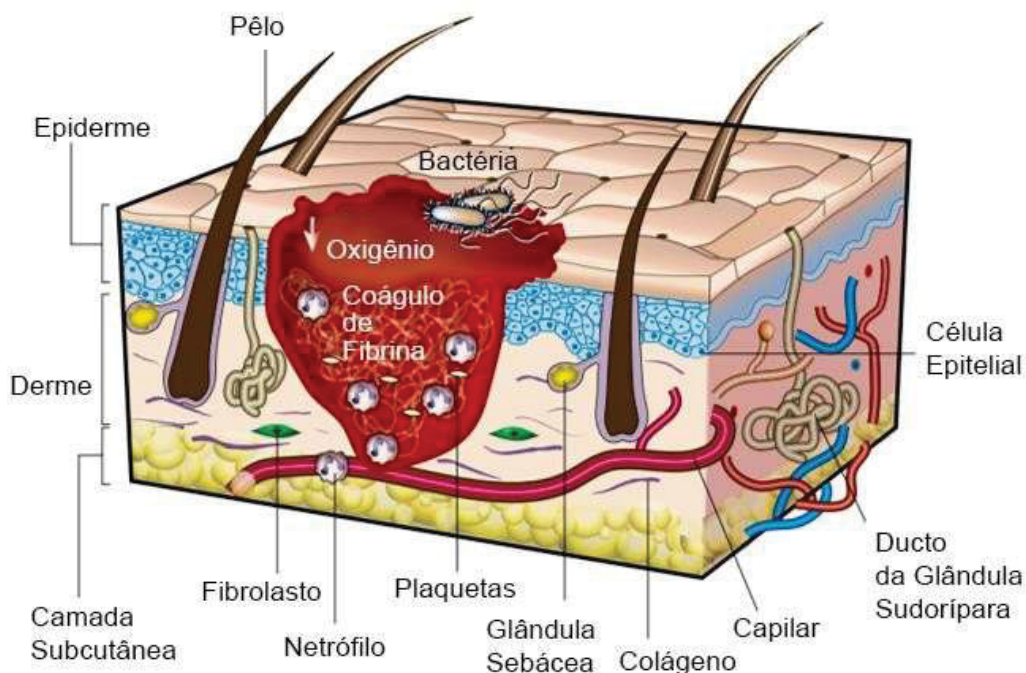


Figura 2: Esquema representativo do processo inflamatório agudo na pele.

Fonte: Adaptado de GURTNER et al. (2008).

Então, quando os queratinócitos são estimulados, liberam mais IL-1. Após a liberação, as citocinas atravessam pela membrana basal para a derme, alertando as células endoteliais para o local da resposta inflamatória e inicia a cascata inflamatória. Fibroblastos dermais amplificam a reação epidermal produzindo IL-1, IL-6 e, TNF- α em resposta da citocina liberada pelos queratinócitos. Citocinas derivadas de ambas as células se difundem na vasculatura dermal, resultando em sinal de alerta para as células endoteliais informando o que está ocorrendo na epiderme. A difusão continuada das citocinas para áreas vasculares e a junção de eventos anteriores, culminam em um gradiente quimiotático que permite o extravaso de leucócitos do meio intravascular para o espaço extravascular (DEBENEDICTIS et al., 2001).

Logo em seguida, células dendríticas epidermais são capazes de diretamente ligar-se a pequenas estruturas contendo fosfato através de seus receptores. Essas células T não precisam da apresentação de antígeno no contexto de MHC ou CD1, e eles fornecem respostas imunes imediata, reconhecendo antígenos fosfolipídios conservados e antígenos fosfoprotéicos (DEBENEDICTIS et al., 2001).

Os antígenos são apresentados ao sistema imunológico através de duas vias (subcutânea ou intravenosa). Antígenos que entram na pele são apresentados aos linfócitos principalmente nos linfonodos, enquanto aqueles que entram no sangue são apresentados no baço. Antígenos solúveis ou insolúveis são primeiramente fagocitado e processado pelas células de Langherans imaturas para área de injeção, no qual sai do tecido pelos vasos linfáticos aferentes destinados para os linfonodos. A migração é aumentada pelas citocinas inflamatórias. No linfonodo, a células de langherans pode apresentar o antígeno pelo sistema MHC de Classe I ou 2 ou pela via CD1. Uma vez que linfócitos T naives interagem com as células de Langherans migratória, elas são ativadas e começam a expressar Antígeno linfocitário cutâneo (CLA). Ao entrar na circulação, o CLA fornece o ligamento ao redor da pele. Essa diferenciação permite o reconhecimento epidérmico por linfócitos circulantes (ALBANESI et al., 2005; BANGERT; BRUNNER; STINGL, 2011)

Nas condições ocasionais, a inflamação mediada por resposta imune inata inicia em alguns minutos após o estímulo e tem sua resolução em poucas horas ou dias. Contudo, com a permanência do processo inflamatório durante semanas, meses ou anos, o processo inflamatório se torna crônico, desenvolvendo o que é denominado de doenças inflamatórias crônicas (LAWRENCE; GILROY, 2007).

Nesse sentido, estudos vem demonstrando o crescimento do número de indivíduos que desenvolvem doenças inflamatórias crônicas de pele, dentre as quais, podemos destacar a dermatite atópica, dermatite de contato e psoríase (CASTRO et al., 2006; MOTTA et al., 2011; RUIZ; AZEVEDO; SANTOS, 2012). Muitas dessas inflamações de pele apresentam uma taxa de prevalência significativa e segundo Ruiz, Azevedo e Santos (2012), a psoríase atualmente afeta cerca de 2% da população mundial. Já na dermatite atópica observa-se no Brasil uma prevalência entre 10% (Curitiba) e 14% (São Paulo) de acordo com os diagnósticos médicos (CASTRO et al., 2006). Ainda, segundo Motta et al. (2011), a dermatite de contato acomete entre 15 a 20% da sociedade durante algum estágio de vida se tornando a terceira maior causa de consulta na área da dermatologia, e representa 15-20% das doenças causadas no ambiente de trabalho nos Estados Unidos.

A dermatite atópica é uma doença inflamatória de pele crônica associada pela hiper-reatividade a substâncias do meio ambiente que usualmente são inócuos a indivíduos sem a dermatite (LEUNG et al., 2004). Esta síndrome de alguma

maneira está relacionada com pacientes que possuem histórico de alergia respiratória e rinite alérgica, sendo observados altos níveis de eosinófilos na periferia (LEUNG, 1999;LEUNG et al., 2004).

A associação da alergia com a dermatite atópica está relacionada com o efeito da ativação crônica das células T do perfil Th2, resultando no aumento da Imunoglobulina E (IgE) através da estimulação da interleucina 4 e 13 (IL-4 e IL-13)(GUTTMAN-YASSKY; KRUEGER, 2017). Citocinas como TNF- α e IL-1 de algumas células residentes como queratinócitos, mastócitos e células dendríticas, se ligam nos receptores do endotélio vascular, fazendo uma ativação da sinalização celular incluindo a via do fator nuclear (NF) κ B, e indução da expressão de moléculas de adesão através das células endoteliais vasculares (AKDIS et al., 2006). A persistência da fase crônica da dermatite atópica envolve também a produção de citocinas do perfil Th1 como IL-12 e IL-18, bem como várias citocinas associadas à remodelação como IL-11 e TGF- β 1, que são expressas preferencialmente nas fases crônicas das doenças (AKDIS et al., 2006;LEUNG et al., 2004).

As manifestações clínicas na dermatite atópica podem variar com a idade, três estágios podem ser frequentemente identificados. Na infância, a primeira lesão eczematososa costuma aparecer nas bochechas e no couro cabeludo. O prurido, frequentemente começa poucas semanas depois, causando lesões com crostas. Durante a adolescência, lesões nas regiões de flexão (articulações), região posterior e superior do pescoço (nuca), e no dorso dos membros. Na fase adulta placas liquenificadas acometem as regiões das articulações, cabeça e pescoço. Em cada estágio, o prurido é contínuo durante o dia e tende a piorar à noite levando à perda do sono, conseqüentemente afetando a qualidade de vida (AKDIS et al., 2006;BIEBER, 2008).

Existem duas hipóteses sobre o mecanismo de fisiopatologia da dermatite atópica. A primeira defende que esta doença possui um distúrbio imunológico que causa sensibilização mediada por IgE e uma disfunção da barreira epitelial considerada consequência da inflamação local (LEUNG et al., 2004). A segunda hipótese consiste em uma deficiência intrínseca nas células epiteliais que leva à disfunção da barreira (PELC; CZARNECKA-OPERACZ; ADAMSKI, 2018), o que pode levar a infecções virais, fúngicas e bacterianas recorrentes ocasionados pelas

lesões de pele (ONG et al., 2002) neste contexto os aspectos imunológicos são considerados um epifenômeno (BIEBER, 2008).

A dermatite de contato é uma doença de pele causada pela exposição a algum alérgeno e por ser considerada uma doença ocupacional. Foi estimado que esta desordem de pele produz um impacto estimado na economia em 3 bilhões de dólares a cada ano (KADYK et al., 2003).

A fisiopatologia dessa dermatite baseia-se num complexo de uma proteína com um hapteno que resulta em características de um alérgeno e gera uma sensibilização (primeira fase) que é seguida pela fase de elicitação após a reexposição com o mesmo alérgeno (PEISER, Matthias, 2013). Aproximadamente 80% dos casos de dermatite de contato tem o envolvimento das mãos, enquanto que 10% tem o acometimento da face. Se o agente causador penetrar e contaminar a roupa, pode gerar a dermatite em locais de atrito, como a parte superior das costas, axilas, coxas e pés. Exposição à poeira contida no ar pode produzir dermatite em lugares em que objetos com partículas acumuladas entrem em contato com a pele, como colar, cinto, sapatos e meias, e, pode também ser pelo contato direto com áreas expostas da face e da parte anterior do pescoço (nuca) (BELSITO, 2005)

Estudos sobre a dermatite de contato alérgica podem ser conduzidos pelo modelo experimental em camundongos denominado de hipersensibilidade de contato. Diferentemente da dermatite atópica os níveis de IgE não estão aumentados nesta dermatite (AKDIS et al., 2006). Para gerar a dermatite de contato, substâncias químicas com baixo peso molecular ou íons metálicos penetram na camada córnea da epiderme. O direto acesso a locais mais profundos da pele como a derme pode ser facilitado por força mecânica, queimadura solar, irritação ou infecção que induzem a ruptura da barreira da epiderme (PEISER, 2013).

Durante a fase de elicitação após o contato com o alérgeno, queratinócitos são expostos a citocinas liberadas pelas células T de memória a certos haptenos, em que se acumula na pele tanto na derme quanto na epiderme (ALBANESI et al., 2005).

Essas células T secretam IFN- γ , embora que algumas do perfil Th2 secretam IL-4. Ainda assim, tanto o perfil Th1 e Th2 liberam TNF- α e interleucina 17 (IL-17). Então quando liberadas pelas células T, atingem primariamente os queratinócitos, a qual aumenta a expressam de ambas as moléculas ICAM-1, MHC

de classe I. Por expressarem essas moléculas, antígenos ligados aos queratinócitos podem ser alvos para células T CD8+, o que leva o desencadeamento das lesões na epiderme na dermatite de contato e as células T CD4+ coopera nesse processo mais tardiamente (ALBANESI et al., 2005; PEISER, 2013).

Além disso, os fatores de risco para dermatite de contato podem ser subdivididos em adquiridos e inerentes. Os fatores de risco adquiridos são geralmente as doenças inflamatórias de pele como a dermatite atópica, enquanto que o fator de risco inerente são as variabilidades genéticas resultando em uma maior chance de susceptibilidade (PEISER et al., 2012).

Apesar dos fatores desencadeantes das dermatites atópicas de contato serem os mesmos (ex: agentes químicos, cosméticos, detergentes, solventes entre outros), os mecanismos pelos quais tais substâncias causam a dermatite parecem ser distintos e ainda não estão totalmente esclarecidos. Estas dermatites são caracterizadas pelo prurido intenso e lesões eczematosas, sendo estas observadas por eritema, pápulas, escamas, vesículas, exsudação e liquenificação, podendo ser isoladas ou acontecer simultaneamente (CASTRO et al., 2006; MOTTA et al., 2011).

Na psoríase o que ocorre parece ser distinto, ela é caracterizada como uma doença inflamatória de pele mediada pelas células e moléculas tanto do sistema imune inato quanto da resposta imune adaptativa e ainda compreende fatores ambientais e genéticos (KRUEGER; BOWCOCK, 2005; LOWES; BOWCOCK; KRUEGER, 2007).

Os sintomas tipicamente desenvolvem no começo da fase adulta compreendendo entre 15 a 25 anos, mas outras idades podem ser acometidas. Essa doença é distinta das outras, porém tem uma variação clínica de fenótipos, sendo uma delas a psoríase vulgaris, que acomete aproximadamente 90% de todos os pacientes (LOWES; SUÁREZ-FARIÑAS; KRUEGER, 2014; SUN; ZHANG, 2014). A quantificação da área do corpo acometida pelas lesões da psoríase pode ser mensurada pela percentagem da área, usando a palma da mão para representar 1% do corpo. Aproximadamente 1/3 (um terço) dos pacientes, possuem mais de 10% do corpo coberto pelas lesões, variando da fase moderada para psoríase severa (LOWES; SUÁREZ-FARIÑAS; KRUEGER, 2014).

Antigamente foi considerada que essa doença de pele era apenas uma desordem da proliferação e diferenciação dos queratinócitos, porém já é reconhecido que é uma doença autoimune de pele (KAUR; KUMAR, 2012). É

suspeitado que auto antígenos ainda não reconhecidos são responsáveis por desenvolver a psoríase através das células dendríticas que apresentam estes auto antígenos para os linfócitos T (GHORESCHI; WEIGERT; RÖCKEN, 2007). Nesse contexto, diversas citocinas são expressamente secretadas pelos queratinócitos na pele psoriática que induz a sua proliferação (GHORESCHI; WEIGERT; RÖCKEN, 2007).

Adicionalmente, por estarem em intensa proliferação e uma rápida diferenciação, os queratinócitos passam pela camada granulosa e chegam à camada córnea na fase incompleta, ou seja ainda nucleadas, acarretando em uma pobre aderência em outras células e resultando em lesões com placas e escamas (KRUEGER; BOWCOCK, 2005).

Na fisiopatologia da psoríase e em várias doenças de pele, ocorrem uma intensa infiltração de células T e, em que ambas as células T CD4+ e CD8+ estão envolvidas. Na psoríase, o infiltrado de linfócitos T produz a IL-17, uma citocina importante nesta patologia (NGUYEN; SOULIKA, 2019).

De fato, ativação das células T está relacionada à apresentação de antígenos pelas células dendríticas que aumenta nesta patologia, além de produzirem altos níveis da citocina interleucina 23 (IL-23), TNF- α e interleucina 20 (IL-20) o que resulta em uma proliferação de células. Dessa forma, as células dendríticas são um dos principais indutores na inflamação inata, induzindo uma gama moléculas em queratinócitos ou outros tipos de células e amplificando os estímulos (DAVIDOVICI et al., 2010).

Junto à essa doença de pele estão associadas várias outras comorbidades, incluindo a depressão, risco cardiovascular, diabetes mellitus tipo 2, síndrome metabólica, doença de Chron, e artrite psoriática (KAUR; KUMAR, 2012). Esta última é mais comum, sendo que mais de 30% dos paciente com psoríase desenvolvem artrite psoriática o que leva em uma piora da qualidade de vida, e em um diminuição da função motora (KIM, H. J.; LEBWOHL, 2019).

Na psoríase os fatores desencadeantes também são vários, dentre os quais podem ser destacados os fatores emocionais, como o estresse, as predisposições genéticas, o uso de certos medicamentos (antidepressivos e anti-hipertensivos) e alguns hábitos (ingestão de álcool e o ato de fumar). Nesta patologia, podem ser observadas lesões como as erimatoescamosas causadas por um distúrbio hiperproliferativo de queratinócitos. Porém assim como nas dermatites, o mecanismo

envolvido na psoríase também não está totalmente esclarecido (PERERA et al., 2012; VILLASEÑOR-PARK et al., 2012).

1.1.3 *Abordagens terapêuticas nas doenças inflamatórias de pele*

Atualmente os tratamentos terapêuticos disponíveis não são totalmente eficazes e apresentam uma diversidade de efeitos colaterais tais como: aumento da sensibilidade, secura, xerostomia e ganho de peso, o que resulta muitas vezes na não adesão ao tratamento por parte de muitos pacientes (LOWES; BOWCOCK; KRUEGER, 2007; SIDBURY et al., 2014).

Nesse aspecto, a fototerapia tem sido utilizada para tratar uma gama de dermatoses desde o século passado, sendo indicado para as dermatoses inflamatórias e com período crônico de evolução como a psoríase (DUARTE; BUENSE; KOBATA, 2006).

O princípio terapêutico da fototerapia está relacionada na emissão de raios UVA e UVB na derme e epiderme, acarretando alterações na produção de citocinas como IL-10, INF- γ , IL-1 e TNF- α ; modificando a liberação das moléculas de adesão produzidas pelos queratinócitos e ainda, levam à produção de fotoprodutos de DNA reduzindo assim, a síntese de DNA e, conseqüentemente a redução da proliferação celular. Porém, o uso contínuo deste tratamento pode gerar alguns efeitos colaterais como, náusea, cefaleia, eritema, taquicardia, catarata e aumentar o risco de carcinogênese e fotoenvelhecimento (DUARTE; BUENSE; KOBATA, 2006) .

Além disso, nas doenças inflamatórias de pele podemos notar um sinal clínico importante referido pelos pacientes, o prurido. Nesse sentido, com a perspectiva de melhorar a qualidade de vida desses indivíduos, o uso de anti-histamínico é recomendável nessas dermatoses, embora alguns fármacos dessa classe provoquem secura (DOMAGALA; SZEPIETOWSKI; REICH, 2017; SIDBURY et al., 2014).

Ainda, em alguns casos mais severos das dermatoses inflamatórias, são utilizados no tratamento agentes imunossupressores exercendo efeito através da inibição da expressão da produção ou ação da IL-2, inibição da expressão de genes de citocinas e inibição da síntese de purinas ou pirimidinas (SIDBURY et al., 2014; SKINNER, 2004)

Nesse sentido, algumas abordagens farmacológicas possuem como alvo o sistema imune. Então, os glicocorticóides são fármacos empregados no tratamento das doenças inflamatórias de pele, de maneira que os seus efeitos atuam tanto sobre a resposta imune quanto na ação anti-inflamatória (LAM; POLIFKA; DOHIL, 2008).

O mecanismo de ação dos glicocorticóides é modificar e conseqüentemente inibir a expressão de genes pró-inflamatórios. Quando acoplados ao receptor nuclear, alteram fatores de transcrição como proteína ativadora-1 (AP-1) e fator nuclear-kappa B (NF-κB), ambos reguladores da expressão gênica de vários componentes inflamatórios (SIDBURY et al., 2014). Entretanto, o uso prolongado dos glicocorticóides gera muitos efeitos adversos que incluem a atrofia cutânea, hipertricose, Síndrome de Cushing, desordem no processo de cicatrização, entre outros (SCHÄCKE; DÖCKE; ASADULLAH, 2002).

Sabe-se que muitas das doenças inflamatórias de pele não possui ainda etiologia e patofisiologia bem estabelecidas, o que dificulta o tratamento dessas dermatoses. Ainda, as abordagens terapêuticas disponíveis atualmente não são tao eficazes, pois além de melhorar o quadro do paciente gera muitos efeitos indesejáveis.(SEELIGER et al., 2003). Dessa forma, novas alternativas, bem como novos alvos terapêuticos para o tratamento dessas desordens cutâneas, faz-se necessário.

1.2 RECEPTOR GABA-B E INFLAMAÇÃO

O Ácido gama-aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório no sistema nervoso dos vertebrados. A transmissão gabaérgica acontece através de duas classes de receptores como os receptores Inotrópicos GABA_A e os receptores metabotrópicos GABA_B. Os receptores inotrópicos GABA_A medeiam as respostas rápidas através das aberturas dos canais e entrada de cloreto quando ativados pelo GABA. Já os receptores metabotrópicos GABA_B são membros da família 3 (ou família C) acoplados a proteínas G (GPCRs) e tem uma resposta mais lenta quando ativados pelo GABA, pois ativarão as proteínas G e assim transmitirão a informação para o segundo mensageiro (PINARD; SEDDIK; BETTLER, 2010).

O receptor GABA_B é localizado tanto nas áreas pré-sinápticas, quanto pós-sinápticas e desempenha um papel fundamental nas doenças do sistema nervoso

central como: epilepsia, espasticidade, esquizofrenia, ansiedade, depressão, déficits cognitivos e dependência de álcool e outras drogas (XU et al., 2014). Também já foi mostrado estar envolvido na sobrevivência celular, crescimento do nervo, migração e posição dos neurônios (XU et al. 2014)

Existe apenas duas estruturas heteroméricas no receptor $GABA_B$, que consiste em subunidades $GABA_{B1a}$ ou $GABA_{B1b}$ que estão conjugadas com a subunidade $GABA_{B2}$. Isso foi importante para identificar o quanto limitada é sua estrutura, porém ao mesmo tempo lida com uma diversidade de efeitos farmacológicos e cinéticos através da ativação desse receptor, quando comparados com o receptor $GABA_A$ (PINARD; SEDDIK; BETTLER, 2010). A subunidade $GABA_{B1}$ contém o sítio de ligação ao GABA, enquanto $GABA_{B2}$ é acoplada a proteína G (figura 3). No cérebro $GABA_{B1}$ é predominantemente expresso como duas isoformas, $GABA_{B1a}$ e $GABA_{B1b}$, a qual aumenta sua expressão através de splicing alternativo, originado do mesmo gene. Já foi identificado que $GABA_{B(1a,2)}$ estão localizados pré sinapticamente enquanto que os receptores $GABA_{B(1b,2)}$ estão predominantemente expressos nos sítios pós-sinápticos (PINARD; SEDDIK; BETTLER, 2010)

Adicionalmente os receptores $GABA_B$ funcionam como auto receptores ou hetero receptores limitando a liberação de GABA ou outros neurotransmissores. Os receptores pós-sinápticos induzem a lenta hiperpolarização da membrana através da abertura de proteínas ativadas pela proteína G, canais de potássio retificadores internos (GIRKs), induzindo uma lenta inibição do potencial pós-sináptico e diminuindo a despolarização da membrana provocada por neurotransmissores excitatórios; enquanto que nos pré-sinápticos o receptor $GABA_B$ além de restringir a liberação de neurotransmissores por meio da redução da ativação dos canais de cálcio, também retarda o recrutamento de vesículas sinápticas (PINARD; SEDDIK; BETTLER, 2010).

Ainda estes receptores no sistema sensorial, estão localizados nas fibras primárias aferentes e quando ativados, inibem a secreção dos neurotransmissores como o glutamato e substância P, diminuindo a atividade dos neurônios que carregam a informação sensorial para o sistema nervoso central (MORAN et al., 2001).

Portanto, fisiologicamente o receptor $GABA_B$ parece servir como um mediador tanto nas informações que chegam e são processadas pelo cérebro, quanto das informações que são transmitidas para outros tecidos através do neurônios, a fim de

evitar a exacerbação no processamento dos sinais transduzidos por meio da liberação excessiva de neurônios estimulatórios (KUNER et al., 1999;PERFILOVA; TYURENKOV, 2011).

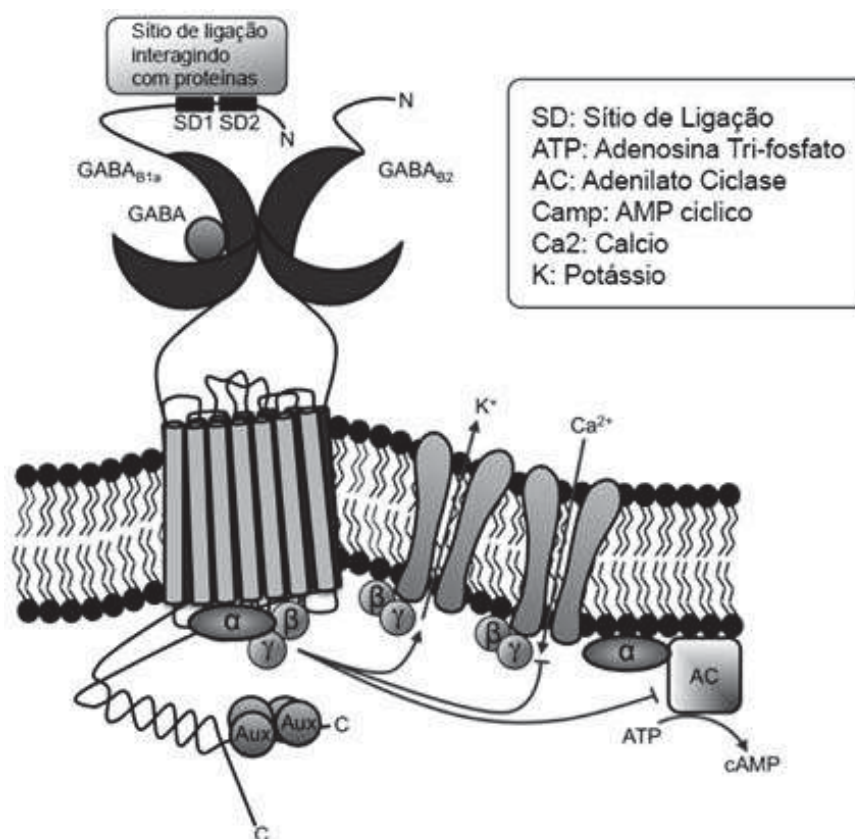


Figura 3: Desenho esquemático da estrutura do receptor GABA_B.

Fonte: Adaptado de PINARD et al. (2010)

Desse modo, agonistas do receptor GABA_B, vem sendo utilizados para tratar fisiopatologia e distúrbios na transdução dos sinais fornecidos e oriundos do sistema nervoso central. Sendo assim, os agonistas possuem um importante papel no tratamento dos distúrbios como na ansiedade, depressão, no processamento da dor e esquizofrenia (CRYAN; KAUPMANN, 2005;WASSEF; BAKER; KOCHAN, 2003). Ainda, estudos em modelos animais como o de ansiedade, depressão e de adicção utilizam tanto os agonistas e os antagonistas do receptor GABA_B, para elucidar por qual via de sinalização este receptor é atuante (COUSINS; ROBERTS; WIT, 2002;CRYAN; KAUPMANN, 2005). Embora, existem várias evidencias da participação do receptor GABA_B nos processos fisiológicos e nos distúrbios do SNC,

alguns estudos vêm mostrando o aumento da expressão do receptor GABA_B associado a processos inflamatórios (CROWLEY et al. 2016; KONERMANN et al., 2017). A expressão do receptor GABA_B nas micróglia foi observada nos núcleos faciais como uma consequência da ativação dessas células, podendo ser representado como uma resposta protetiva endógena (CROWLEY et al., 2016; SONG; PARK, 2014).

Ainda mais, o aumento da expressão de GABA_{B1} no hipocampo foi associado com a progressão na doença de Alzheimer (CROWLEY et al., 2016). Especificamente, aumento neuronal da subunidade GABA_{B1} foi observado em estágios moderados da progressão da doença. Em seguida, os autores discutiram que a subunidade GABA_{B1} poderia servir como um protetor contra a excitotoxicidade nas regiões que se encontram, visto que áreas que possuem menor expressão da subunidade do receptor foram as mais suscetíveis à doença, chegando à conclusão que o aumento da expressão do receptor GABA_B pode desempenhar um papel protetivo na neuroinflamação (CROWLEY et al., 2016).

Já se sabe que o receptor GABA_B está presente no sistema nervoso central (SNC), no entanto, pode ser encontrado também no fígado, intestino, em células do sistema imune e em queratinócitos (AUTERI; ZIZZO; SERIO, 2015; BARRAGAN et al., 2015; CROWLEY et al., 2016; WHITEHEAD et al., 2012). Embora a maioria dos estudos foque na importância do receptor GABA_B no SNC, alguns estudos demonstram que ele também apresenta funções em outros sistemas. Nesse contexto, alguns estudos tem demonstrado a participação do receptor GABA_B em processos inflamatórios de pele e na dor (SONG; PARK, 2014).

Recentemente foi observado em estudos que a ativação do receptor GABA_B, consegue modular a resposta inflamatória, resultando na diminuição da citocina TNF- α e na redução da produção das citocinas IL-6 e IL-12 secretadas pelas micróglia no trato gastrointestinal quando avaliado no modelo in vitro (AUTERI et al., 2015). Adicionalmente, já foi demonstrado que o GABA_B é expresso no corno da raiz dorsal e que a diminuição da transmissão do neurotransmissor GABA poderia estar associado no processamento da dor, assim relatados nos modelos de dor relacionados à monoartrite (CASTRO et al., 2006). Ainda, foi visto que a ativação do receptor GABA_B reduziu a secreção da IL-17, uma das responsáveis pela inflamação sinovial e erosão dos ossos, quando avaliado em modelo de artrite em camundongos (HUANG et al., 2015).

Semelhantemente, em outros estudos já foi observada a participação dos receptores GABA_B na modulação das doenças inflamatórias de pele, onde sua ativação conseguiu minimizar alguns sinais clínicos da inflamação como o edema e o sintoma do prurido nos modelos de dermatite atópica e dermatite de contato (CEVIKBAS et al., 2017; DUTHEY et al., 2010).

Atualmente, o agonista GABA_B, baclofeno, de estrutura química (4-amino-3-[4-clorofenil]-ácido-butírico) (figura 4) se tornou a droga mais utilizada em pesquisas quando o estudo é o receptor GABA_B. Isso possivelmente porque o baclofeno é utilizado na prática clínica pela via oral ou intratecal como um relaxante muscular de ação central para o tratamento de espasticidade que possui origem medular ou encefálica (ADAMS; LAWRENCE, 2007; LEISEN et al., 2003; VIENNE et al., 2010). Como sua composição possui a estrutura β-clorofenil-ácido gama aminobutírico que é análogo ao ácido gama amino-butírico (GABA) o baclofeno, consegue agir como agonista dos receptores GABA_B na medula espinal, precisamente no gânglio da raiz dorsal e substância cinzenta da coluna dorsal (HEETLA et al., 2014).

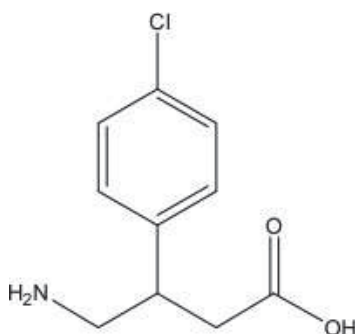


Figura 4: Estrutura química do fármaco Baclofeno.

Fonte: Adaptado de SANCHEZ-PONCE et al. (2012).

O baclofeno sofre biotransformação principalmente pelos rins, sendo que apenas uma parte (cerca de 15%) ocorre pelo fígado (RADHAKRISHNAN, 2016; WU et al., 2005; WUIS et al., 1989). Quando o baclofeno atua nos sítios pré-sinápticos, possui uma capacidade de diminuir a secreção de neurotransmissores excitatórios como o aspartato e o glutamato. Já nos receptores GABA_B pós-sinápticos quando ativados diminui o limiar de potencial de ação (hiperpolarização) dos neurônios do corno posterior da medula, conseqüentemente minimizando assim a excitabilidade dos neurônios motores (HEETLA et al., 2014).

A eficácia dessa droga é baixa quando administrado por via oral, pois a barreira hematoencefálica dificulta a sua passagem para o sistema nervoso central, chegando a concentrações muito menores no líquido em comparação com o plasma, então muitas das vezes são necessárias doses elevadas para a produção dos efeitos funcionais (SANCHEZ-PONCE et al., 2012). Sendo assim, o baclofeno se tornou um composto que pode resultar bastantes efeitos significantes fora de seu sitio de ação, gerando os efeitos colaterais, como a sedação e sonolência, entre outros efeitos neurológicos, sendo que em casos mais graves levar à hipotonia muscular, depressão respiratória e ainda nos casos mais graves a cardiomiopatia (CHEN et al., 1997; ERTZGAARD; CAMPO; CALABRESE, 2017; RADHAKRISHNAN, 2016).

Uma alternativa de administração sem ser a via oral do baclofeno é a intratecal, que foi proposta por um pesquisador chamado Richard Penn (VEIROS; MARTINS; MARTINS, 2005) aproximadamente dez anos depois da fabricação do baclofeno via oral, e consiste em uma injeção do fármaco diretamente no espaço subaracnoide com resultados muitos positivos no tratamento da dor associada à espasticidade e assim reduzindo os efeitos colaterais, assim, vem sendo diversamente implementado, com grande eficácia clínica (AL-SHAAR; ALKHANI, 2016; HEETLA et al., 2014; VEIROS; MARTINS; MARTINS, 2005).

Ainda, mesmo que rara, a toxicidade do baclofeno é documentada quando administrado pela via oral e subaracnoídea. Em grande parte dos casos está ligada com altas dosagens e abstinência. Outro fato que pode correr é a alteração funcional dos rins (CARDOSO et al., 2014; RADHAKRISHNAN, 2016; SRIVASTAVA et al., 2014; WU et al., 2005).

Embora muitos estudos foquem nos principais efeitos do receptor GABA_B no sistema nervoso central, alguns estudos vêm trazendo outras perspectivas, como a utilização do baclofeno nas doenças de pele e no processo da dor. Combinações tópicas de 0,8% baclofeno/ 3% amitriptilina/ 1,5% cetamina foi eficaz em melhorar os sintomas de cólicas, formigamentos e dores em queimação em pacientes com dor neuropática induzida pelo tratamento da quimioterapia (BARTON et al., 2011). Outro estudo demonstrou que a aplicação tópica do creme baclofeno 5% conseguiu solucionar as dores neuropáticas em um paciente com acromegalia (KEPPEL et al, 2013). Ainda também, a aplicação do fármaco baclofeno 2% juntamente com o

creme 2% de amitriptilina foi efetivo no tratamento nos pacientes que sofriam vulvodínia (NYRJESY et al., 2009).

Similar a esses achados, o agonista GABA_B baclofeno apresentou um efeito anti-inflamatório diminuindo alguns sinais da inflamação como a liberação de fatores quimiotáticos e produção de interleucinas (DUTHEY et al., 2010) e um efeito anti-pruriginoso (CEVIKBAS et al., 2017) em modelos experimentais de inflamação da pele em camundongos.

Enfim, perante os achados na literatura podemos observar uma atividade do receptor GABA_B tanto no processamento de dor quanto na resposta inflamatória. Neste sentido, vemos uma necessidade de estudos que correlacionem a atividade deste receptor no processo inflamatório de pele, o que torna relevante a busca de se conhecer as potencialidades farmacológicas do receptor GABA_B nas doenças cutâneas, assim como, a atuação do agonista GABA_B como uma possível proposta terapêutica nas enfermidades dermatológicas.

2 JUSTIFICATIVA

Embora os receptores GABA_B estejam amplamente distribuídos principalmente no SNC, eles ainda podem ser encontrados nas superfícies de várias células em diferentes tecidos, o que pode trazer uma diversidade de efeitos adversos de acordo com a sua localização.

Sugere-se, por meio de estudos anteriores, que o receptor GABA_B participam no processo da inflamação e da dor. Podem também estar presentes na membrana das células mais abundantes da pele, os queratinócitos, estando inteiramente ligadas nos processos inflamatórios deste tecido.

A hipótese aqui presente foi baseada nas evidências descritas sobre os estudos dos efeitos farmacológicos em experimentos pré-clínicos e clínicos do baclofeno na dor e na resposta inflamatória. Sendo assim, este trabalho foi desenhado para avaliar o potencial efeito anti-inflamatório da administração tópica do creme de baclofeno no modelo animal de inflamação de pele. Pois, ainda há uma escassez de estudos que correlacionem a atividade do receptor GABA_B no processo inflamatório de pele, assim como, a atuação dos agonistas GABA_B nas doenças de pele.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

- Verificar se o creme do agonista GABA_B (baclofeno) reduz o processo inflamatório de pele em modelo agudo e crônico em camundongos

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito do tratamento com o creme do baclofeno nos modelos agudo e crônico de edema de orelha induzido por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA);
- Analisar o efeito sistêmico do tratamento com o creme do baclofeno através da avaliação da formação do edema de orelha induzido por TPA com tratamento contralateral;
- Analisar se o tratamento com o creme do baclofeno é capaz de interferir no infiltrado celular induzido pela administração de TPA;
- Avaliar a possível atividade antiproliferativa do tratamento com o creme do baclofeno sobre queratinócitos *in vivo*;
- Investigar a atividade anti-proliferativa do creme de baclofeno *in vitro*, na linhagem celular PAM 212.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Os procedimentos foram realizados em camundongos Swiss machos, pesando entre 25g a 35g, randomicamente distribuídos em diferentes grupos. Os animais foram alocados em sala com a temperatura controlada a 22 ± 2 °C e mantidos em ciclo claro e escuro de 12 horas com comida e água fornecidos *ad libitum*. Os animais foram mantidos na sala de experimentação durante pelo menos 1 h antes da realização dos experimentos para adaptação. Todos os experimentos foram realizados após a aprovação dos protocolos experimentais pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Paraná sob o protocolo nº 1230.

4.2 DROGAS E REAGENTES

Os protocolos experimentais foram realizados com as seguintes drogas: 12-O-tetradecanoilforbol-acetato (TPA), (\pm)-baclofen, dexametasona, 4-nitrofenil-N-acetil- β -D-glicosamina, brometohexadeciltrimetilamônio (HTAB), brometo 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) da Sigma Chemical Co (St Louis MO, USA); acetona, formaldeído, dimetilformamida, ácido acético glacial, tampão de solução salina (PBS), parafina (Inlab, Biosciences, Alemanha), albumina de soro bovino (Inlab, Brasil); peróxido de hidrogênio, etanol absoluto, metanol, eosina, acetato de sódio, glicina, hematoxilina e xileno obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil); Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), soro fetal bovino (SFB) foram adquiridos através da Cultilab (Brasil).

O 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) foi dissolvido em acetona, enquanto baclofeno e dexametasona foram preparados pelo próprio pesquisador em creme não iônico com adição de duas gotas de polietileno glicol 400 (PEG400).

4.3 MODELO DE INFLAMAÇÃO DE PELE

4.3.1 *Inflamação de pele induzida pelo TPA*

O edema de orelha agudo foi induzido pela única aplicação do 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) 2,5 μ g/20 μ l, sendo este administrado

diretamente na orelha direita do camundongo, a resposta inflamatória foi avaliada através do aumento da espessura da orelha, como representado na figura 4 (GÁBOR, 2003). As medidas foram anotadas usando o micrometro digital (GREAT, MT-04513), antes (basal) e 6 horas após a administração do TPA e o edema foi calculado e expresso como a diferença da espessura entre as medidas antes e após a aplicação do agente flogístico TPA. Creme de baclofeno (2,5%, 5% ou 7,5%), veículo (creme não iônico+ Propilenoglicol - PEG) ou creme de dexametasona 1% (utilizado como controle positivo) foram aplicados na orelha dos camundongos, com o auxílio de uma espátula, imediatamente após a aplicação do TPA. Então, 6 horas após a exposição ao TPA, em que ocorre o ápice do edema (STANLEY et al., 1991). A espessura da orelha foi avaliada e os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e amostras das orelhas (6 mm do tecido) foram coletados para análises histológicas.

Ainda, para verificar se existem possíveis efeitos sistêmicos através da aplicação tópica do baclofeno, em um bloco de experimento foi testada uma única aplicação tópica do TPA na orelha direita e imediatamente baclofeno (5%), dexametasona (1%) ou o veículo (creme não iônico+PEG) foram aplicados na orelha contralateral e 6 horas após o edema foi avaliado como mencionado acima.

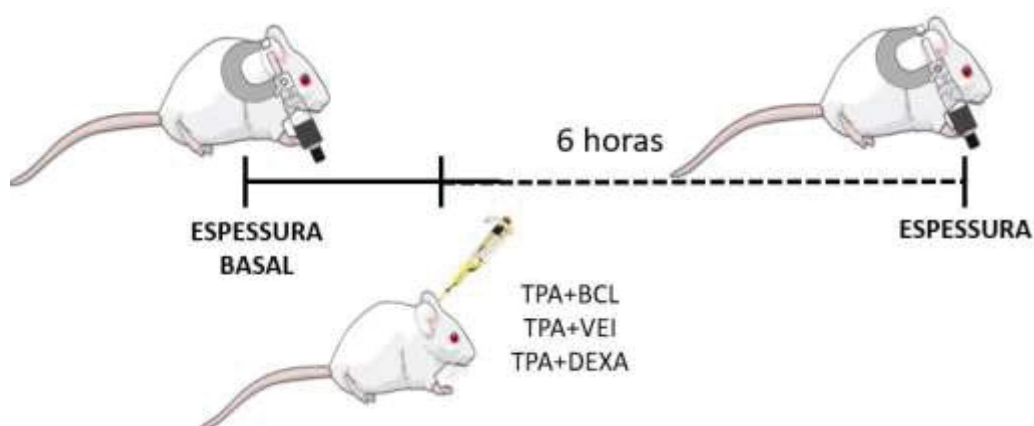


Figura 5: Representação esquemática do modelo de inflamação de pele induzido por TPA.

Fonte: O Autor

4.3.2 Inflamação crônica de pele induzida pelo TPA

O processo de inflamação crônica foi induzido por repetidas aplicações do TPA (2,5 µg/20 µl/orelha) em dias alternados por nove dias (STANLEY et al., 1991). O tratamento se deu a partir do quinto até o nono dia por duas vezes ao dia como representado no esquema na figura 5, com o creme baclofeno (5%), creme dexametasona (1%) ou veículo (creme não iônico+PEG) seguido da aplicação do TPA, e as espessuras das orelhas foram anotadas e avaliadas diariamente como descrito anteriormente. No nono dia, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e amostras das orelhas (6 mm do tecido) foram coletados para análises histológicas e imuno-histoquímicas.

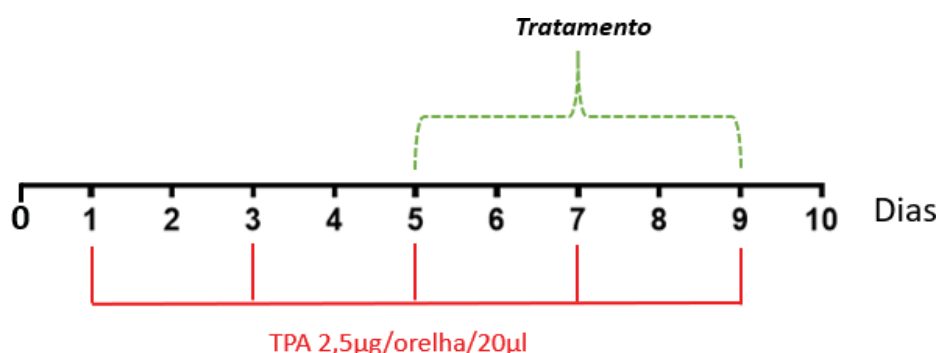


Figura 6: Representação esquemática do protocolo do modelo de inflamação crônica de pele induzida pelo TPA.

Fonte: O Autor

4.4 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Amostras de orelhas coletadas foram fixadas em solução de ALFAC (85% de etanol 80GL, 10% de formaldeído a 40% e 5% de ácido acético). Subsequente, as amostras foram passadas em uma serie de desidratação, e embebidas em parafinas e cortadas em corte de 5 µm e coradas com hematoxilina e eosina (H&E). Para avaliar o infiltrado celular e a espessura da epiderme, cortes foram fotografados em objetiva de x100 e x200 com a câmera digital acoplada ao microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tokio, Japão) e analisado com o programa ImageJ® software versão 1.41 (National Institute of Health, USA). As áreas

representativas foram selecionadas para análises e todas as avaliações foram realizados em duplo cego. A contagem dos leucócitos na derme foi realizada através da quantificação dessas células por campo com aumento de x200, sendo analisados 5 campos de 3 cortes histológicos distintos.

4.5 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Orelhas que foram coletadas dos experimentos anteriores com creme baclofeno (5%), creme dexametasona (1%) ou veículos (creme não iônico) foram embebidos em parafina, e cortado em corte de 5 µm e incubados por duas horas com o anticorpo para Antígeno nuclear de célula proliferante (PCNA) (1:100, sc-9857- Santa Cruz Biotech, Inc., USA) em câmara úmida. Depois, os cortes foram incubados com um anticorpo secundário IgG HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc., EUA) por uma hora na sala úmida. Os sítios de ligação para peroxidase foram evidenciadas por coloração usando cromógeno diaminobenzidina (Kit de substrato DAB), incubadas por 15 minutos. O excesso foi retirado em água corrente. Em todas as fases, as amostras foram lavadas cuidadosamente de duas a três vezes em tampão fosfato-salino (PBS). Por fim, as lâminas com os cortes foram desidratadas, clareadas com xilol e montadas com Bálsamo do Canadá (Entellan®). Foi utilizada lente ocular graduada para avaliar a marcação dos cortes e a marcação foi analisada por representativas áreas com um aumento de 400x. As células marcadas para PCNA na epiderme foram quantificadas em 3-5 cortes histológicos distintos de cada grupo, sendo escolhidos 5 diferentes fotos de forma aleatória de cada corte e assim foram analisadas com o software ImageJ® versão 1,48 (National Institute of Health, EUA).

4.6 ENSAIO DE VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR

Queratinócitos PAM 212 (carcinoma de células escamosas da pele) de camundongos foram cultivados como monocamada em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), o qual continha 25 mM de glucose, 10% soro fetal bovino inativado pelo calor (SFB), e 1% penicilina- estreptomicina (Invitrogen) e mantido em atmosfera de 5% de CO₂ na temperatura de 37°C. Baclofeno ou metrotrexato (droga antiproliferativa utilizada como controle positivo) foi inicialmente dissolvida até a concentração final de 1 mg/ml e 0,5 mg/ml respectivamente, usando o meio de

cultura livre de soro e filtrado e esterilizado com filtro de seringa de 0,22 μm (milipore) antes de usar. Quando as células cultivadas atingiram a confluência (70-80%), elas foram coletadas e divididas em diferentes subgrupos para os experimentos posteriores. O ensaio de contagem de células Kit-8 (CCK-8) (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japão) foi usado para mensurar a viabilidade de acordo com o protocolo do fabricante. Para testar a possibilidade de efeitos citotóxicos, células subconfluente PAM 212 (10^4 células/poços em 96-poços) foram incubadas com baclofeno (10, 30 ou 100 μM) ou metotrexato (0,1 μM) (droga de escolha que promove efeito anti-proliferativo neste modelo) e incubado por 24 horas na temperatura de 37°C. Em seguida para avaliar a proliferação celular, as mesmas concentrações do baclofeno ou metotrexato foram adicionadas sob as células subconfluente PAM212 (3×10^3 células/poços) em 96 poços plaqueados, e incubadas por 72 horas. Reagentes CCK-8 (10 $\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$) foram adicionados em cada poço e incubado em 37°C por 2 horas. Os resultados de densidade óptica (DO) foram mensurados através da leitura da absorbância em 450 nm usando a Leitora de microplacas (Molecular Devices, São Francisco, CA, EUA). No ensaio de proliferação celular, do kit CCK-8 foi feita leitura a cada 24 horas, assim como, a renovação do meio e a incubação das drogas.

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os dados foram expressos com média \pm erro padrão da média (E.P.M). Os dados foram analisados pelo teste de variância de uma via (ANOVA) com o pós teste Newman-Keuls. O nível de significância aceito para os testes foi de $p \leq 0,05$. Todos os testes estatísticos foram feitos usando o software GraphPad Prism versão 6.0, San Diego California, EUA (GraphPad Software, CA, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 EFEITO DO CREME DE BACLOFENO NO MODELO AGUDO DE INFLAMAÇÃO DE PELE

Os resultados demonstraram que a única aplicação do TPA induziu significativo aumento da espessura da orelha quando avaliada 6 horas após a aplicação do agente flogístico. A aplicação tópica do creme baclofeno 5% e 7,5% inibiu o edema de orelha promovido pelo TPA ($58,94 \pm 6,14\%$ e $47,73 \pm 11,26\%$, respectivamente) quando comparado com o grupo veículo. Não houve diferença significativa entre as doses de 5 e 7,5%. Ainda foi verificado que, o creme com o princípio ativo dexametasona (1%) promoveu redução do edema de orelha induzido por TPA ($87,33 \pm 4,59\%$), quando comparado ao grupo veículo (Figura 7).

O efeito antiedematogênico da aplicação tópica do baclofeno foi confirmado através de análise histológica (Figura 8 e 9). Assim, verificou-se que camundongos tratados topicamente com baclofeno (5%) apresentaram reduções significativas da espessura da orelha ($39,14 \pm 5\%$), quando comparado com o grupo veículo (Figura 8A). Da mesma forma, a aplicação tópica de dexametasona reduziu a espessura da orelha ($58,29 \pm 7,65\%$) (Figura 8).

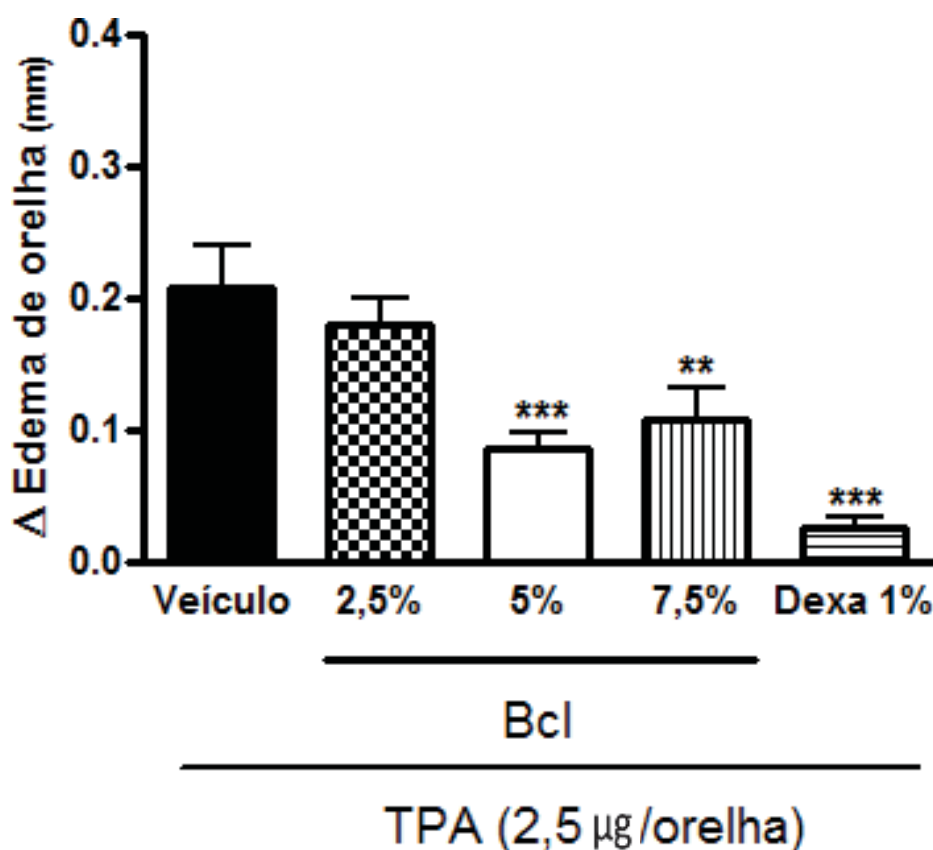


Figura 7: Efeito anti-inflamatório do creme baclofeno no modelo de inflamação de pele aguda induzida pelo TPA. Atividade antiedematogênica no tratamento tópico com baclofeno (Bcl, 2,5%, 5% ou 7,5%) ou dexametaxona (Dexa, 1%) no modelo de edema de orelha induzido por uma única aplicação do TPA. O grupo veículo foi tratado topicamente com o creme não iônico+PEG. Todas as drogas testadas foram aplicadas na orelha direita após aplicação do TPA. O edema de orelha foi mensurado 6 horas após a administração do TPA. Barras representam a média \pm E.P.M (n=9-14). Símbolos denotam o nível de significância para: **p <0,01 e ***p<0,001 quando comparando com o grupo veículo (Utilizado o teste de variância ANOVA de uma via seguido por post-hoc Newman-Keuls).

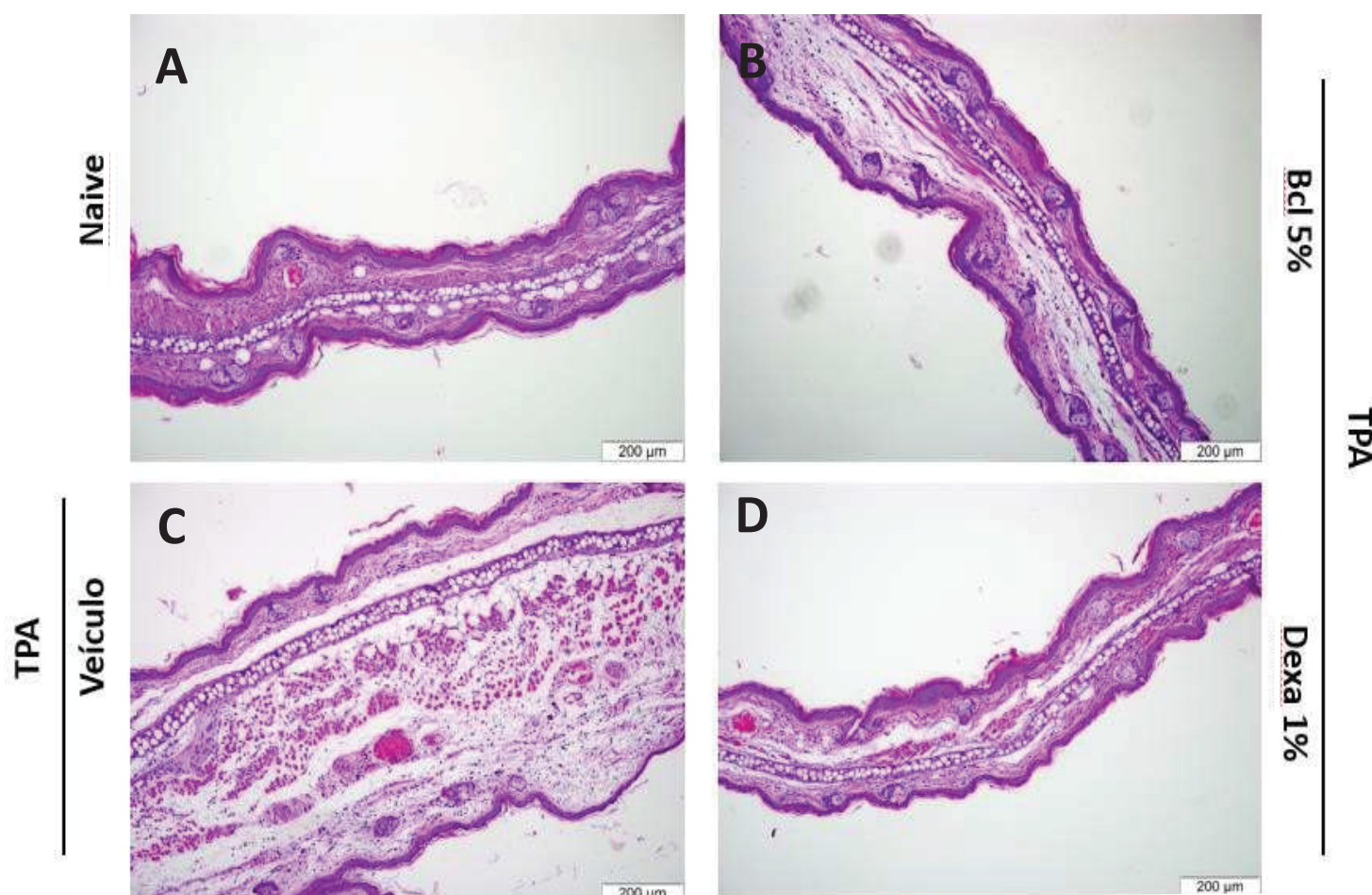


Figura 8: Imagens histológicas do efeito anti-inflamatório através da aplicação do creme baclofeno no modelo de inflamação aguda de pele: (A-D) São imagens representativas de cortes transversais das orelhas de camundongos coradas com hematoxilina- eosina (aumento de 100x, escala de 200 µm), coletadas após a mensuração do edema in vivo após 6 horas. Grupos: Naive (A), veículo (B), Bcl 5% (C) e Dexa 1% (D).

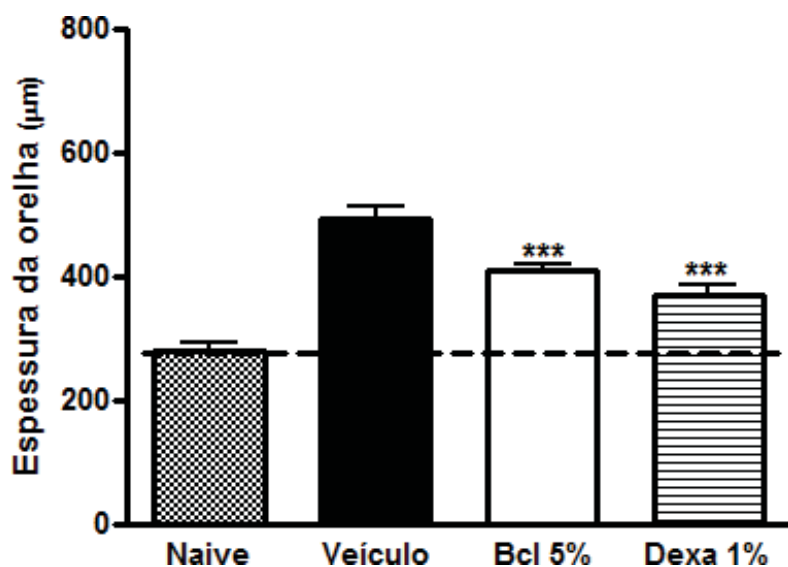


Figura 9: Análise quantitativa do efeito anti-inflamatório através da aplicação do creme baclofeno 5% no modelo de inflamação aguda de pele obtidos na histologia: Avaliação da atividade antiedematogênica na espessura da orelha. Tratamento com o creme baclofeno 5% (Bcl) ou creme dexametasona 1% (Dexa) diminuiu o edema de orelha induzido pela única aplicação do TPA. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. (n=5 triplicatas). Símbolos demonstram o nível de significância para: *** $p < 0,001$ quando comparando com o grupo veiculo (Utilizado o teste de variância ANOVA de uma via seguido por post-hoc Newman-Keuls).

Com o intuito de avaliar um possível efeito sistêmico do baclofeno, camundongos tiveram o processo inflamatório induzido por TPA na orelha direita, enquanto o tratamento com baclofeno (5%) ou dexametasona (1%) foi administrado topicamente na orelha contralateral. Nesse contexto, os resultados mostraram que somente o creme dexametasona teve a capacidade de reduzir a espessura da orelha (Figura 9), demonstrando efeito sistêmico mesmo quando aplicado topicamente ($75,11 \pm 7,6\%$).

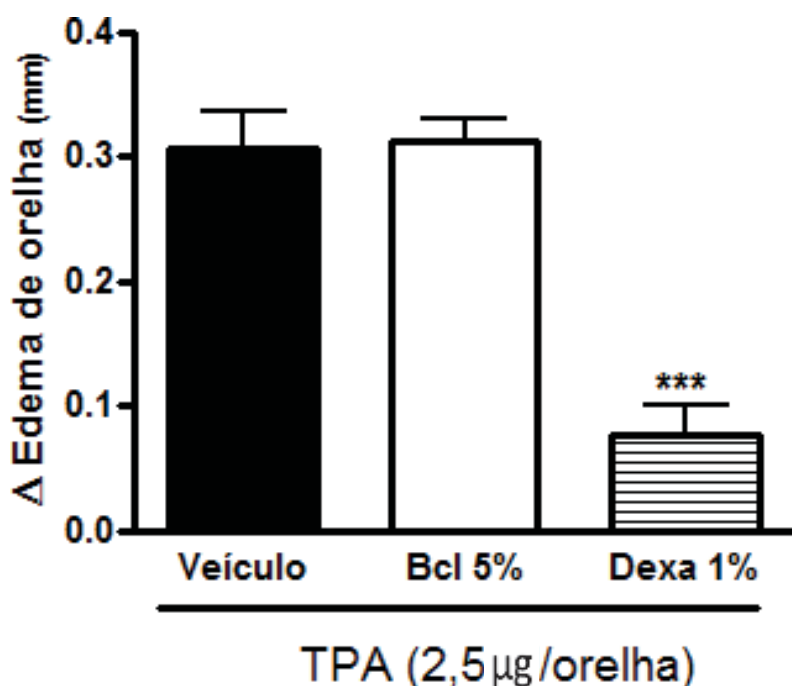


Figura 10: Efeito da aplicação do creme de baclofeno na orelha contralateral sobre a indução da inflamação de pele produzido pelo TPA. TPA foi aplicado pela via tópica nas orelhas direitas dos camundongos e todos os tratamentos com o creme baclofeno 5% (Bcl), creme dexametasona 1% (Dexa) e o veículo (creme não iônico+PEG) foram aplicados nas orelhas esquerdas (contralateral). O edema de orelha foi mensurado 6 horas após a administração do TPA. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. (n= 5 triplicatas). Símbolos demonstram o nível de significância para: *** $p < 0,001$ quando comparando com o grupo veículo (Utilizado o teste de variância ANOVA de uma via seguido por post-hoc Newman-Keuls).

5.2 EFEITO DA APLICAÇÃO DO CREME DO BACLOFENO NO MODELO DE INFLAMAÇÃO CRÔNICA DE PELE INDUZIDA PELA APLICAÇÃO MÚLTIPLA DE TPA.

Conforme representado na Figura 11, os resultados mostraram que as múltiplas aplicações de TPA promoveram aumento significativo da espessura da orelha. Em contraste, o tratamento tópico com o creme baclofeno (5%) foi capaz de inibir a formação do edema de orelha induzido por TPA em $33,31 \pm 3,67\%$, a partir do primeiro dia de tratamento (quinto dia) ($p < 0,05$). Semelhantemente, o controle positivo dexametasona (1%) diminuiu o edema de orelha induzido por TPA em $34,06 \pm 8,71\%$, quando comparados ao grupo veículo.

O efeito de inibição máxima foi observado no último dia de experimento (nono dia), onde baclofeno (5%) inibiu em $54,06 \pm 6,15\%$ e dexametasona em $71,68 \pm 3,45\%$ a formação do edema de orelha induzido por múltiplas aplicações de TPA, ambos comparados ao grupo veículo (Figura 11).

Análises histopatológicas demonstraram que a repetida aplicação do TPA promoveu um exacerbado aumento da espessura da orelha e da epiderme, além de intenso infiltrado celular (Figuras 12 C;13 A-C). Em contraste, animais tratados com o creme baclofeno (5%) exibiram uma redução na espessura da orelha ($50,82 \pm 7,33\%$) Figura 13A, na espessura da epiderme ($47,5 \pm 5,52\%$) (Figura 13B) e no infiltrado celular ($61,80 \pm 6,68\%$) (Figura 13C) em comparação com o grupo veículo. O resultado foi similar com o creme dexametasona (1%) que também mostrou uma inibição da espessura da orelha ($83,69 \pm 6,12\%$), da espessura da epiderme ($71,8 \pm 6,14 \%$) e infiltrado celular ($33,43 \pm 8,16 \%$) (Figuras 12D; 13 A-C).

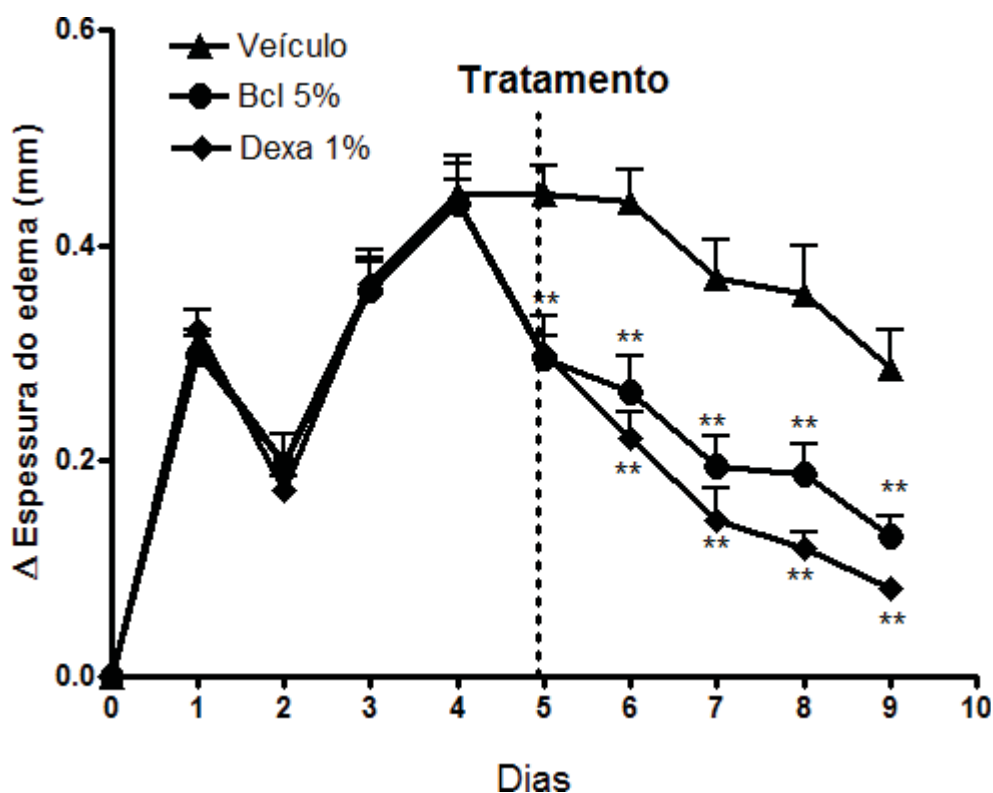


Figura 11: Efeito do creme de baclofeno na inflamação crônica de pele induzida pela aplicação do TPA. TPA foi administrado em dias alternados, durante nove dias de experimento em todos os grupos. Tratamento com o grupo veículo (triângulo), creme baclofeno 5% (círculo) e creme de dexametasona 1% (losango), começou no quinto dia de experimento e as aplicações foram feitas duas vezes ao dia. O edema de orelha foi medido diariamente. As linhas representam média \pm E.P.M. (n= 9-11). Símbolos demonstram o nível de significância para: **p < 0,01 quando comparando com o grupo veículo (Utilizado o teste de variância ANOVA de uma via ponto a ponto, seguido por post-hoc Newman-Keuls).

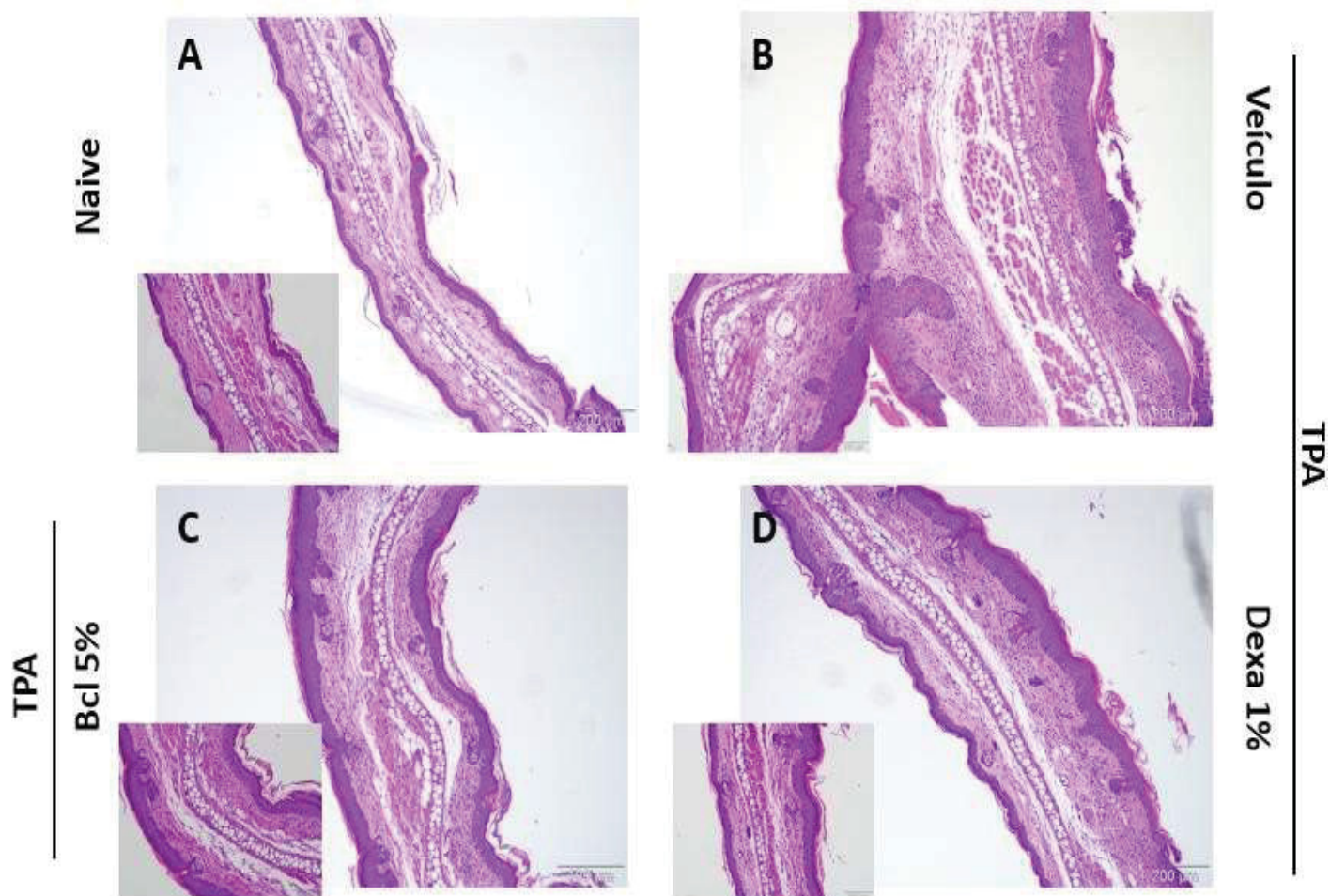


Figura 12: Imagens representativas da histologia de orelha dos camundongos mostrando o efeito anti-inflamatório do creme baclofeno no modelo de inflamação crônica de pele induzido pelo TPA. (A-D) Cortes transversais corados em hematoxilina-eosina das orelhas dos camundongos (x100, x200 com escala de 200 μ m e 100 μ m, respectivamente), coletadas após o último dia de experimento (nono dia). Grupos: Naive (A), veículo (B), Bcl 5% (C) e Dexa 1% (D)

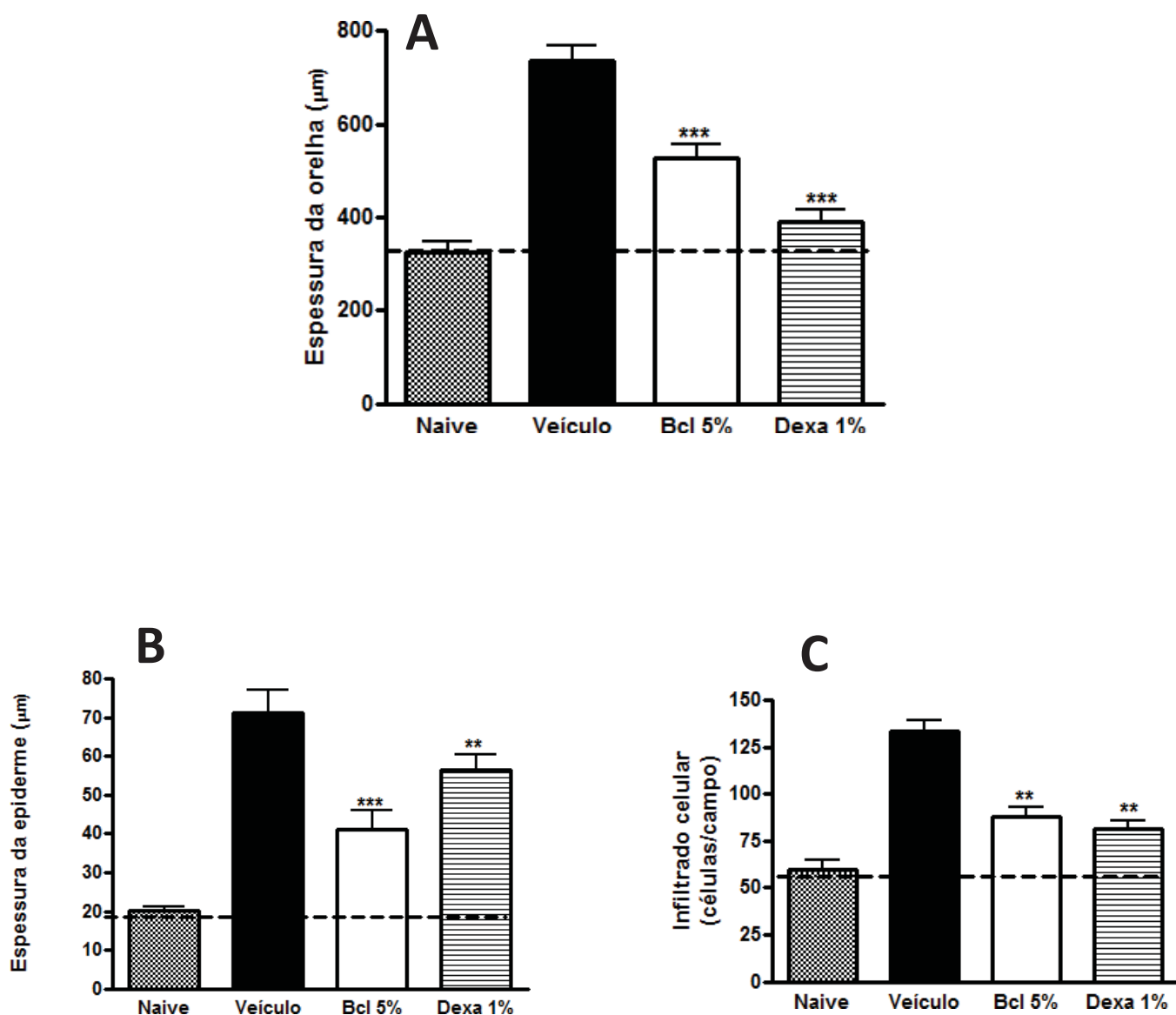


Figura 13: Análises quantitativas das lâminas histológicas no efeito anti-inflamatório do creme baclofeno no modelo de inflamação crônica de pele induzido pelo TPA: O processo inflamatório crônico foi induzido com a aplicação tópica do TPA em dias alternados durante 9 dias. Análises quantitativas das lâminas histológicas evidenciaram que o tratamento com o creme baclofeno 5%(Bcl) e Dexametasona 1% (Dexa) reduziu o (A) edema de orelha, (B) espessura da epiderme e (C) e o infiltrado celular induzido pelas múltiplas aplicações do TPA. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. (n=3 triplicatas). Símbolos demonstram o nível de significância para: **p <0,01 e ***p<0,001 quando comparando com o grupo veículo (Utilizado o teste de variância ANOVA de uma via seguido por post-hoc Newman-Keuls).

5.3 EFEITO ANTIPROLIFERATIVO DO CREME DE BACLOFENO NA EPIDERME

Com o intuito de avaliar o potencial antiproliferativo do baclofeno em queratinócitos, foi realizada a avaliação da presença de células imunomarcadas para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) na epiderme (Figura 14).

Os resultados obtidos mostram que a aplicação repetida de TPA promoveu uma desregulação na proliferação dos queratinócitos, promovendo aumento significativo do número de células positivas para PCNA ($96,65 \pm 5,92$ células positivas/campo) ao longo de diferentes áreas da epiderme, quando comparado com o grupo Naive ($11,67 \pm 3,34$ células positivas/campo) (Figura 15).

Interessantemente, o tratamento com baclofeno tópico (5%) diminuiu em $62,01 \pm 6,65\%$ o número de células marcadas para PCNA, sugerindo modulação da proliferação dos queratinócitos (Figura 13 C; 14). A avaliação da imunohistoquímica com PCNA também evidenciou a redução de $70,42 \pm 6,11\%$ células proliferativas em animais tratados com dexametasona, ambos comparados com o grupo veículo (Figura 14D; 15).

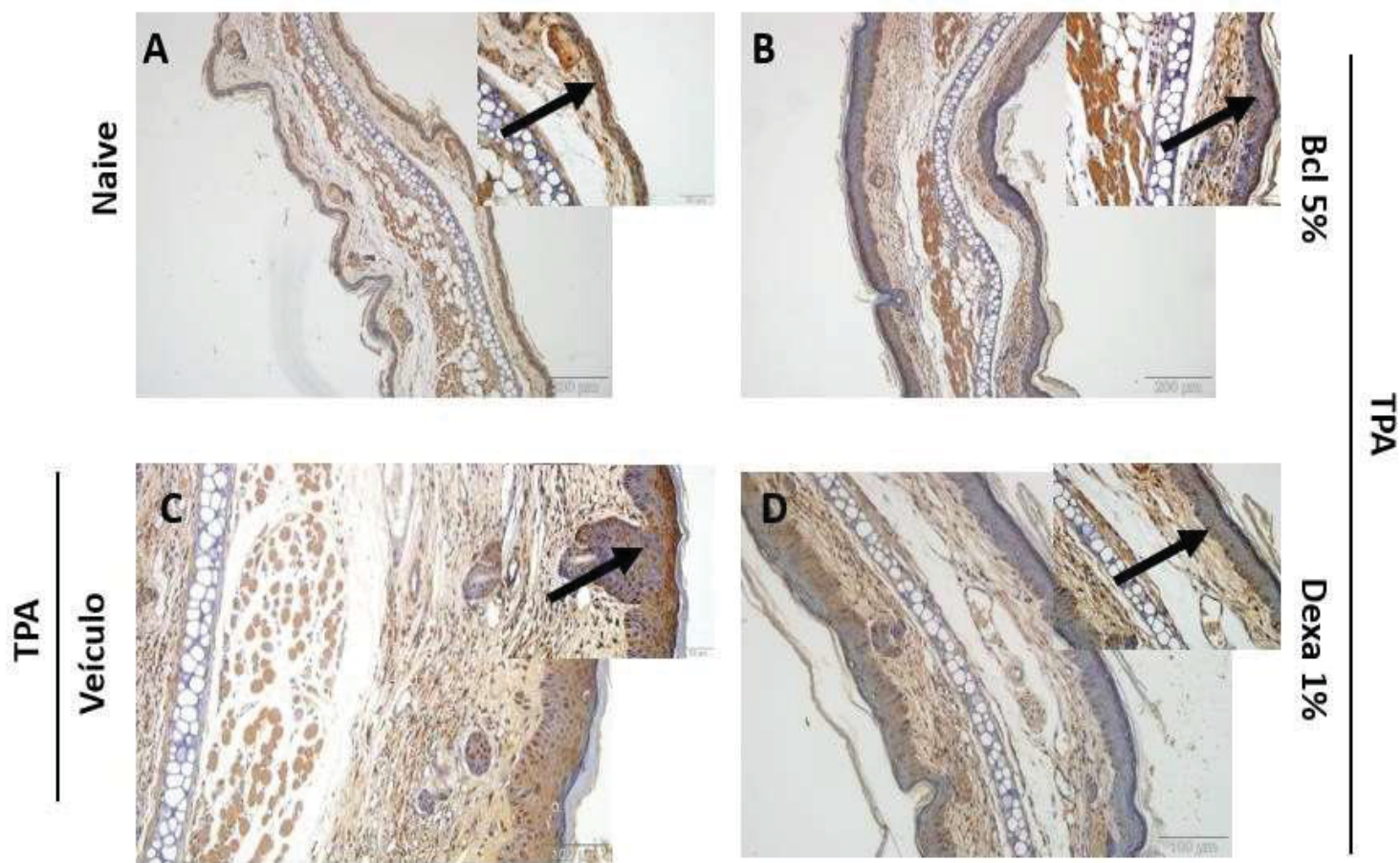


Figura 14: Imagens da imuno-histoquímica mostrando a atividade antiproliferativa do creme baclofeno nos queratinócitos epidermais. (A-D) Imagens representativas dos cortes transversais das orelhas dos camundongos marcados com PCNA (x100, x400 com escala de 200 μm e 50 μm respectivamente) no modelo de inflamação crônica de pele induzido pela aplicação do TPA. Setas indicam células em proliferação. Amostras coletadas após o último dia de experimento (nono dia). Grupos: Naive (A), veículo (B), Bcl 5% (C) e Dexa 1% (D).

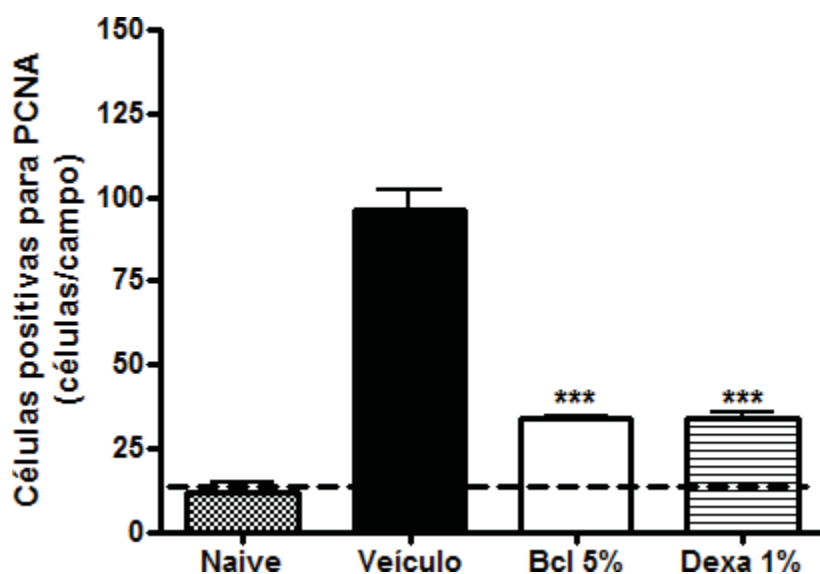


Figura 15: Análise quantitativa da atividade antiproliferativa do creme baclofeno nos queratinócitos epidermais Quantificação de células imunopositivas para PCNA na amostra de animais Naive ou tratados com creme baclofeno 5% (Bcl), creme dexametasona 1% (Dexa) ou veículo. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. (n=5 triplicatas). Símbolos demonstram o nível de significância para: *** $p < 0.001$ quando comparando com o grupo veículo (Utilizado o teste de variância ANOVA de uma via seguido por post-hoc Newman-Keuls).

5.4 EFEITO DO CREME DE BACLOFENO SOBRE OS QUERATINÓCITOS NO MODELO *IN VITRO*

As diferentes concentrações de baclofeno avaliadas (Figura 16) não promoveram alterações significativas na viabilidade de células da linhagem PAM 212, após 24 horas de incubação.

Semelhantemente, o tratamento com baclofeno não interferiu na proliferação celular durante o ensaio de crescimento dos queratinócitos que perdurou por 72 horas. Como esperado o metotrexato (uma droga conhecida por seu efeito antiproliferativo) reduziu a viabilidade celular dos queratinócitos quando incubados nas 24 horas, e ainda conseguiu inibir o crescimento dos queratinócitos no ensaio de 72 horas.

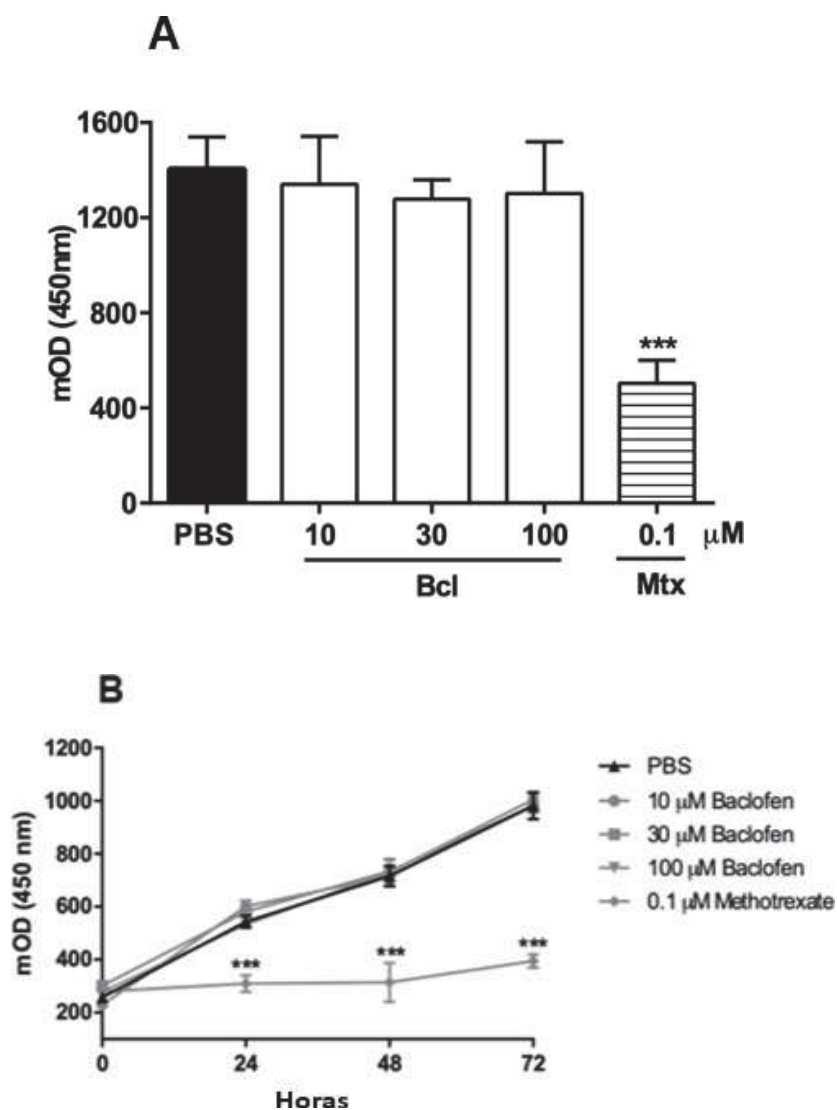


Figura 16: Influência do baclofeno na viabilidade e proliferação celular na cultura de queratinócitos. Células da linhagem PAM 212 (10^4 células/poços para 24 horas e 3×10^3 células/poços por 24 horas e 72 horas) estavam no meio de cultura em crescimento com baclofeno (Bcl) ou metotrexato (MTX) com concentrações indicadas em 24 horas (A) ou 72 horas (B), fornecidos para contagem de células do kit-8 de ensaio (CCK-8). Símbolos demonstram o nível de significância para: ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparando com o grupo veículo (PBS) (Utilizado o teste de variância ANOVA de uma via seguido por post-hoc Newman-Keuls).

6 DISCUSSÃO

Visto que ainda a medicina não possui uma terapia totalmente eficaz para o tratamento das doenças inflamatórias de pele (LOWES; BOWCOCK; KRUEGER, 2007) há necessidade de pesquisar novas drogas e alvos terapêuticos. Nesse sentido, alguns pesquisadores demonstraram uma importante função do GABA nas doenças inflamatórias crônicas em vários sistemas (AUTERI; ZIZZO; SERIO, 2015; DUTHEY et al., 2010; WANG et al., 2018) e neste contexto podemos citar a dor neuropática, artrite e doenças de pele em que o GABA e o receptor GABA_B parecem desempenhar um papel essencial nesse cenário (CEVIKBAS et al., 2017; HUANG, S. et al., 2015; MAGNAGHI et al., 2014).

No presente estudo foi evidenciado um importante efeito anti-inflamatório agudo pela aplicação do creme baclofeno nas doses de 5% e 7,5% no modelo de inflamação de pele induzido por TPA em camundongos. De fato, o creme de baclofeno 5% e 7,5% foi capaz de reduzir o edema de orelha, um dos sinais do processo inflamatório. As análises histológicas desses tecidos também revelaram uma redução da espessura da orelha confirmando que o creme de baclofeno apresenta um efeito anti-inflamatório.

O modelo de inflamação que utilizamos é conhecido por produzir uma resposta inflamatória na pele com apenas uma única aplicação do agente flogístico TPA na orelha dos camundongos, consistindo em infiltração dos leucócitos polimorfonucleares, edema e eritema mediado pela ativação da proteína Kinase C, proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), fosfolipase A₂, ciclooxigenase-2 e lipoxigenase (CARLSON et al., 1985; MURAKAWA et al., 2006; STANLEY et al., 1991). Além disso, o processo inflamatório se inicia após a aplicação do TPA devido aumento dos metabólitos do ácido araquidônico nos tecidos, inferindo que estes metabólitos são importantes para desencadear a resposta inflamatória, o que em sequência ocasiona a produção de mediadores inflamatórios como os eicosanoides e citocinas pró-inflamatórias (MURAKAWA et al., 2006).

Corroborando com nossos achados, Duthey e colaboradores (2010) também reportaram que a administração do baclofeno pela via intraperitoneal (1 mg/kg) foi capaz de reduzir o edema de orelha induzido pela aplicação do 2,4-dinitrofluorobenzeno (DNFB). Os pesquisadores sugerem que o agonista baclofeno poderia reduzir os processos inflamatórios pela ação nas proteínas quinases C

dependentes de cálcio, que são responsáveis por fazer a dessensibilização heteróloga dos receptores de quimiocinas, e adicionalmente ativam a proteína G_i , resultando na inibição da secreção de mediadores pró-inflamatórios.

Recentemente, Cevikbas et al. (2017) evidenciaram que a aplicação dos agonistas $GABA_A$ (muscimol) ou $GABA_B$ (baclofeno) sozinhos ou em combinação em doses baixas quando administrados pela via intraperitoneal foram capazes de promoverem um efeito anti-pruriginoso no modelo de dermatite atópica em camundongos, sugerindo um potencial clínico para aplicação de agonistas GABA no manejo de prurido agudo e crônico (CEVIKBAS et al., 2017).

Ainda Cevikbas et al (2017), descreve que o mecanismo fisiopatológico do prurido na dermatite atópica poderia estar relacionado ao aumento dos níveis de CGRP (Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina), que é um neuropeptídeo responsável pela ação pró-prurido no circuito do corno da raiz dorsal, e em sequência foi observada uma diminuição da subunidade do receptor $GABA_{B1}$ pós-sináptico, sugerindo que as doenças de pele tem um aumento do neuropeptídeo excitatório (CGRP) e diminuição da expressão dos receptores ($GABA_{B1}$).

No processo inflamatório de pele aguda o contato com um agente flogístico caracteriza a inflamação por quatro sinais clínicos: rubor, calor, edema e dor (HOHJOH et al., 2014). De fato, nossos resultados demonstraram que o creme baclofeno 5% foi eficaz em reduzir um sinal clínico, o edema in vivo, percebendo também uma redução significativa da espessura da orelha na histologia. Nesse sentido, os dados da literatura juntamente com os obtidos nesse trabalho reforçam um importante papel do $GABA_B$ no tratamento de inflamação de pele.

Nossos estudos também demonstraram que o creme baclofeno 5% aplicado na orelha contralateral foi ineficaz para inibir o edema de orelha causado pela aplicação do TPA na orelha ipsilateral, diferentemente do observado com a dexametasona. Em um estudo recente, Hanack et al. (2015) também mostrou que o baclofeno quando administrado pela via intraplantar na pata contralateral do camundongo, não diminuiu a resposta nociceptiva estimulada pela bradicinina ou fator de crescimento do nervo (NGF) na pata ipsilateral.

Além disso, em um estudo de caso publicado pelos pesquisadores Kosky e Keppel (2013), foi reportado uma redução de 95% da resposta da dor em uma paciente que sofria de acromegalia e que desenvolveu dores neuropáticas. Nesse mesmo estudo os autores relataram que não foram evidenciados efeitos colaterais

após o uso do creme baclofeno 5% quando aplicado por duas semanas. Essas evidências e dados aqui reunidos nos permitem sugerir que o creme baclofeno, além de reduzir a resposta inflamatória, pode apresentar, nessas doses testadas, menos absorção sistêmica e possivelmente menos efeitos colaterais quando administrado pela via tópica. Nessas circunstâncias, esses achados poderia insinuar uma segurança na sua aplicabilidade uma vez que, quando o baclofeno é administrado pela via oral ou via endovenosa na clínica, pode causar diversos efeitos colaterais como a sedação, alteração funcional dos rins, em casos mais graves a cardiomiopatia (CARDOSO et al., 2014; RADHAKRISHNAN, 2016; SRIVASTAVA et al., 2014; WU et al., 2005). Porém, é necessárias outras avaliações para afirmar a segurança desse fármaco em relação aos efeitos colaterais mesmo quando administrado em forma de creme.

Além do efeito anti-inflamatório em um modelo de inflamação de pele aguda, aqui também foi demonstrado efeito semelhante em um modelo de inflamação crônica. Algumas doenças inflamatórias crônicas de pele, como a psoríase e a dermatite atópica são caracterizadas pela hiperplasia, aumento da espessura da pele, placas escamosas (SVENSSON et al., 2012). Esses sinais clínicos apresentados nos pacientes com distúrbios de pele são evidenciados através da intensa proliferação dos queratinócitos (DAVIDOVICI et al., 2010). As anormalidades no crescimento dos queratinócitos e diferenciação demonstram uma significância em diversas doenças de pele por meio das respostas anormais ou exageradas a fatores de crescimento. (DENNING, 2004).

A diferenciação dos queratinócitos é extensivamente alterada nessas dermatoses, paralelamente à “maturação regenerativa”, uma alternativa para diferenciação celular programada que é adquirida durante a reparação tecidual. Doenças inflamatórias de pele possuem lesões em formas de placas e escamas, o que é causado pela diferenciação anormal dos queratinócitos. A camada granular da epiderme, onde a diferenciação terminal começa, é reduzida ou inibida nas lesões psoriáticas. Conseqüentemente, a camada córnea é formada por queratinócitos em diferenciação incompleta, os quais ainda possuem núcleos. Conseqüentemente, descamações, e a quebra da barreira protetiva, são causados pela falha dos corneócitos na psoríase que deveriam secretar lipídeos extracelulares e fazer a adesão celular (ELDER; KANSRA; STOLL, 2004; MCKAY; LEIGH, 1995)

Aqui foi demonstrado que o creme de baclofeno foi capaz de melhorar algum desses parâmetros clínicos no modelo crônico de múltiplas aplicações do TPA. O modelo de inflamação crônica de pele devido a repetidas aplicações TPA é conhecido por produzir um persistente estado de inflamação como aumento da espessura da epiderme (semelhante à psoríase) com um aumento de TGF- β 1 e leucotrienos B4. Adicionalmente os leucotrienos são capazes de aumentar a permeabilidade vascular resultando em um aumento do peso e espessura da orelha. Além disso, o TPA aumenta a liberação de citocinas pro inflamatórias, incluindo IL-1 β e então, estimula a intensa proliferação e diferenciação dos queratinócitos (GÁBOR 2003; STANLEY et al. 1991; MURAKAWA et al. 2006).

A formação da cascata pró-inflamatória induzida pelo TPA assemelha-se ao que acontece nas doenças inflamatórias de pele, em que as citocinas como TNF- α e IL-1 de algumas células residentes como queratinócitos, mastócitos e células dendríticas, se ligam nos receptores do endotélio vascular, fazendo uma ativação da sinalização celular incluindo a via do fator nuclear (NF- κ B), e indução da expressão de moléculas de adesão através das células endoteliais vasculares (AKDIS et al., 2006). A persistência da fase crônica como na dermatite envolve também a produção de citocinas do perfil Th1 como IL-12 e IL-18, bem como várias citocinas associadas à remodelação como IL-11 e TGF- β 1, que são expressas preferencialmente nas fases crônicas das doenças e produzindo um extravaso intersticial resultando no edema (AKDIS et al., 2006; LEUNG et al., 2004).

Nesse sentido, nossos achados evidenciaram que o creme baclofeno 5% foi capaz de reduzir significativamente a infiltração celular no modelo crônico induzido por repetidas aplicações do TPA. Corroborando com nossos dados Duthey et al. (2010) mostrou que baclofeno quando aplicado intraperitoneal diminuiu o recrutamento de neutrófilos, monócitos e linfócitos no modelo de dermatite de contato alérgica, por meio do antagonismo dos receptores de quimiocinas, inibindo que essas células sofressem a quimiotaxia.

Em um estudo clínico recente também foi verificado que a administração do creme baclofeno 5% durante algumas semanas em pacientes que foram submetidos à hemorreidectomia, conseguiu suprimir as dores pós-operatórias de origem inflamatória e cirúrgica (ALA et al., 2019).

Além disso, nós mostramos que no modelo crônico de múltiplas aplicações de TPA, o baclofeno tópico 5% apresentou um efeito inibitório em relação à hiperplasia da

epiderme, caracterizado pela redução das células marcadas pelo PCNA, indicando um decaimento na proliferação dos queratinócitos. A liberação de quimiocinas produzidas pelos queratinócitos estimulados no processo inflamatório, acarreta no aumento da infiltração celular de células mononucleares, como monócitos, neutrófilos e linfócitos. Essas células são responsáveis por infiltrar no tecido inflamado, nesse caso na pele, e fagocitar os antígenos ou neste contexto os auto antígenos, e assim, liberar outros tipos de interleucinas transmitindo informações para os linfócitos T (GROZDEV; KORMAN; TSANKOV, 2014;GUTTMAN-YASSKY; KRUEGER, 2017).

Ainda, a sinalização na cascata pró-inflamatória resultaria na diferenciação dos linfócitos T (Th1, Th17 e Th22) que como resposta liberariam fatores estimulatórios à proliferação dos queratinócitos (LOWES; SUÁREZ-FARIÑAS; KRUEGER, 2014). Diante do resultado obtido em nossos estudos é possível que o efeito inibitório do creme baclofeno na hiperproliferação dos queratinócitos na imuno-histoquímica e na infiltração celular, poderia estar ocorrendo por meio da ativação do receptor GABA_B que está presente nessas células (WHITEHEAD et al., 2012), e que a ativação do mesmo poderia inibir a proliferação dos queratinócitos e também a infiltração celular.

Na atualidade, o tratamento de algumas doenças de pele como a psoríase e dermatite atópica é feito mediante a administração oral ou sistêmica de diversos fármacos como o metotrexato, glicocorticoide e anti-histamínicos (SIDBURY et al., 2014). O metotrexato é um agente antimetabólico que impede a síntese de DNA, RNA e a reprodução celular, isso acontece devido ao acúmulo intracelular de dihidrofolato por meio da inibição da enzima dihidrofolato redutase, conseqüentemente, este acúmulo acarreta em redução na produção de purinas e timinas (SIDBURY et al., 2014). Essa droga é uma das mais efetivas na prática clínica, pois em baixas doses consegue modular a hiperplasia, por meio da atuação do crescimento e viabilidade celular, sendo assim, considerado como um fármaco citotóxico (JEFFES et al., 1995). Já foi descrito na literatura que a administração prolongada desse fármaco pode ocasionar diversos efeitos colaterais, como o aumento do risco de hepatotoxicidade, morte fetal, anomalias congênitas, supressão da medula óssea, toxicidade gastrointestinal com uso concomitante de fármacos anti-inflamatório não esteroideais, cirrose, toxicidade pulmonar, linfomas malignos e imunossupressão (HUANG, T. H. et al., 2019;KIM, H. J.; LEBWOHL, 2019).

Os glicocorticoides como a dexametasona, são fármacos que reduzem a resposta inflamatória em indivíduos com distúrbios na pele, e são conhecidos por diminuir os sinais clínicos, como o prurido e eritema, além de servir como adjuvantes no tratamento com a fototerapia, porém, sua utilização deve ser criteriosa, visto que, os efeitos adversos quando utilizados cronicamente, são maiores do que os benefícios, pois podem acarretar no desencadeamento da hipertensão, ganho de peso, gastrites, hipertrofia da glândula adrenal e intolerância a glicose (SIDBURY et al., 2014).

Nesse sentido, pensando numa nova proposta terapêutica, nossos resultados sugerem que o baclofeno poderia agir como um agente anti-proliferativo e anti-inflamatório no processo inflamatório de pele.

Na contramão, nossos resultados no modelo *in vitro* mostraram que diferente do observado *in vivo*, baclofeno foi ineficaz para reduzir a proliferação dos queratinócitos, e também não causou morte celular em cultura de queratinócitos epidermais. Já o metotrexato, como esperado foi eficaz para reduzir a proliferação dos queratinócitos e a viabilidade celular. Assim, pode-se observar que baclofeno, diferente do metotrexato, parece promover efeito antiproliferativo sem afetar a viabilidade celular, o qual seria uma vantagem, uma vez que várias drogas são conhecidas por diminuir a proliferação celular em algumas doenças de pele, através da inibição do crescimento dos queratinócitos e aumentando a apoptose. O uso desses fármacos requer um monitoramento regular das enzimas do fígado e contagem de células sanguíneas, devido os efeitos tóxicos seletivos ao fígado e medula óssea (JEFFES et al., 1995; KIM, H. J.; LEBWOHL, 2019; SOONTHORNCHAI et al., 2019).

Além disso, o resultado observado no presente estudo sugere que esse efeito do agonista GABA_B em reduzir o número de células em proliferação *in vivo*, mas não *in vitro*, parece não ocorrer por uma direta modulação do receptor GABA_B nos queratinócitos, mas talvez por outra via de sinalização, desde que este receptor está presente em várias células e possui diferentes ações de acordo com o tecido específico (BASSI et al. 2016; KONNERMAN et al. 2017). Sendo assim, poderia-se sugerir que esse mecanismo está ocorrendo através da inibição da liberação das citocinas pró-inflamatórias, resultando na transdução de sinal, consequentemente num bloqueio da cascata pró-inflamatória.

Adicionalmente o receptor GABA_B está presente em células do sistema imune, as quais participam do processo inflamatório nos distúrbios da pele, como as células dendríticas que são uma das principais peças para a via da psoríase e dermatite atópica. Já foi visto que a contagem de células dendríticas está aumentada nas lesões psoriáticas e que, interessantemente, essas células ativam os linfócitos T por meio da apresentação de auto antígenos e através da liberação de algumas citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e a IL-23 (GROZDEV; KORMAN; TSANKOV, 2014;LOWES; SUÁREZ-FARIÑAS; KRUEGER, 2014). Recentemente modelos de doenças de pele incluíam papéis importantes para os subconjuntos de células Th1, Th17 e Th22 que produzem as citocinas da classe Interferon gama (INF- γ), interleucina 17 (IL-17) e Interleucina 22 (IL-22) respectivamente.

Já está claro que o estímulo pró-inflamatório inicia-se por meio da diferenciação das células T em Th17 e esta célula diferenciada libera IL-17 que é suficiente para amplificar os processos inflamatórios na psoríase, e ainda iniciar a diferenciação e infiltração no tecido das células Th1 e Th22. Portanto, o modelo mais atual considera que o principal fator da psoríase é o tipo 17, assim células T (Th17, Tc17) e auto antígenos específicos são os prováveis ativadores da patologia (GUTTMAN-YASSKY; KRUEGER, 2017).

Nesse sentido, Huang et al. (2015) demonstrou que, baclofeno conseguiu melhorar os sinais clínicos no modelo animal da artrite, diminuindo IL-17, IL-6, células do perfil Th17 do linfonodo inguinal, e a frequência de células Th1. Contudo, o efeito não foi confirmado no modelo in vitro. De fato, no ensaio in vitro, baclofeno não afetou a diferenciação das células Th17 e TH1, e também das células T regulatória. Assim, os autores sugerem que o baclofeno reduz a diferenciação das células Th17 in vivo, mas não in vitro, possivelmente por mecanismos indiretos (HUANG et al., 2015). Embora o modelo experimental usado por Huang et al., (2015) seja diferente do usado em nossos estudos, os resultados obtidos por eles corroboram com os nossos dados por mostrar que baclofeno in vitro também apresentou um efeito diferente dos achados no modelo deles in vivo.

Como dito anteriormente, o receptor GABA_B está localizado em inúmeros tecidos, e estudos já demonstram a presença dele no corno da raiz dorsal em que, o receptor GABA_B expresso nessas fibras participa da hiperalgesia em modelo de dor neuropática em ratos, no qual uma diminuição gabaérgica poderia estar relacionada com o efeito nociceptivo (PATEL et al., 2001).

Recentemente foi observado que o receptor TRPV1 (Receptor Potencial Transitório Vanilóide 1), que é um canal iônico expresso em células neuronais e não neuronais como monócitos, macrófagos, células mamárias e queratinócitos (KUNDE et al., 2018; OMARI et al., 2017; TALAGAS; MISERY, 2019) está bastante expresso no corno da raiz dorsal e está envolvido na participação dos processos inflamatórios neurogênicos e no processamento da dor através da liberação dos peptídeos CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina) e substância P (KANG; HYUN, 2020). Além disso, foi demonstrado que o receptor GABA_B está co-localizado com o receptor TRPV1 nas terminações dos nervos periféricos (HANACK et al. 2015). Usando modelos experimentais in vitro e in vivo, os autores evidenciaram que a ativação do GABA_B através do baclofeno não diminui a função constitutiva do receptor TRPV1, mas inibia o seu estado de sensibilização. Esse efeito foi independente da sinalização mediada pela proteína Gi/0 e foi inferido que a ação foi mediada justamente pela sua co-localização, e é possível que o baclofeno provoque uma mudança conformacional que é transmitida diretamente para o canal TRPV1 para controlar e regular o seu estado de sensibilização (HANACK et al. 2015).

Reforçando ainda, um grupo de pesquisadores demonstrou um efeito anti-inflamatório da alga *Rhodospirillum rubrum* em modelo in vitro em células da pele, na qual evidenciou a capacidade da alga em reduzir os níveis de Interleucina 1 (IL-1) e NGF (fator de crescimento do nervo). E em seguida foi descoberto que essa alga em sua constituição continha o neurotransmissor GABA (agonista endógeno do receptor GABA_B), e foi salientado que este efeito inibitório poderia ser através da co-localização dos receptores TRPV1 e GABA_B (SCANDOLERA et al., 2018). Visto que, o receptor TRPV1 tem sido apontado como um possível mediador nos processos inflamatórios de pele (TALAGAS; MISERY, 2019) e que sua modulação parece ser mediada pelo receptor GABA_B como observado em estudos anteriores, nós não podemos excluir que o efeito antiproliferativo sobre os queratinócitos observado pela aplicação do baclofeno tópico in vivo, mas não in vitro, nos nossos estudos possa estar acontecendo pela modulação indireta via receptor GABA_B sobre o receptor TRPV1 ou ainda sobre outros canais expressos em neurônios sensoriais. Portanto, novos estudos são necessários para clarear essa possível modulação indireta do receptor GABA_B na proliferação de queratinócitos.

7. CONCLUSÃO

Sabe-se que as doenças inflamatórias de pele possuem um grande impacto na saúde humana, pois afetam a qualidade de vida dos pacientes. Além disso, as terapias atuais para estas dermatoses ainda não são totalmente eficazes ou apresentam efeitos colaterais que dificultam a adesão dos pacientes. Sendo assim, o presente estudo mostrou que o GABA_B participa de alguma maneira na modulação das respostas inflamatórias de pele. E os nossos resultados evidenciaram um efeito anti-inflamatório e anti-proliferativo mediante a aplicação do creme baclofeno nos modelos de inflamação aguda e crônica de pele. Nesse sentido, o uso do baclofeno de forma tópica poderia ser uma alternativa para o tratamento e manejo de doenças inflamatórias de pele e hiperproliferativas, como a psoríase. Além disso, o possível efeito terapêutico do creme de baclofeno, poderia minimizar alguns efeitos colaterais quando comparado com a administração por via oral ou por via endovenosa.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, C. L.; LAWRENCE, A. J. **CGP7930: A positive allosteric modulator of the GABAB receptor.** *CNS Drug Reviews*, [s.l.], v. 13, n° 3, p. 308–316, 2007. ISSN: 1080563X, DOI: 10.1111/j.1527-3458.2007.00021.x.
- AKDIS, C. A. et al. **Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology/PRACTALL Consensus Report.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, [s.l.], v. 118, n° 1, p. 152–169, 2006. ISSN: 00916749, DOI: 10.1016/j.jaci.2006.03.045.
- AL-SHAAR, H. A.; ALKHANI, A. **Intrathecal baclofen therapy for spasticity: A compliance-based study to indicate effectiveness.** *Surgical Neurology International*, [s.l.], v. 7, n° 20, p. S539–S541, 2016. ISSN: 21527806, DOI: 10.4103/2152-7806.187529.
- ALA, S. et al. **Effect of Topical Baclofen 5% on Post-Hemorrhoidectomy Pain: Randomized Double Blind Placebo-Controlled Clinical Trial.** *Journal of Gastrointestinal Surgery*, [s.l.], 2019. ISBN: 1160501904, ISSN: 1091255X, DOI: 10.1007/s11605-019-04147-7.
- ALBANESI, C. et al. **Keratinocytes in inflammatory skin diseases.** *Current Drug Targets: Inflammation and Allergy*, [s.l.], v. 4, n° 3, p. 329–334, 2005. ISSN: 1568010X, DOI: 10.2174/1568010054022033.
- AUTERI, M.; ZIZZO, M. G.; SERIO, R. **GABA and GABA receptors in the gastrointestinal tract: From motility to inflammation.** *Pharmacological Research*, [s.l.], v. 93, p. 11–21, 2015. ISSN: 10961186, DOI: 10.1016/j.phrs.2014.12.001.
- AZULAY, R.D.; AZULAY, L. **Dermatologia.** In: GUANABARA-KOOGAN (Org.). 3 ed. São Paulo: [s.n.], 2011. ISBN: 9788527732468.
- BANGERT, C.; BRUNNER, P. M.; STINGL, G. **Immune functions of the skin.** *Clinics in Dermatology*, [s.l.], v. 29, n° 4, p. 360–376, 2011. ISSN: 0738081X, DOI: 10.1016/j.clindermatol.2011.01.006.
- BARRAGAN, A. et al. **GABAergic signalling in the immune system.** *Acta Physiologica*, [s.l.], v. 213, n° 4, p. 819–827, 2015. ISSN: 17481716, DOI: 10.1111/apha.12467.
- BARTON, D. L. et al. **A double-blind, placebo-controlled trial of a topical treatment for chemotherapy-induced peripheral neuropathy: NCCTG trial N06CA.** *Bone*, [s.l.], v. 23, n° 1, p. 1–7, 2008. ISBN: 6176321972, ISSN: 15378276, DOI: 10.1038/jid.2014.371.
- BASSI, G. S. et al. **Spinal GABA-B receptor modulates neutrophil recruitment to the knee joint in zymosan-induced arthritis.** *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, [s.l.], v. 389, n° 8, p. 851–861, 2016. ISSN: 14321912, DOI:

10.1007/s00210-016-1248-0.

BELSITO, D. V. **Occupational contact dermatitis: Etiology, prevalence, and resultant impairment/disability.** *Journal of the American Academy of Dermatology*, [s.l.], v. 53, n° 2, p. 303–313, 2005. ISSN: 01909622, DOI: 10.1016/j.jaad.2005.02.045.

BIEBER, T. **Atopic dermatitis.** *The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE*, [s.l.], v. 358, n° 14, p. 1483–1494, 2008. ISSN: 0035-2640.

BRAFF, M. H. et al. **Keratinocyte production of cathelicidin provides direct activity against bacterial skin pathogens.** *Infection and Immunity*, [s.l.], v. 73, n° 10, p. 6771–6781, 2005. ISSN: 00199567, DOI: 10.1128/IAI.73.10.6771-6781.2005.

BRODELL, L. A.; ROSENTHAL, K. S. **Skin structure and function: The body's primary defense against infection.** *Infectious Diseases in Clinical Practice*, [s.l.], v. 16, n° 2, p. 113–117, 2008. ISSN: 10569103, DOI: 10.1097/IPC.0b013e3181660bf4.

BURMAN, A. et al. **The role of leukocyte-stromal interactions in chronic inflammatory joint disease.** *Joint Bone Spine*, [s.l.], v. 72, n° 1, p. 10–16, 2005. ISSN: 1297319X, DOI: 10.1016/j.jbspin.2004.03.009.

CARDOSO, A. L. et al. **Cardiac arrest due to baclofen withdrawal syndrome.** *BMJ Case Reports*, [s.l.], p. 2–4, 2014. ISBN: 2014204322, ISSN: 1757790X, DOI: 10.1136/bcr-2014-204322.

CARLSON, R. P. et al. **Modulation of mouse ear edema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents.** *Agents and Actions*, [s.l.], v. 17, n° 2, p. 197–204, 1985. ISSN: 00654299, DOI: 10.1007/BF01966592.

CASTRO, A. R. et al. **Secondary hyperalgesia in the monoarthritic rat is mediated by GABAB and NK1 receptors of spinal dorsal horn neurons: A behavior and c-fos study.** *Neuroscience*, [s.l.], v. 141, n° 4, p. 2087–2095, 2006. ISSN: 03064522, DOI: 10.1016/j.neuroscience.2006.05.048.

CEVIKBAS, F. et al. **Synergistic antipruritic effects of GABA-A and GABA-B agonists in a mouse model of atopic dermatitis.** [s.l.], v. 140, n° 2, p. 454–464, 2018. DOI: 10.1016/j.jaci.2017.02.001.Synergistic.

CHEN, K. S. et al. **Baclofen toxicity in patients with severely impaired renal function.** *Annals of Pharmacotherapy*, [s.l.], v. 31, n° 11, p. 1315–1320, 1997. ISSN: 10600280, DOI: 10.1177/106002809703101108.

COUSINS, M. S.; ROBERTS, D. C. S.; WIT, H. De. **GABAB receptor agonists for the treatment of drug addiction: A review of recent findings.** *Drug and Alcohol Dependence*, [s.l.], v. 65, n° 3, p. 209–220, 2002. ISSN: 03768716, DOI: 10.1016/S0376-8716(01)00163-6.

CROWLEY, T. et al. **Inhibiting neuroinflammation: The role and therapeutic potential of GABA in neuro-immune interactions.** *Brain, Behavior, and Immunity*,

[s.l.], v. 54, p. 260–277, 2016. ISSN: 10902139, DOI: 10.1016/j.bbi.2016.02.001.

CRYAN, J. F.; KAUPMANN, K. **Don't worry "B" happy!: A role for GABA B receptors in anxiety and depression.** *Trends in Pharmacological Sciences*, [s.l.], v. 26, n° 1, p. 36–43, 2005. ISSN: 01656147, DOI: 10.1016/j.tips.2004.11.004.

DAVIDOVICI, B. B. et al. **Psoriasis and systemic inflammatory diseases: Potential mechanistic links between skin disease and co-morbid conditions.** *Journal of Investigative Dermatology*, [s.l.], v. 130, n° 7, p. 1785–1796, 2010. ISSN: 0022202X, DOI: 10.1038/jid.2010.103.

DENNING, M. F. **Epidermal keratinocytes: Regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase C isoforms.** *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, [s.l.], v. 36, n° 7, p. 1141–1146, 2004. ISSN: 13572725, DOI: 10.1016/j.biocel.2003.12.004.

DOMAGALA, A.; SZEPIETOWSKI, J.; REICH, A. **Antihistamines in the treatment of pruritus in psoriasis.** *Postepy Dermatologii i Alergologii*, [s.l.], v. 34, n° 5, p. 457–463, 2017. ISSN: 1642395X, DOI: 10.5114/ada.2017.71112.

DUARTE, I.; BUENSE, R.; KOBATA, C. **Fototerapia.** *AB Bras Dermatol.*, [s.l.], v. 81, n° 1, p. 74–82, 2006.

DUTHEY, B. et al. **Anti-inflammatory effects of the GABAB receptor agonist baclofen in allergic contact dermatitis.** *Experimental Dermatology*, [s.l.], v. 19, n° 7, p. 661–666, 2010. ISBN: 4969630151, ISSN: 09066705, DOI: 10.1111/j.1600-0625.2010.01076.x.

ELDER, J. T.; KANSRA, S.; STOLL, S. W. **Autocrine regulation of keratinocyte proliferation.** *Journal of Clinical Ligand Assay*, [s.l.], v. 27, n° 2, p. 137–142, 2004. ISSN: 10811672.

ERTZGAARD, P.; CAMPO, C.; CALABRESE, A. **Efficacy and safety of oral baclofen in the management of spasticity: A rationale for intrathecal baclofen.** *Journal of Rehabilitation Medicine*, [s.l.], v. 49, n° 3, p. 193–203, 2017. ISSN: 16501977, DOI: 10.2340/16501977-2211.

GÁBOR, M. **Models of acute inflammation in the ear.** *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, [s.l.], v. 225, p. 129–137, 2003. ISSN: 10643745, DOI: 10.1385/1-59259-374-7:129.

GHORESCHI, K.; WEIGERT, C.; RÖCKEN, M. **Immunopathogenesis and role of T cells in psoriasis.** *Clinics in Dermatology*, [s.l.], v. 25, n° 6, p. 574–580, 2007. ISSN: 0738081X, DOI: 10.1016/j.clindermatol.2007.08.012.

GONCHOROSKI, D. D.; CÔRREA, G. M. **Tratamento de hiper Cromia pós-inflamatória com diferentes formulações clareadoras.** *Infarma*, [s.l.], v. 17, p. 84–88, 2005.

GROZDEV, I.; KORMAN, N.; TSANKOV, N. **Psoriasis as a systemic disease.**

Clinics in Dermatology, [s.l.], v. 32, n° 3, p. 343–350, 2014. ISSN: 18791131, DOI: 10.1016/j.clindermatol.2013.11.001.

GURTNER, G. C. et al. **Wound repair and regeneration**. *Nature*, [s.l.], v. 453, n° 7193, p. 314–321, 2008. ISSN: 14764687, DOI: 10.1038/nature07039.

GUTTMAN-YASSKY, E.; KRUEGER, J. G. **Atopic dermatitis and psoriasis: two different immune diseases or one spectrum?** *Current Opinion in Immunology*, [s.l.], v. 48, p. 68–73, 2017. ISSN: 18790372, DOI: 10.1016/j.coi.2017.08.008.

HANACK, C. et al. **GABA blocks pathological but not acute TRPV1 pain signals**. *Cell*, [s.l.], v. 160, n° 4, p. 759–770, 2015. ISSN: 10974172, DOI: 10.1016/j.cell.2015.01.022.

HEETLA, H. W. et al. **Clinical relevance of pharmacological and physiological data in intrathecal baclofen therapy**. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, [s.l.], v. 95, n° 11, p. 2199–2206, 2014. ISSN: 1532821X, DOI: 10.1016/j.apmr.2014.04.030.

HIERONYMUS, T. et al. **The clash of Langerhans cell homeostasis in skin: Should I stay or should I go?** *Seminars in Cell and Developmental Biology*, [s.l.], v. 41, p. 30–38, 2015. ISBN: 2418082008, ISSN: 10963634, DOI: 10.1016/j.semcdb.2014.02.009.

HOHJOH, H. et al. **Biochimie Prostanoid receptors and acute inflammation in skin**. [s.l.], p. 8–11, 2014. DOI: 10.1016/j.biochi.2014.08.010.

HUANG, S. et al. **The anti-spasticity drug baclofen alleviates collagen-induced arthritis and regulates dendritic cells**. *Journal of Cellular Physiology*, [s.l.], v. 230, n° 7, p. 1438–1447, 2015. ISBN: 1340190060, ISSN: 10974652, DOI: 10.1002/jcp.24884.

HUANG, T. H. et al. **Apoptotic or antiproliferative activity of natural products against keratinocytes for the treatment of psoriasis**. *International Journal of Molecular Sciences*, [s.l.], v. 20, n° 10, 2019. ISSN: 14220067, DOI: 10.3390/ijms20102558.

HWA, C.; BAUER, E. A.; COHEN, D. E. **Skin biology**. *Dermatologic Therapy*, [s.l.], v. 24, n° 5, p. 464–470, 2011. ISSN: 13960296, DOI: 10.1111/j.1529-8019.2012.01460.x.

JEFFES, E. W. B. et al. **Methotrexate therapy of psoriasis: Differential sensitivity of proliferating lymphoid and epithelial cells to the cytotoxic and growth-inhibitory effects of methotrexate**. *Journal of Investigative Dermatology*, [s.l.], v. 104, n° 2, p. 183–188, 1995. ISSN: 0022202X, DOI: 10.1111/1523-1747.ep12612745.

KADYK, D. L. et al. **Quality of life in patients with allergic contact dermatitis**. *Journal of the American Academy of Dermatology*, [s.l.], v. 49, n° 6, p. 1037–1048, 2003. ISSN: 01909622, DOI: 10.1016/S0190-9622(03)02112-1.

KANG, M. S.; HYUN, K. Y. **Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Nypa fruticans* wurbm by suppressing TRPV1 in the sciatic neuropathies.** *Nutrients*, [s.l.], v. 12, n° 1, p. 1–11, 2020. ISBN: 8251890268, ISSN: 20726643, DOI: 10.3390/nu12010135.

KAUR, A.; KUMAR, S. **Plants and plant products with potential antipsoriatic activity - A review.** *Pharmaceutical Biology*, [s.l.], v. 50, n° 12, p. 1573–1591, 2012. ISSN: 13880209, DOI: 10.3109/13880209.2012.690430.

KIM, H. J.; LEBWOHL, M. G. **Biologics and Psoriasis: The Beat Goes On.** *Dermatologic Clinics*, [s.l.], v. 37, n° 1, p. 29–36, 2019. ISSN: 15580520, DOI: 10.1016/j.det.2018.07.004.

KIM, M. S. et al. **Mast cell stabilizer, ketotifen, prevents UV-induced wrinkle formation.** *Journal of Investigative Dermatology*, [s.l.], v. 133, n° 4, p. 1104–1107, 2013. ISSN: 15231747, DOI: 10.1038/jid.2012.424.

KONERMANN, A. et al. **GABABReceptors as Modulating Target for Inflammatory Responses of the Periodontal Ligament.** *Cellular and Molecular Neurobiology*, [s.l.], v. 37, n° 6, p. 1067–1076, 2017. ISSN: 15736830, DOI: 10.1007/s10571-016-0439-z.

KOPSKY, D. J.; KEPPEL HESSELINK, J. M. **Neuropathic pain as a result of acromegaly, treated with topical baclofen Cream.** *Journal of Pain and Symptom Management*, [s.l.], v. 46, n° 4, p. e4–e5, 2013. ISSN: 08853924, DOI: 10.1016/j.jpainsymman.2013.07.011.

KRUEGER, J. G.; BOWCOCK, A. **Psoriasis pathophysiology: Current concepts of pathogenesis.** *Annals of the Rheumatic Diseases*, [s.l.], v. 64, n° SUPPL. 2, p. 30–37, 2005. ISSN: 00034967, DOI: 10.1136/ard.2004.031120.

KUNER, R. et al. **Role of Heteromer Formation in GABAB Receptor Function.** [s.l.], v. 283, n° January, p. 74–77, 1999.

LAI-CHEONG, J. E.; MCGRATH, J. A. **Structure and function of skin, hair and nails.** *Medicine (United Kingdom)*, [s.l.], v. 41, n° 6, p. 317–320, 2013. ISSN: 13654357, DOI: 10.1016/j.mpmed.2013.04.017.

LAM, J.; POLIFKA, J. E.; DOHIL, M. A. **Safety of dermatologic drugs used in pregnant patients with psoriasis and other inflammatory skin diseases.** *Journal of the American Academy of Dermatology*, [s.l.], v. 59, n° 2, p. 295–315, 2008. ISSN: 01909622, DOI: 10.1016/j.jaad.2008.03.018.

LEISEN, C. et al. **Lipophilicities of baclofen ester prodrugs correlate with affinities to the ATP-dependent efflux pump P-glycoprotein: Relevance for their permeation across the blood-brain barrier?** *Pharmaceutical Research*, [s.l.], v. 20, n° 5, p. 772–778, 2003. ISSN: 07248741, DOI: 10.1023/A:1023437603555.

LEUNG, D. Y. M. **Pathogenesis of atopic dermatitis.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, [s.l.], v. 104, n° 3 SUPPL., p. 99–108, 1999. ISSN: 00916749, DOI:

10.1016/S0091-6749(99)70051-5.

LEUNG, D. Y. M. et al. **Science in medicine New insights into atopic dermatitis.** *J Clin Invest.*, [s.l.], v. 113, n° 5, p. 651–657, 2004. DOI: 10.1172/JCI200421060.

LIN, J. Y.; FISHER, D. E. **Melanocyte biology and skin pigmentation.** [s.l.], v. 445, n° February, p. 843–850, 2007. DOI: 10.1038/nature05660.

LOWES, M. A.; BOWCOCK, A. M.; KRUEGER, J. G. **Pathogenesis and therapy of psoriasis.** *Nature*, [s.l.], v. 445, n° 7130, p. 866–873, 2007. ISSN: 14764687, DOI: 10.1038/nature05663.

LOWES, M. A.; SUÁREZ-FARIÑAS, M.; KRUEGER, J. G. **Immunology of Psoriasis.** *Annual Review of Immunology*, [s.l.], v. 32, n° 1, p. 227–255, 2014. ISSN: 0732-0582, DOI: 10.1146/annurev-immunol-032713-120225.

MACLEOD, A. S.; MANSBRIDGE, J. N. **The Innate Immune System in Acute and Chronic Wounds.** *Advances in Wound Care*, [s.l.], v. 5, n° 2, p. 65–78, 2016. ISSN: 21621934, DOI: 10.1089/wound.2014.0608.

MAGNAGHI, V. et al. **Nerve regenerative effects of GABA-B ligands in a model of neuropathic pain.** *BioMed Research International*, [s.l.], v. 2014, 2014. ISSN: 23146141, DOI: 10.1155/2014/368678.

MASOTTI, T.; FORTES, L.; SUFFREDINI, I. B. **Avaliação de pele em idoso: revisão da literatura Skin evaluation in elderly: literature review.** *J Health Sci Inst*, [s.l.], v. 32, n° 1, p. 94–101, 2014.

MCGRATH, J. A.; UITTO, J. **Anatomy and Organization of Human Skin.** *Rook's Textbook of Dermatology: Eighth Edition*, [s.l.], v. 1, p. 34–86, 2010. ISBN: 9781405161695, DOI: 10.1002/9781444317633.ch3.

MCKAY, I. A.; LEIGH, I. M. **Altered keratinocyte growth and differentiation in psoriasis.** *Clinics in Dermatology*, [s.l.], v. 13, n° 2, p. 105–114, 1995. ISSN: 0738081X, DOI: 10.1016/0738-081X(95)93817-8.

MENON, G. K. **New insights into skin structure: Scratching the surface.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, [s.l.], v. 54, n° SUPPL., p. S3, 2002. ISSN: 0169409X, DOI: 10.1016/S0169-409X(02)00121-7.

MORAN, J. M.; ENNA, S. J.; MCCARSON, K. E. **Developmental regulation of GABA B receptor function in rat spinal cord.** *Life Sciences*, [s.l.], v. 68, n° 19–20, p. 2287–2295, 2001. ISSN: 00243205, DOI: 10.1016/S0024-3205(01)01017-7.

MURAKAWA, M. et al. **Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- α in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice.** *Biochemical Pharmacology*, [s.l.], v. 71, n° 9, p. 1331–1336, 2006. ISSN: 00062952, DOI: 10.1016/j.bcp.2006.01.005.

NG, K. W. and W. M. L. **Skin Deep : The Basics of Human Skin Structure and Drug Penetration Skin Deep : The Basics of Human Skin Structure and Drug**

Penetration *. [s.l.], n° January, p. 0–12, 2015. ISBN: 9783662450130, DOI: 10.1007/978-3-662-45013-0.

NGUYEN, A. V.; SOULIKA, A. M. **The dynamics of the skin's immune system.** *International Journal of Molecular Sciences*, [s.l.], v. 20, n° 8, p. 1–53, 2019. ISSN: 14220067, DOI: 10.3390/ijms20081811.

NYIRJESY, P. et al. **Topical amitriptyline-baclofen cream for the treatment of provoked vestibulodynia.** *Journal of Lower Genital Tract Disease*, [s.l.], v. 13, n° 4, p. 230–236, 2009. ISSN: 10892591, DOI: 10.1097/LGT.0b013e31819663ee.

OLÁH, A.; SZOLLOSI, A. G.; BÍRÓ, T. **The Channel Physiology of the Skin.** *Review in physiological Biochemistry Pharmacology*, [s.l.], v. 159, n° April, p. 1–77, 2012. ISBN: 978-3-540-73800-8, ISSN: 0303-4240, DOI: 10.1007/112.

ONG, P. Y. et al. **Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis.** *New England Journal of Medicine*, [s.l.], v. 347, n° 15, p. 1151–1160, 2002. ISSN: 00284793, DOI: 10.1056/NEJMoa021481.

PATEL, S. et al. **The effects of GABAB agonists and gabapentin on mechanical hyperalgesia in models of neuropathic and inflammatory pain in the rat.** *Pain*, [s.l.], v. 90, n° 3, p. 217–226, 2001. ISSN: 03043959, DOI: 10.1016/S0304-3959(00)00404-8.

PEISER, M. et al. **Allergic contact dermatitis: Epidemiology, molecular mechanisms, in vitro methods and regulatory aspects.** *Cellular and Molecular Life Sciences*, [s.l.], v. 69, n° 5, p. 763–781, 2012. ISSN: 1420682X, DOI: 10.1007/s00018-011-0846-8.

PEISER, Matthias. **Role of Th17 cells in skin inflammation of allergic contact dermatitis.** *Clinical and Developmental Immunology*, [s.l.], v. 2013, n° type IV, 2013. ISSN: 17402522, DOI: 10.1155/2013/261037.

PELC, J.; CZARNECKA-OPERACZ, M.; ADAMSKI, Z. **Structure and function of the epidermal barrier in patients with atopic dermatitis - Treatment options. Part one.** *Postepy Dermatologii i Alergologii*, [s.l.], v. 35, n° 1, p. 1–5, 2018. ISSN: 1642395X, DOI: 10.5114/ada.2018.73159.

PERFILOVA, V. N.; TYURENKOV, I. N. **GABAC Receptors: Structure and functions.** *Ekspierimental'naya i Klinicheskaya Farmakologiya*, [s.l.], v. 74, n° 1, p. 45–49, 2011. ISBN: 0444521844, ISSN: 08692092, DOI: 10.1016/S0079-6123(06)60004-6.

PINARD, A.; SEDDIK, R.; BETTLER, B. **GABA B receptors. Physiological functions and mechanisms of diversity.** *Advances in Pharmacology*. First ed. [s.l.]: Elsevier Inc., 2010. v. 58, 231–255 p. ISSN: 10543589, DOI: 10.1016/S1054-3589(10)58010-4.

RADHAKRISHNAN, H. **of Kidney Diseases and Transplantation Case Report Acute Renal Failure in a Patient with Acute Lymphoblastic Leukemia : Saudi**

journal of kidney disease and transplantation, [s.l.], v. 24, n° 1, p. 93–96, 2016.

SANCHEZ-PONCE, R. et al. **Metabolic and pharmacokinetic differentiation of STX209 and racemic baclofen in humans.** *Metabolites*, [s.l.], v. 2, n° 3, p. 596–613, 2012. ISSN: 22181989, DOI: 10.3390/metabo2030596.

SCANDOLERA, A. et al. **GABA and GABA-alanine from the red microalgae *rhodorus marinus* exhibit a significant neuro-soothing activity through inhibition of neuro-inflammation mediators and positive regulation of TRPV1-related skin sensitization.** *Marine Drugs*, [s.l.], v. 16, n° 3, 2018. ISSN: 16603397, DOI: 10.3390/md16030096.

SCHÄCKE, H.; DÖCKE, W.-D.; ASADULLAH, K. **Mechanisms involved in the side effects of gl... [Pharmacol Ther. 2002] - PubMed - NCBI.** *Pharmacology & Therapeutics*, [s.l.], v. 96, p. 23–43, 2002. ISBN: 01637258/02, ISSN: 0163-7258, DOI: 10.1016/S0163-7258(02)00297-8.

SEELIGER, S. et al. **Proinflammatory role of proteinase-activated receptor-2 in humans and mice during cutaneous inflammation in vivo.** *The FASEB Journal*, [s.l.], v. 17, n° 13, p. 1871–1885, 2003. ISSN: 0892-6638, DOI: 10.1096/fj.02-1112com.

SIDBURY, R. et al. **GUIDELINES OF CARE FOR THE MANAGEMENT OF ATOPIC DERMATITIS: Part 3: Management and Treatment with Phototherapy and Systemic Agents.** *Journal of the American Academy of Dermatology*, [s.l.], v. 70, n° 2, p. 338–51, 2014. ISBN: 0190-9622, ISSN: 1097-6787, DOI: 10.1016/j.jaad.2013.10.010.

SINDRILARU, A. et al. **An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice.** *Journal of Clinical Investigation*, [s.l.], v. 121, n° 3, p. 985–997, 2011. ISSN: 00219738, DOI: 10.1172/JCI44490.

SKINNER, R. **Role of topical therapies in the management of cutaneous disease.** *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, [s.l.], v. 8, n° SUPPL. 3, p. 22–31, 2004. ISSN: 12034754, DOI: 10.1007/s10227-004-0805-1.

SONG, M.; PARK, H. J. **Anti-inflammatory effect of *Phellinus linteus* grown on germinated brown rice on dextran sodium sulfate-induced acute colitis in mice and LPS-activated macrophages.** *Journal of Ethnopharmacology*, [s.l.], v. 154, n° 2, p. 311–318, 2014. ISSN: 18727573, DOI: 10.1016/j.jep.2013.12.059.

SOONTHORNCHAI, W. et al. **Down-regulation of miR-155 after treatment with narrow-band UVB and methotrexate associates with apoptosis of keratinocytes in psoriasis.** *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, [s.l.], 2020. ISSN: 0125877X, DOI: 10.12932/ap-031218-0451.

SRIVASTAVA, S. et al. **Acute onset rhythmic hiccup-like respirations secondary to oral baclofen toxicity.** *Pediatric Neurology*, [s.l.], v. 51, n° 2, p. 252–254, 2014. ISSN: 18735150, DOI: 10.1016/j.pediatrneurol.2014.03.015.

SUN, L.; ZHANG, X. **The immunological and genetic aspects in psoriasis.** *Applied Informatics*, [s.l.], v. 1, n° 1, p. 1–21, 2014. ISSN: 2196-0089, DOI: 10.1186/s40535-014-0003-1.

SVENSSON, L.; RØPKE, M. A.; NORSGAARD, H. **Psoriasis drug discovery: Methods for evaluation of potential drug candidates.** *Expert Opinion on Drug Discovery*, [s.l.], v. 7, n° 1, p. 49–61, 2012. ISSN: 17460441, DOI: 10.1517/17460441.2011.632629.

TALAGAS, M.; MISERY, L. **Role of Keratinocytes in Sensitive Skin.** *Frontiers in Medicine*, [s.l.], v. 6, n° May, p. 1–7, 2019. ISSN: 2296-858X, DOI: 10.3389/fmed.2019.00108.

TU, C. L. et al. **The role of the calcium-sensing receptor in epidermal differentiation.** *Cell Calcium*, [s.l.], v. 35, n° 3, p. 265–273, 2004. ISSN: 01434160, DOI: 10.1016/j.ceca.2003.10.019.

VEIROS, I.; MARTINS, L.; MARTINS, F. **O baclofeno intratecal no tratamento da espasticidade.** [s.l.], 2005.

VERDIER-SÉVRAIN, S.; BONTÉ, F. **Skin hydration: A review on its molecular mechanisms.** *Journal of Cosmetic Dermatology*, [s.l.], v. 6, n° 2, p. 75–82, 2007. ISSN: 14732130, DOI: 10.1111/j.1473-2165.2007.00300.x.

VIENNE, J. et al. **Differential effects of GABAB receptor subtypes, γ -hydroxybutyric acid, and baclofen on EEG activity and sleep regulation.** *Journal of Neuroscience*, [s.l.], v. 30, n° 42, p. 14194–14204, 2010. ISSN: 02706474, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3145-10.2010.

WANG, Y. Y. et al. **GABA regulates the proliferation and apoptosis of MAC-T cells through the LPS-induced TLR4 signaling pathway.** *Research in Veterinary Science*, [s.l.], v. 118, n° April, p. 395–402, 2018. ISSN: 15322661, DOI: 10.1016/j.rvsc.2018.04.004.

WASSEF, A.; BAKER, J.; KOCHAN, L. D. **GABA and Schizophrenia: A Review of Basic Science and Clinical Studies.** *Journal of Clinical Psychopharmacology*, [s.l.], v. 23, n° 6, p. 601–640, 2003. ISSN: 02710749, DOI: 10.1097/01.jcp.0000095349.32154.a5.

WHITEHEAD, R. A. et al. **GABA B receptor-mediated selective peripheral analgesia by the non-proteinogenic amino acid, isovaline.** *Neuroscience*, [s.l.], v. 213, p. 154–160, 2012. ISSN: 03064522, DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.04.026.

WILLIAMS, I. R.; KUPPER, T. S. **1996 WilliamsImmunity at the surface homeostatic.** [s.l.], v. 58, n° 18, p. 1–23, 2003.

WU, V. C. et al. **Treatment of baclofen overdose by haemodialysis: A pharmacokinetic study.** *Nephrology Dialysis Transplantation*, [s.l.], v. 20, n° 2, p. 441–443, 2005. ISSN: 09310509, DOI: 10.1093/ndt/gfh297.

WUIS, E. W. et al. **Plasma and urinary excretion kinetics of oral baclofen in healthy subjects.** *European Journal of Clinical Pharmacology*, [s.l.], v. 37, n° 2, p. 181–184, 1989. ISSN: 00316970, DOI: 10.1007/BF00558228.

XU, C. et al. **Complex GABA B receptor complexes : how to generate multiple functionally distinct units from a single receptor.** [s.l.], v. 5, n° February, p. 1–8, 2014. DOI: 10.3389/fphar.2014.00012.