

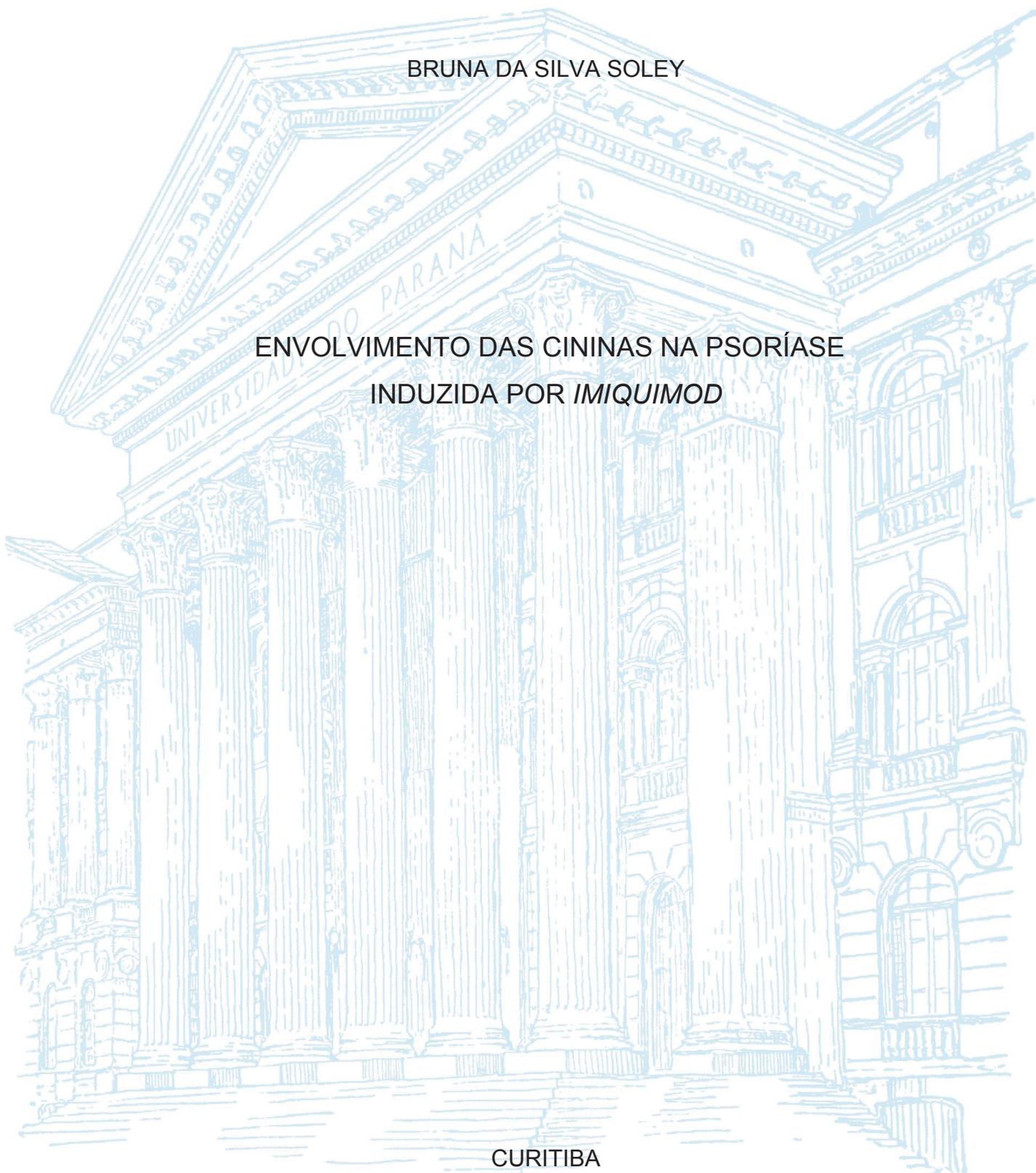
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNA DA SILVA SOLEY

ENVOLVIMENTO DAS CININAS NA PSORÍASE
INDUZIDA POR *IMIQUIMOD*

CURITIBA

2019



BRUNA DA SILVA SOLEY

ENVOLVIMENTO DAS CININAS NA PSORÍASE
INDUZIDA POR *IMIQUIMOD*

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

Orientador: Prof^a. Dr^a. Daniela de Almeida Cabrini

Coorientador: Prof. Dr. Michel Fleith Otuki

CURITIBA

2019

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

Soley, Bruna da Silva
Envolvimento das cininas na psoríase induzida por *imiquimod*. / Bruna da Silva Soley. – Curitiba, 2019.
150 p.: il.

Orientadora: Daniela de Almeida Cabrini
Coorientadora: Michel Fleith Otuki

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

1. Cininas 2. Psoríase I. Título II. Cabrini, Daniela de Almeida, 1970- III. Otuki, Michel Fleith IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (22. ed.) 616.526



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 tese de Doutorado de **BRUNA DA SILVA SOLEY** intitulada: **Envolvimento das cininas na psoríase induzida por imiquimod**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor 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, 05 de Julho de 2019.

MARIA FERNANDA DE PAULA WERNER
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

ADRIANA FROHLICH MERCADANTE
Avaliador Externo (UFPR)

LUIZ FERNANDO FREIRE ROYES
Avaliador Externo (UFSM)

JOICE MARIA DA CUNHA
Avaliador Interno (UFPR)

À quem devo tudo.... Minha mãe, Vera Lúcia. Agradeço por estar sempre ao meu lado, pelos sacrifícios, incentivo, compreensão e amor. Obrigada por sempre acreditar em mim, te amo muito! Você é a razão de tudo....

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Daniela de Almeida Cabrini e Michel Fleith Otuki, por todo ensinamento, auxílio, compreensão e paciência Obrigada por sempre contribuírem de maneira direta na minha formação acadêmica e pessoal, pelas diversas oportunidades e por acreditarem no meu trabalho ao longo desses anos.

Aos amigos de laboratório, Priscila Pawloski, Margareth Brandenburg, Fernanda Grillo, Angélica Araújo Hillman, Thalita de Paula e Ana Clara Sans Salomão.... Muito obrigada por todo o apoio, pelos ensinamentos e pela possibilidade de compartilhar com vocês, diariamente, diversos momentos especiais ao longo desses anos.

Ao Prof. Dr. João Bosco Pesquero por disponibilizar os animais utilizados no desenvolvimento do trabalho.

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

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

À Sanofi-Aventis (Alemanha) e à Astellas Pharma Inc. (Japão) pelo fornecimento dos antagonistas SSR 240612 e FR 173657, respectivamente.

À CAPES, CNPq e INCT-INOVAMED pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse projeto....
Muito obrigada!

“O insucesso é apenas uma oportunidade para
recomeçar com mais inteligência”

Henry Ford

RESUMO

As cininas são peptídeos vasoativos associados a uma ampla gama de efeitos fisiológicos e fisiopatológicos, sendo seus efeitos atribuídos à ativação de receptores específicos denominados B₁ e B₂. Estudos mostraram que os constituintes do sistema de cininas são constitutivamente expressos na pele, assim como, receptores e níveis de cininas são regulados positivamente durante distúrbios cutâneos. Contudo, apesar das evidências, o papel das cininas nas doenças inflamatórias da pele é pouco compreendido. Nosso grupo já demonstrou que os receptores cininérgicos estão envolvidos no controle do processo hiperproliferativo de queratinócitos. No entanto, não está claro como as cininas modulam os parâmetros inflamatórios observados na psoríase. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a relevância das cininas no desenvolvimento e progressão da psoríase. Para alcançar os objetivos propostos, camundongos C57BL/6 *wild type* (WT) e nocautes para os receptores das cininas (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂) foram submetidos ao modelo de inflamação crônica tipo psoriática induzida por *Imiquimod* (IMQ). Adicionalmente, animais C57BL/6 WT foram tratados com antagonistas seletivos não-peptídicos para os receptores de cininas (SSR240612C ou FR173657) ou Captopril (inibidor da cininase II, ECA). Os resultados obtidos mostraram que ambos os receptores cininérgicos (B₁ e B₂) estão presentes constitutivamente na pele de camundongos, assim como, é observado o aumento significativo destes receptores após 6 dias de tratamento com IMQ. Além disso, foi observado que o silenciamento dos receptores B₁ e B₂, pelo nocaute do gene, promoveu melhora das características morfológicas e histológicas da psoríase induzida por IMQ, quando comparados ao grupo WT. Esse efeito protetor foi associado à reduções significativas no número de queratinócitos indiferenciados e em proliferação, menor celularidade dérmica (menor infiltrado de neutrófilos, macrófagos e linfócitos T CD4⁺), além de menor acúmulo de IL-17 nas lesões psoriáticas. Além disso, o silenciamento do receptor B₂, mas não do receptor B₁, reduziu o infiltrado de células T CD8⁺ na pele psoriática. Adicionalmente, a ausência dos receptores cininérgicos promoveu efeito protetor ao prevenir o aumento do peso de órgãos linfóides (baço, linfonodos inguinais e axilares), efeito sistêmico induzido pela aplicação tópica de IMQ. Corroborando estes achados, animais tratados com o antagonista do receptor B₁ (SSR240612C) ou com o antagonista do receptor B₂ (FR173657) das cininas apresentaram resultados semelhantes aos observados com animais nocautes no modelo de psoríase experimental induzido por IMQ. Em contraste, animais que receberam Captopril, ao longo do protocolo experimental, apresentaram exacerbação do processo psoriático induzido por IMQ. Sendo observado aumento da hiperplasia epidermal (com mais queratinócitos hiperproliferativos e indiferenciados), aumento do influxo de células inflamatórias (maior infiltrado de neutrófilos e macrófagos), além de acentuado acúmulo de IL-17, quando comparado ao grupo veículo (salina + IMQ). Alterações similares foram observadas na avaliação de efeitos sistêmicos induzidos por IMQ, onde Captopril (100 mg/Kg) intensificou o aumento do peso do linfonodo axilar. Por fim, foi verificado que a melhora do processo inflamatório tipo psoriático, decorrente do nocaute e bloqueio dos receptores de cininas, refletiu-se no comportamento de bem-estar dos camundongos. Em contrapartida, Captopril promoveu a piora do quadro psoriático e, conseqüente, redução do bem-estar animal. Assim, os dados obtidos reforçam o envolvimento do sistema de cininas na psoríase, sugerindo

participação de ambos os receptores cininérgicos na exacerbação do processo inflamatório crônico. Adicionalmente, os resultados sugerem que os receptores B₁ e B₂ podem constituir alvos terapêuticos potencialmente relevantes para o tratamento da psoríase.

Palavras-chave: Cininas, Psoríase, Receptores Cininérgicos, Receptor B₁, Receptor B₂.

ABSTRACT

Kinins are vasoactive peptides associated with a wide range of physiological and pathophysiological effects, and their effects are attributed to the activation of specific receptors called B₁ and B₂. Studies have shown that all kinin system constituents are constitutively expressed in the skin, as well as, receptors and kinins levels are upregulated during cutaneous disorders. However, despite the evidence, the role of kinins in inflammatory skin diseases is poorly understood. Our group has already demonstrated that kinin receptors are involved in the control of the keratinocyte hyperproliferative. However, it is unclear how the kinins modulate the inflammatory parameters observed in psoriasis. Thus, the present study aimed to evaluate the relevance of kinins in the development and progression of psoriasis. To achieve the proposed objectives, C57BL/6 wild type (WT) and kinin receptors knockout (KOB₁, KOB₂ and KOB₁B₂) mice were subjected to the Imiquimod (IMQ)-induced mouse model of psoriasis. In addition, C57BL/6 WT animals were treated with selective non-peptidic antagonists for kinin receptors (SSR240612C or FR173657) or Captopril (kininase II inhibitor, ACE). The results showed that both kinin receptors (B₁ and B₂) are constitutively present in the mice skin, as well as a significant increase of these receptors is observed after 6 days of IMQ treatment. In addition, was observed that lack of B₁ and B₂ receptors, by gene knockout, promoted improvement in the morphological and histological hallmark symptoms of psoriasis induced by IMQ, when compared to the WT group. This protective effect was associated with significant reductions in the number of undifferentiated and proliferating keratinocytes, lower dermal cellularity (reduction of neutrophil, macrophages and CD4⁺ T lymphocytes infiltrate), and lower IL-17 accumulation in psoriatic lesions. In addition, the absence of B₂ receptors, but not the B₁ receptor, reduced the CD8⁺ T cell infiltrate in the psoriatic skin. Additionally, the absence of the kininergic receptors promoted a protective effect by preventing the lymphoid organs weight increase (spleen, inguinal and axillary lymph nodes), systemic effect induced by IMQ. Corroborating these findings, animals treated with the B₁ receptor antagonist (SSR240612C) or the B₂ receptor antagonist (FR173657) showed similar results to those observed with knockout animals in the experimental IMQ-induced psoriasis model. In contrast, animals treated with Captopril, throughout the experimental protocol, had exacerbation of the psoriatic process IMQ- induced. The results showed increase in epidermal hyperplasia (large hyperproliferative and undifferentiated keratinocytes), inflammatory cells influx (large neutrophil and macrophages infiltration) and high IL-17 accumulation, relative to the vehicle group (saline + IMQ). Similarly, Captopril (100 mg/Kg) intensified the axillary lymph node enlargement IMQ-induced. Finally, was verified that the improvement of the psoriatic process, due to the kinin receptor knockout and blockade, was reflected in the well-being mice behavior. On the other hand, Captopril promoted worsening of the psoriasis and negative animal welfare impacts. Thus, the data obtained reinforce the involvement of the kinin system in psoriasis, suggesting the participation of both kininergic receptors in the chronic inflammatory process exacerbation. In addition, the results suggest that B₁ and B₂ receptors may be potentially relevant therapeutic targets for the treatment of psoriasis.

Keywords: Kinin, Psoriasis, Kininergic Receptors, Receptor B₁, Receptor B₂.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Representação esquemática da formação das cininas BK e KD e seus metabólitos ativos, des-Arg-BK e des-Arg-KD, assim como, vias de sinalização intracelular desencadeadas a partir da ligação dos receptores cininérgicos (B1 e B2) com seus respectivos agonistas.....23
- FIGURA 2** - Representação esquemática simplificada de mecanismos envolvidos na imunopatogênese da Psoríase.....30
- FIGURA 3** - Representação esquemática do delineamento experimental36
- FIGURA 4** - Representação esquemática dos tratamentos realizados (antagonistas seletivos para os receptores B₁ ou B₂ das cininas ou com Captopril) durante a realização do protocolo experimental estabelecido.....37
- FIGURA 5** - Representação esquemática da avaliação da atividade de nidificação...41
- FIGURA 6** - Análise da presença dos receptores B₁ e B₂ das cininas na pele.....44
- FIGURA 7** - Quantificação da MIF dos receptores B₁ e B₂ das cininas na pele45
- FIGURA 8** - Avaliação da participação dos receptores das cininas no desenvolvimento do processo psoriático induzido por aplicações múltiplas de IMQ.46
- FIGURA 9** - Avaliação da participação do receptor B₁ das cininas na formação e progressão das lesões tipo psoriáticas induzidas por múltiplas aplicações de IMQ.....48
- FIGURA 10** - Avaliação da participação do receptor B₂ das cininas na formação e sustentação do processo inflamatório crônico tipo psoriático induzido por IMQ. ..49
- FIGURA 11** - Fotos representativas da histologia da pele de animais nocautes para os receptores das cininas (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂) e animais WT submetidos ao modelo de inflamação crônica tipo psoriática induzida por IMQ.....51
- FIGURA 12** - Influência do receptor B₁ e B₂ das cininas no infiltrado celular e espessamento epidermal induzida por IMQ.52

FIGURA 13 - Fotos representativas da histologia da pele de animais tratamentos com SSR240612C na psoríase induzida por IMQ.....	53
FIGURA 14 - Efeito do bloqueio farmacológico do receptor B ₁ das cininas no infiltrado celular e na espessura da epiderme de animais submetidos ao modelo de inflamação crônica tipo psoriática induzida por IMQ.....	54
FIGURA 15 - Fotos representativas da histologia da pele de animais que receberam diariamente o tratamento com FR 173657 ao longo do modelo psoríase induzida por IMQ.	56
FIGURA 16 - Efeito do antagonista dos receptores B ₂ das cininas no infiltrado celular e no espessamento da epiderme induzido por IMQ.....	57
FIGURA 17 - Avaliação da hiperproliferação de queratinócitos causada por IMQ em animais nocautes para os receptores das cininas	59
FIGURA 18 - Efeito do antagonista dos receptores B ₁ das cininas na hiperproliferação de queratinócitos induzida por IMQ.....	61
FIGURA 19 - Efeito do antagonista de receptores B ₂ na modulação da proliferação de queratinócitos durante o processo psoriático induzido por IMQ. ..	62
FIGURA 20 - Análise do envolvimento dos receptores das cininas no processo de diferenciação de queratinócitos	64
FIGURA 21 - Influência do receptor B ₁ das cininas na diferenciação de queratinócitos	66
FIGURA 22 - Participação do receptor B ₂ das cininas no processo de diferenciação dos queratinócitos durante o processo inflamatório tipo psoriático induzido por IMQ	67
FIGURA 23 - Fotos representativas de camundongos pré-tratados com Captopril na psoríase induzida por IMQ.	68
FIGURA 24 - Avaliação da influência do tratamento com Captopril no desenvolvimento do processo psoriático induzido por IMQ.....	69
FIGURA 25 - Fotos representativas da histologia da pele de animais WT que receberam o pré-tratamento com Captopril ao longo do protocolo de inflamação crônica tipo psoriática induzida por IMQ.....	71

FIGURA 26 - Influência do tratamento com Captopril no infiltrado celular e na espessura da epiderme de animais WT submetidos ao modelo de inflamação crônica tipo psoriática induzida por IMQ.....	72
FIGURA 27 - Efeito do tratamento com Captopril na taxa de proliferação de queratinócitos induzida por IMQ.....	74
FIGURA 28 - Influência do tratamento com Captopril na taxa de queratinócitos indiferenciados no modelo de psoríase induzida por IMQ.....	76
FIGURA 29 - Imagens representativas de células Ly6G+ na lesão psoriática de animais WT e nocautes para o receptor das cininas submetidos ao modelo de psoríase induzido por IMQ.	78
FIGURA 30 - Participação dos receptores B1 e B2 das cininas no influxo de neutrófilos.....	79
FIGURA 31 - Imagens representativas de células Ly6G+ na lesão psoriática de animais pré-tratados com SSR240612C, FR173657 ou Captopril.	80
FIGURA 32 - Efeito do tratamento com antagonistas das cininas ou Captopril no influxo de neutrófilos.....	81
FIGURA 33 - Fotos representativas de células CD11b+ na lesão psoriática de animais WT e nocautes para o receptor das cininas submetidos ao modelo de psoríase induzido por IMQ.	83
FIGURA 34 - Influência dos receptores B ₁ e B ₂ das cininas no influxo de macrófagos induzido por IMQ.	84
FIGURA 35 - Fotos representas de células CD11b+ na lesão psoriática de animais tratados com SSR240612C, FR173657 ou Captopril.....	85
FIGURA 36 - Efeito dos antagonistas das cininas e do captopril no influxo de macrófagos causado por IMQ... ..	86
FIGURA 37 - Fotos representativas de células CD3+ na lesão psoriática de animais WT e nocautes para o receptor das cininas submetidos ao modelo de psoríase induzido por IMQ	88
FIGURA 38 - Análise da participação dos receptores B ₁ e B ₂ das cininas na migração de linfócitos T.....	89

FIGURA 39 - Fotos representas de células CD3+ na lesão psoriática de animais pré-tratados com SSR240612C, FR173657 ou Captopril.....	90
FIGURA 40 - Efeito do tratamento com antagonistas das cininas ou com Captopril na migração de células T para a lesão psoriática induzida por IMQ.	91
FIGURA 41 - Fotos representas de células CD4+ na lesão psoriática de animais WT e nocautes para o receptor das cininas submetidos ao modelo de psoríase induzido por IMQ	93
FIGURA 42 - Participação dos receptores da cininas (B1R e B2R) na migração de células CD4+ para a lesão psoriática induzida por IMQ.....	94
FIGURA 43 - Imagens representas de células CD4+ na lesão psoriática de animais tratados com SSR240612C, FR173657 ou Captopril.....	95
FIGURA 44 - Participação do sistema das cininas na migração de células T CD4+ para a pele durante o processo psoriático induzido por IMQ.	96
FIGURA 45 - Fotos representativas de células CD8+ presentes na lesão psoriática de animais WT e KOB ₁ , KOB ₂ e KOB ₁ B ₂	98
FIGURA 46 - Participação do receptor B ₂ das cininas na migração de células CD8+ durante o processo psoriático induzido por IMQ.....	99
FIGURA 47 - Imagens representas de células CD8+ na lesão psoriática de animais tratados com SSR240612C, FR173657 ou Captopril.....	100
FIGURA 48 - Efeito dos tratamentos com antagonistas ou Captopril na migração de células T CD8+ induzida por IMQ.....	101
FIGURA 49 - Imagens representativas da detecção de IL-17 na pele psoriática de animais WT e nocautes para os receptores das cininas.	103
FIGURA 50 - Influência dos receptores B ₁ e B ₂ das cininas no acúmulo de IL-17 na pele de animais submetidos ao modelo de psoríase induzida por IMQ.....	104
FIGURA 51 - Imagens representativas de marcações positivas para IL-17 na lesão psoriática de animais tratados com SSR240612C, FR173657 ou Captopril.	105
FIGURA 52 - Influência do tratamento com antagonistas ou Captopril no acúmulo de IL-17 na lesão psoriática induzida por IMQ.	106

FIGURA 53 - Avaliação do peso de órgãos linfóides de animais WT e nocautes para os receptores das cininas (KOB ₁ , KOB ₂ e KOB ₁ B ₂) submetidos ao modelo de psoríase induzida por IMQ... ..	109
FIGURA 54 - Influência do tratamento com antagonistas dos receptores de cininas e com Captopril no peso de órgãos linfóides de animais submetidos ao modelo de inflamação crônica tipo psoriática induzida por IMQ.....	110
FIGURA 55 - Avaliação do bem-estar de animais WT e nocautes para os receptores das cininas submetidos ao modelo de psoríase induzida por IMQ....	112
FIGURA 56 - Efeito do tratamento com antagonistas dos receptores B ₁ e B ₂ das cininas no bem-estar de animais submetidos ao modelo de psoríase induzido por IMQ.....	114
FIGURA 57 - Impacto da tratamento com Captopril no bem-estar de animais submetidos ao modelo de psoríase induzido por IMQ.	115
FIGURA 58 - Esquema demonstrando o envolvimento dos receptores das cininas em diferentes processos que compõem o processo psoriático induzido por IMQ.	136

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALFAC - Solução de álcool, formaldeído e ácido acético glacial;
AMPs - peptídeos antimicrobianos
ANOVA – Análise de variância;
BK – Bradicinina;
BSA – Albumina de soro bovino;
B₁R - Receptor B1 das cininas;
B₂R - Receptor B2 das cininas;
CD - Cluster de diferenciação;
DAB - Diaminobenzidina;
DAG – Diacilglicerol;
DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol;
DMSO- Dimetilsulfóxido;
ECA - Enzima conversora de angiotensina;
E.P.M – Erro padrão da média;
FR173657- antagonista não-peptídicos seletivo para o receptor B₂ das cininas;
GPCRs – Receptor acoplados à proteína G,
H&E – Hematoxilina e Eosina;
HLA - antígeno leucocitário humano;
HMWK - Cininogênio de alto peso molecular;
HOE140 – Antagonista específico do receptor B₂ das cininas;
HTAB – hexadeciltrimetilamônio;
iECA- Inibidores da enzima conversora da angiotensina;
IFN – Interferon;
IL- Interleucina;
IMQ – *Imiquimod*;
IP₃ – Inositoltrifosfato;
i.p. – Administração intraperitoneal;
KD – Calidina;
KO – Nocaute (Do inglês, “*knockout*”)
K14 - citoqueratina 14
LMWK - Cininogênio de baixo peso molecular;
Ly6G – Do inglês, “*Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D*”;

MAPK - proteína quinase ativada por mitógeno;

mDCs - células dendríticas mielóides;

MIF - média da intensidade de fluorescência;

MyD88 – Proteína de diferenciação mielóide 88;

NEP- Endopeptidase neutra;

NETs - (do inglês, “*neutrophil extracellular traps*”);

NF-κB - fator nuclear-κB;

NO - Óxido Nítrico;

PASI - Área de Psoríase e Índice de Gravidade (do inglês, “*Psoriasis Area Severity Index*”);

PBS – Tampão fosfato de sódio;

PCNA - Antígeno nuclear de proliferação celular (do inglês, “*Proliferative Nuclear Cell Antigen*”);

pDC - células dendríticas plasmocitóides;

PKC - Proteína quinase C;

PLA₂ - fosfolipase A2;

PLC- fosfolipase C;

p.o. - administração orofaríngea;

SSR240612C - antagonista não-peptídicos seletivo para o receptor B₁ das cininas;

Th – Linfócito T helper;

TLR - receptores do tipo Toll,

TMB – tetrametilbenzidina;

TNF- Fatores de necrose tumoral;

TPA - 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato;

WT – Do inglês, “*wild type*”;

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Sistema Calicreína – Cininas.....	18
1.2. Sistema das Cininas na pele	24
1.3 Psoríase	26
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS	33
3.1. Objetivos Gerais	33
3.2. Objetivos Específicos	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1. Animais Experimentais	35
4.2. Modelo Animal de Psoríase.....	36
4.3. Avaliação da Severidade da Inflamação Cutânea	38
4.4. Histologia.....	38
4.5. Imunohistoquímica	39
4.6. Detecção de Imunofluorescência	39
4.7. Ensaio de Construção de Ninho (do inglês, “ <i>Nest Building</i> ”).....	40
4.8. Análise Estatística	41
5. RESULTADOS	43
5.1. Avaliação da presença dos receptores B ₁ e B ₂ das cininas na pele de camundongos.....	43
5.2. Avaliação da participação dos receptores das cininas no processo psoriático induzido por IMQ	45
5.3. Influência dos receptores das cininas nas alterações histológicas características da psoríase.....	50

5.4. Análise do efeito do tratamento com Captopril no processo psoriático induzido por IMQ.....	68
5.5. Influência dos receptores B ₁ e B ₂ das cininas no perfil de células inflamatórias presentes nas lesões psoriáticas induzidas por IMQ	77
5.6. Participação do sistema das cininas nas alterações do peso de órgãos linfóides induzida por IMQ	107
5.7. Avaliação do bem-estar de animais submetidos ao modelo de psoríase induzido do IMQ	111
6. DISCUSSÃO	116
7. CONCLUSÃO	134
REFERÊNCIAS	137

1. INTRODUÇÃO

1.1 SISTEMA CALICREÍNA – CININAS.

As cininas são peptídeos vasoativos implicados em uma variedade de processos fisiológicos como, por exemplo, regulação da pressão arterial, contração da musculatura lisa, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, transporte de glicose e estimulação de neurônios sensoriais (Howl e Payne, 2003; Scharfstein, Ramos e Barral-Netto, 2017; Tang, Leung e Lai, 2011). Além disso, alterações neste sistema tem sido correlacionadas com diversos processos patológicos, incluindo o angioedema hereditário (Arcoleo *et al.*, 2018), esclerose múltipla (Dutra *et al.*, 2011), infarto agudo do miocárdio, doença inflamatória intestinal (Marceau e Regoli, 2008), assim como, dor (Costa *et al.*, 2011), infecção (Scharfstein, Ramos e Barral-Netto, 2017), sintomas associados à inflamação aguda e crônica (Calixto *et al.*, 2000; Pietrovski *et al.*, 2011) e ao câncer (Kashuba *et al.*, 2013).

Em humanos, e na maioria dos mamíferos, o termo "Cininas" refere-se, principalmente, à bradicinina (BK: Arg-Pro-Gly-Phe- Ser-Pro-Phe-Arg) e Calidina (KD: Lys- BK), bem como aos seus respectivos metabólitos ativos, des-Arg-Bradiginina e des-Arg-Calidina (Garbacki *et al.*, 2005). A formação desses peptídeos se dá a partir de um sistema complexo e único, o sistema Calicreína-Cinina (Campbell, 2000).

Há duas cascatas, principais, que resultam na formação de cininas, sendo ambas compostas por um sistema proteolítico que atua sobre uma molécula precursora denominada cininogênio (Howl e Payne, 2003). O cininogênio é uma glicoproteína plasmática sintetizada predominantemente no fígado, com ocorrência nas formas de cininogênio de alto peso molecular (HMWK – do inglês, “*high- molecular-weight kininogen*”) e cininogênio de baixo peso molecular (LMWK – do inglês, “*low-molecular-weight kininogen*”) (Blaukat, 2003; Howl e Payne, 2003; Shigematsu *et al.*, 2002). Ambas as formas de cininogênio são codificadas por um único gene, localizado no cromossomo 3, através do processo de *splicing* alternativo (Figura 1) (Yarovaya e Neshkova, 2015). Além das diferenças em estrutura e tamanho, as moléculas de

cininogênio diferem com relação à suscetibilidade à clivagem (Campbell, 2013). A clivagem do cininogênio é realizada por enzimas denominadas calicreínas, serino-proteases identificadas em diversos tecidos, células e fluídos biológicos (Rodell, Naidoo e Bhoola, 1995). Em humanos, foram identificados 2 grupos principais de calicreínas, teciduais e plasmáticas, que diferem principalmente em relação à massa molecular, ponto isoelétrico, especificidade de substrato e, conseqüentemente, tipo de cinina formada (Golias, Ch, Charalabopoulos, Stagikas, D, *et al.*, 2007; Rodell, Naidoo e Bhoola, 1995). Desta forma, a atividade enzimática de calicreínas plasmáticas geram BK a partir do cininogênio HMWK, enquanto as calicreínas teciduais são responsáveis pela formação de KD a partir do cininogênio LMWK (Figura 1) (Howl e Payne, 2003). Além disso, BK pode ser gerada através da remoção de Metionina (Met) e Lisina (Lys) da porção c-terminal de KD, reação mediada por enzimas denominadas aminopeptidases (Campbell, 2001).

Ademais, já foram identificadas vias alternativas de formação de cininas, sendo estas de grande importância por possibilitar a formação destes mediadores inflamatórios de maneira independente de calicreínas (Costa, da *et al.*, 2014; Shigematsu *et al.*, 2002). Um exemplo, é a geração de BK pela atividade de triptases e elastases, provenientes de mastócitos e neutrófilos, respectivamente, sobre moléculas de cininogênio oxidados (resistentes à atividade das calicreínas) (Campbell, 2001). Além disso, em condições inflamatórias, já foi descrita a formação de BK a partir de cininogênio LMW, o qual torna-se suscetível à atividade de calicreínas plasmáticas após sofrer clivagem por serinas denominadas elastases neutrofílicas, proveniente de neutrófilos (Campbell, 2013; Golias, C *et al.*, 2007).

Uma vez liberado, no plasma ou tecido, os efeitos biológicos exercidos pelas cininas duram poucos segundos, uma vez que, em condições fisiológicas, estes peptídeos sofrem rápida inativação por um grupo de peptidases chamadas genericamente de “cininases” (Costa-Neto, Claudio M. *et al.*, 2008). Existem várias enzimas conhecidas por estarem envolvidas na metabolização de cininas, incluindo carboxipeptidases, a enzima conversora da angiotensina (ECA) e a Endopeptidase Neutra (NEP) (Campbell, 2000; Cayla *et al.*, 2002; Costa, da *et al.*, 2014; Golias, Ch, Charalabopoulos, Stagikas, D., *et al.*, 2007).

Carboxipeptidases compõem a família de cininases do tipo I, e estão presentes em duas formas, carboxipeptidase N e carboxipeptidase M, expressas no plasma e em membranas celulares, respectivamente. As cininases do tipo I são enzimas responsáveis pela remoção do aminoácido Arginina (Arg) da porção c-terminal de BK e KD, levando a geração de metabólitos ativos (des-Arg-BK e des-Arg-KD, respectivamente) (Howl e Payne, 2003; Kashuba *et al.*, 2013; Wilhelm, 2003).

Representante das cininases do tipo II, a ECA é uma enzima amplamente distribuída em diversos tecidos e expressa em diferentes tipos celulares, como, por exemplo, células epiteliais, macrófagos, neurônios e linfócitos T (Su, 2006). Responsável por converter angiotensina I em angiotensina II, a ECA também participa da na via de inativação de cininas (Kashuba *et al.*, 2013). Adicionalmente, a degradação de cininas pode ser realizada pela NEP, uma metaloprotease dependente de zinco envolvida na inativação de diversos peptídeos e com ampla distribuição tecidual (Guevara-Lora *et al.*, 2014).

Desta forma, a manutenção dos níveis de cininas é realizado pelo balanço entre o processo de formação e metabolização (Garbacki *et al.*, 2005). O controle da formação das cininas é realizado, principalmente, por inibidores das calicreínas. Dentre os principais inibidores das calicreínas plasmáticas estão a α -2-macroglobulina e a antitrombina III, ambas proteínas plasmáticas que se ligam a porção carboxila da enzima, culminando na inibição da atividade catalítica destas proteases (Costa, da *et al.*, 2014; Matus, Bhoola e Figueroa, 2011; Qadri e Bader, 2018). Semelhantemente, a atividade da calicreína tecidual é modulada por inibidores proteicos, sendo a calistatina a mais conhecida (Garbacki *et al.*, 2005; Maurer *et al.*, 2011).

As cininas exercem seu amplo espectro de efeitos biológicos através da ativação de receptores específicos, membros da superfamília de receptores acoplados à proteína G (GPCRs – do inglês, “*G protein-coupled receptors*”), denominados de B₁ e B₂ (Figura 1) (Blaukat, 2003; Matus, Bhoola e Figueroa, 2011). O receptor B₂ (B₂R) é constitutivamente expresso em uma grande variedade de tecidos e é dessensibilizado após a ligação do ligante, enquanto

o receptor B₁ (B₁R) é expresso em níveis baixos, mas é regulado positivamente durante a inflamação, dor, infecção ou lesão tecidual (Dutra, 2017a). No entanto, alguns tecidos, como a medula espinhal e cérebro, bem como células do sistema imunológico, podem expressar B₁R constitutivamente (Dutra, 2017b; Magerl *et al.*, 2014; Walker, Perkins e Dray, 1995). Além disso, os receptores cininérgicos diferem quanto a seus agonistas, sendo observado que BK e KD ligam-se preferencialmente ao receptor B₂, enquanto des-Arg-BK e des-Arg-KD apresentam alta afinidade pelo receptor B₁ (Figura1) (Blaukat, 2003; Matus, Bhoola e Figueroa, 2011).

A ligação de ambos os receptores cininérgicos com seus respectivos agonistas promove a ativação da fosfolipase C (PLC - do inglês, "*Phospholipase C*"), que por sua vez gera inositoltrifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG) (Figura 1) (Maurer *et al.*, 2011). A geração destes segundos mensageiros levam à mobilização de Ca²⁺ intracelular e ativação da Proteína quinase C (PKC), uma via de sinalização intracelular envolvida no controle de diversas funções celulares (Figura 1) (Costa, da *et al.*, 2014; Couture *et al.*, 2001). O aumento do Ca²⁺ citosólico pode estimular a enzima óxido nítrico sintase (NOS – do inglês, "*Nitric oxide synthase*") para liberar óxido nítrico e promover vasodilatação, por exemplo (Campbell, 2013). Em adição, a ativação da PKC pode resultar na ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK – do inglês "*Mitogen Activated Protein Kinase*") e vias do fator nuclear-κB (NF-κB) (Dutra, 2017). Alternativamente, também pode haver a estimulação da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂), contribuindo para a produção de ácido araquidônico (Figura 1) (Su, 2006).

A ativação do sistema das cininas é um dos primeiros eventos observado em tecidos lesionados ou inflamados (Pesquero e Bader, 2006). Desta forma, as cininas são formadas e acumulam-se nos tecidos, onde estão relacionadas com todos os sintomas da inflamação, como, por exemplo, aumento da permeabilidade vascular, dor e vasodilatação, levando ao inchaço e vermelhidão, bem como facilitando o influxo de células inflamatórias (Calixto *et al.*, 2000; Schulze-Topphoff *et al.*, 2008). Alguns autores sugerem que o receptor B₁ possui um importante papel aumentando ou substituindo as atividades desencadeadas pela ativação do receptor B₂, especialmente,

durante processos inflamatórios crônicos (Calixto *et al.*, 2000; Costa-Neto, Claudio M. *et al.*, 2008; Regoli e Barabe, 1980). Assim, a indução da expressão do receptor B₁ pode ser vista como um mecanismo para a amplificação do efeito tecidual das cininas, uma vez que, este receptor é geralmente expresso nos mesmos tipos celulares em que está presente o receptor B₂, recrutando a mesma via de sinalização e sem sofrer dessensibilização ou internalização (Böckmann e Paegelow, Inge, 2000; Calixto *et al.*, 2000; Maurer *et al.*, 2011). Além disso, sabe-se que o receptor B₂ está associada à indução de mecanismos de transdução responsáveis pelo aumento do número de receptores do subtipo B₁, ao induzir a síntese de IL-1 β , sugerindo a existência de um processo de balanço entre as duas populações de receptores cininérgicos durante desordens inflamatórias ou após a ocorrência de injúrias teciduais (Costa, da *et al.*, 2014; Dutra, 2017b; Walker, Perkins e Dray, 1995; Wilhelm, 2003).

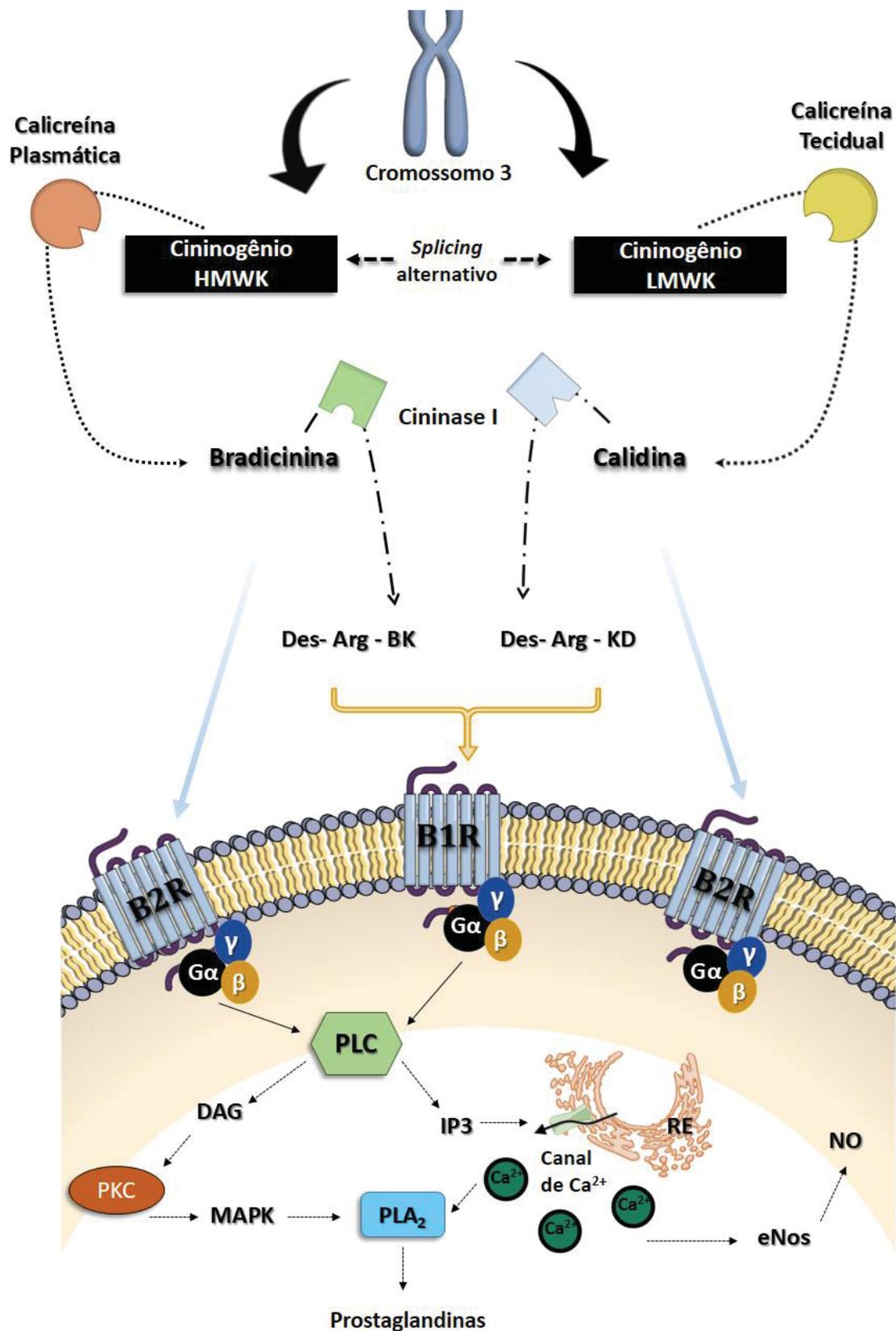


Figura 1. Representação esquemática da formação das cininas BK e KD e seus metabólitos ativos, des-Arg-BK e des-Arg- KD, assim como, vias de sinalização intracelular desencadeadas a partir da ligação dos receptores cininérgicos (B₁ e B₂) com seus respectivos agonistas. Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

1.2 SISTEMA DAS CININAS NA PELE.

Na pele, foi observado que a administração intracutânea de BK é capaz de evocar uma resposta dérmica semelhante à causada por lesões teciduais ou por doenças inflamatórias da pele (Hammond, Kirkendall e Wilkin, 1980; Wallengren e Hakanson, 1992). Posteriormente, Kindgen-milles e Klement. (1992) mostraram que a ativação de ambos os receptores cininérgicos eram responsáveis pelo eritema, edema e dor desencadeados pela administração de BK na pele (Kindgen-milles e Klement, 1992). Em consequência da descrição dos efeitos locais das cininas, estudos passaram a investigar a ocorrência de componentes do sistema das cininas na pele.

Schremmer-Danninger *et al.*(1999) demonstraram que ambos os receptores cininérgicos, assim como, calicreínas teciduais são constitutivamente expressões na pele sob condições fisiológicas (Schremmer-Danninger *et al.*, 1999). Em adição, a avaliação da localização dos receptores cininérgicos mostrou ocorrência dos receptores B₁ e B₂ das cininas em queratinócitos que compõem a epiderme, assim como, em fibroblastos da derme em condições fisiológicas (Matus, Bhoola e Figueroa, 2011; Schremmer-Danninger *et al.*, 1999). Todavia, resultado semelhante não foi observado para o cininogênio, onde a expressão de RNAm não foi constatada em condições homeostáticas (Schremmer-Danninger *et al.*, 1999). A partir destes dados, foi proposto que o funcionamento do sistema das cininas na pele normal dependa de cininogênio proveniente de outras regiões do corpo (Poblete *et al.*, 1991; Segawa *et al.*, 2009).

Durante processos inflamatórios, contudo, foi observado aumento da expressão de ambos os receptores cininérgico e grande quantidade de cininogênio na pele (Matus, Bhoola e Figueroa, 2011; Schremmer-Danninger *et al.*, 2004). Uma hipótese é que o influxo de leucócitos, que ocorre durante a inflamação, possa contribuir e suprir a ausência de cininogênio, uma vez que, é bem descrita a presença desta glicoproteína na superfície destes tipo celulares (Schremmer-Danninger *et al.*, 2004; Segawa *et al.*, 2009). Análises também apontaram maior expressão do RNAm de calicreínas na pele inflamada, podendo o aumento desta enzima estar relacionado com a manutenção de níveis

elevados de cininas durante processos inflamatórios crônicos (Komatsu *et al.*, 2003). Em conjunto, estes dados suportam a importância do sistema das cininas na pele durante estados de homeostasia e patológicos.

A ativação do sistema das cininas já foi descrita em diversas patologias cutâneas, contudo, o papel das cininas em doenças inflamatórias da pele ainda é pouco compreendido (Poblete *et al.*, 1991). Sabe-se que BK e KD são liberadas durante injúrias dérmicas, sendo estes peptídeos vasoativos diretamente associados à proliferação celular e indução de eventos ligados ao processo inflamatório (Marshman, Burton e Archer, 1996; Schremmer-Danninger *et al.*, 1999; Segawa *et al.*, 2009). Ademais, diversas evidências sugerem participação do sistema das cininas em processos inflamatórios crônicos da pele, assim como, processos hiperproliferativos (Costa-Neto *et al.*, 2008; Pietrovski, *et al.*, 2011; Polosa *et al.*, 1993).

Segawa *et al.*, (2009) observaram que portadores de psoríase possuem aumento nos níveis plasmáticos de cininogênio e calicreína (Segawa *et al.*, 2009). Semelhantemente, Poblete *et al.* (1991) mostraram que há aumento do infiltrado de neutrófilos imunorreativos para calicreína tecidual na pele psoriática (Poblete *et al.*, 1991). Como consequência, diversos estudos mostram que há aumento da formação de cininas na pele de pacientes psoriáticos, quando comparado à pele normal (Marshman, Burton e Archer, 1996; Schremmer-Danninger *et al.*, 2004; Wilhelm, 2003). Além disso, foi observado que diferentes terapias empregadas no tratamento da psoríase promovem a melhora das manifestações clínicas da doença, assim como, redução dos níveis plasmáticos de cininogênio e calicreína (Kolosovsky, 1994)

Reforçando a relação entre o sistema das cininas e a psoríase, na literatura existem diversos relatos de que o uso de inibidores da ECA (iECA) estejam associados a indução de erupções cutâneas tipo psoriáticas, e acredita-se que estas lesões se formem como consequência do aumento local de BK (Andersson e Persson, 1994; Hong e Bernstein, 2018; Konigsberg e Albahrani, 2013; Ryder *et al.*, 1985).

1.3 PSORÍASE

A psoríase é um dos mais comuns distúrbios inflamatórios crônicos imunomediados da pele, afetando 1-3% da população mundial (Conrad e Gilliet, 2018). Porém, esse número pode ser maior, uma vez que estimativas sugerem que 0,4 a 2,3% da população têm psoríase, mas permanecem sem diagnóstico (Bowcock e Krueger, 2005; Eberle *et al.*, 2016; Gulliver *et al.*, 2015). No Brasil, recentes estimativas indicam prevalência de psoríase em cerca de 1,3% da população (Romiti *et al.*, 2018). Atualmente incurável, a psoríase atinge homens e mulheres em igual proporção e apresenta maior ocorrência em caucasianos (Schmitt e Ford, 2007).

A distribuição da psoríase na população é considerada bimodal, havendo picos de ocorrência durante a adolescência ou a partir da sexta década de vida (Grozdev *et al.*, 2011). A partir deste parâmetro, a psoríase pode ser referida como de tipo I, quando a doença manifesta-se antes dos 40 anos de idade, havendo pico de ocorrência em indivíduos com idade entre 16-22 anos (Phan *et al.*, 2016; Queiro *et al.*, 2014). Em contraste, a psoríase de início tardio, também denominada de tipo II, caracterizada pelo aparecimentos dos sinais clínicos após os 40 anos de idade, com pico de incidência entre indivíduos com 57 a 60 anos (Queiro *et al.*, 2014). Embora estas formas de psoríase não possam ser distinguidas a partir de avaliações clínicas ou histopatológicas, sabe-se que há distinta associação genética. Desta forma, a psoríase de tipo I exibe forte associação familiar, havendo associação positiva com o alelo HLA - C *06, por exemplo. Por sua vez, a psoríase tipo II é esporádica e raramente familiar (Albanesi, 2012; Queiro *et al.*, 2014).

Com etiologia ainda pouco conhecida, estudos têm mostrado que a combinação de predisposição genética, alterações imunológicas e estilo de vida contribuem para o desenvolvimento desta desordem cutânea (Figura 2) (Kim e Krueger, 2015; Liu, Han e Lu, 2013). Recentemente, genes que conferem suscetibilidade à psoríase e contribuem para o seu desenvolvimento estão sendo identificados e investigados, como, por exemplo, os alelos do antígeno leucocitário humano (HLA), genes envolvidos na diferenciação epidérmica, bem como o polimorfismo no gene da ECA (Bowcock e Krueger, 2005; Ozkur *et al.*,

2004; Weger *et al.*, 2007). Contudo, o papel da transmissão hereditária na patogênese da psoríase ainda é pouco compreendido (Tonel e Conrad, 2009).

A apresentação clínica da psoríase é geralmente caracterizada por placas escamosas eritematosas que afetam comumente superfícies flexoras, como, por exemplo, braços e pernas, além do couro cabeludo e tronco (Kelly e Ryan, 2018; Rendon e Schakel, 2019). As lesões psoriáticas típicas surgem como consequência de um acentuado espessamento da epiderme, devido ao aumento da proliferação e alterações na diferenciação dos queratinócitos, assim como, infiltração atípica de células inflamatórias na epiderme e derme (Figura 2) (Cai, Fleming e Yan, 2012; Fitch *et al.*, 2010; Michalek, Loring e John, 2017).

Embora o evento inicial, capaz de desencadear o aparecimento das lesões psoriáticas ainda seja desconhecido, sabe-se que fatores estressantes, como, por exemplo lesão tecidual, infecções e alguns medicamentos contribuem para o início da doença em indivíduos com predisposição genética (Albanesi, 2012; Tonel e Conrad, 2009).

Está bem caracterizado que após a ocorrência desse gatilho inicial, há a síntese e liberação de peptídeos antimicrobianos (AMPs - do inglês, “*Antimicrobial peptides*”) por queratinócitos (Kim e Krueger, 2015; Tonel e Conrad, 2009). Na pele normal (não inflamada), a quantidade desses peptídeos é pouco expressiva, contudo, sua expressão é marcadamente aumentada em doenças inflamatórias da pele (Kelly e Ryan, 2018; Kim *et al.*, 2005; Kim e Krueger, 2015). Entre os AMPs, defensinas e catelicidinas (por exemplo, LL-37) são as mais estudadas e amplamente associadas à psoríase (Figura 2) (Kim *et al.*, 2005). Uma vez liberado por queratinócitos, os AMPs promovem o recrutamento de células inflamatórias, estimulam a angiogênese e a proliferação de queratinócitos (Kim e Krueger, 2015). Além disso, estes peptídeos estão diretamente associados à ativação de células dendríticas plasmocitóides (pDCs- do inglês, “*Plasmacytoid dendritic cells*”) (Albanesi, 2012; Ueyama *et al.*, 2014).

É bem conhecido que as DCs desempenham um papel importante nos estágios iniciais da doença, contudo, sua participação na psoríase não é inteiramente clara (Rendon e Schakel, 2019). A ativação de pDCs é caracterizada pela produção de interferon de tipo I (IFN- α e $-\beta$) (Figura 2)

(Rendon e Schakel, 2019; Tonel e Conrad, 2009). Por sua vez, a sinalização via IFN do tipo I promove maturação de células dendríticas mielóides (mDCs - do inglês, "*Myeloid dendritic cells*"), que migram para os linfonodos e passam a secretar TNF, IL-23 e IL-12, citocinas que modulando a diferenciação e proliferação de subconjuntos de células Th17 e Th1 (Figura 2) (Cai, Fleming e Yan, 2012; Eberle *et al.*, 2016; Tonel e Conrad, 2009). Uma vez ativados, os linfócitos migram dos linfonodos para a pele, onde através da síntese e liberação de diferentes citocinas pró-inflamatórias induzem o aumento da taxa de proliferação de queratinócitos e a formação da placa psoriática (Figura 2) (Arcoleo *et al.*, 2018; Eberle *et al.*, 2016). Na psoríase observa-se principalmente a ativação de linfócitos T CD4⁺ que secretam IFN, TNF- α e IL-2; Th17 secretores de IL-17, TNF- α , IL-6 e IL-22, e linfócitos TCD8⁺ que sintetizam IL-17, TNF- α e IFN (Meglio, Di e Duarte, 2013; Rendon e Schakel, 2019). Por sua vez, queratinócitos psoriáticos secretam citocinas como, por exemplo, IL -1 β e TNF- α , que podem intensificar a hiperproliferação epidermal e ativar DCs, contribuindo para a manutenção e cronificação do processo inflamatório (Tonel e Conrad, 2009). Ainda, macrófagos ativados secretam IL-12 e IL-23 que estimulam a proliferação de Th1 e Th17, respectivamente, estabelecendo assim, um ciclo de ativação do sistema imune (Conrad e Gilliet, 2018; Meglio, Di *et al.*, 2016; Tonel e Conrad, 2009).

A psoríase é caracterizada por um processo inflamatório sistêmico crônico que afeta principalmente a pele (Kelly e Ryan, 2018; Schmitt e Ford, 2007). Desta forma, está bem documentado que os efeitos sistêmicos psoriáticos estão associados a diversas comorbidades, como aumento do risco de obesidade, resistência à insulina, doença cardiovascular, síndrome metabólica e desenvolvimento de distúrbios psiquiátricos (Azevedo-pinto *et al.*, 2016);

Considerada doença recidivante, a psoríase exige uma terapia de longo prazo (Cai, Fleming e Yan, 2012; Dutra, 2017b; Rendon e Schakel, 2019). Como a patogênese, o tratamento também pode ser complexo, e normalmente é determinado pela gravidade da doença, comorbidades e acesso aos cuidados de saúde (Rendon e Schakel, 2019). As placas psoriáticas são frequentemente categorizadas em leve, moderada ou grave, dependendo da severidade das lesões, da porcentagem de área de superfície corporal afetada e qualidade de

vida do paciente (Rendon e Schakel, 2019). Sendo que, em aproximadamente um terço dos pacientes, mais de 10% do corpo é coberto, sendo classificada como psoríase moderada a grave (Albanesi, 2012).

De maneira geral, a psoríase categorizada como leve a moderada é tratada topicamente com glicocorticóides, análogos da vitamina D ou fototerapia (Cai, Fleming e Yan, 2012; Wong e Koo, 2012). Já a psoríase moderada a grave geralmente requer tratamento sistêmico (por exemplo, com ciclosporina ou metotrexato) ou agente biológicos (por exemplo, adalimumab ou infliximab) (Rendon e Schakel, 2019). Apesar de existirem diversas alternativas terapêuticas, a terapia anti-psoriática ideal ainda não foi descrita, e dentre os principais fatores que prejudicam a adesão dos pacientes aos tratamentos atuais está a baixa eficácia e/ou efeitos colaterais, principalmente em decorrência do uso prolongado (Michalek, Loring e John, 2017; Sibin e Ossama, 2018). (Michalek, Loring e John, 2017; Sibin e Ossama, 2018). Ainda, o uso crônico pode levar ao desenvolvimento de tolerância, onde a eficácia é reduzida (Rendon e Schakel, 2019).

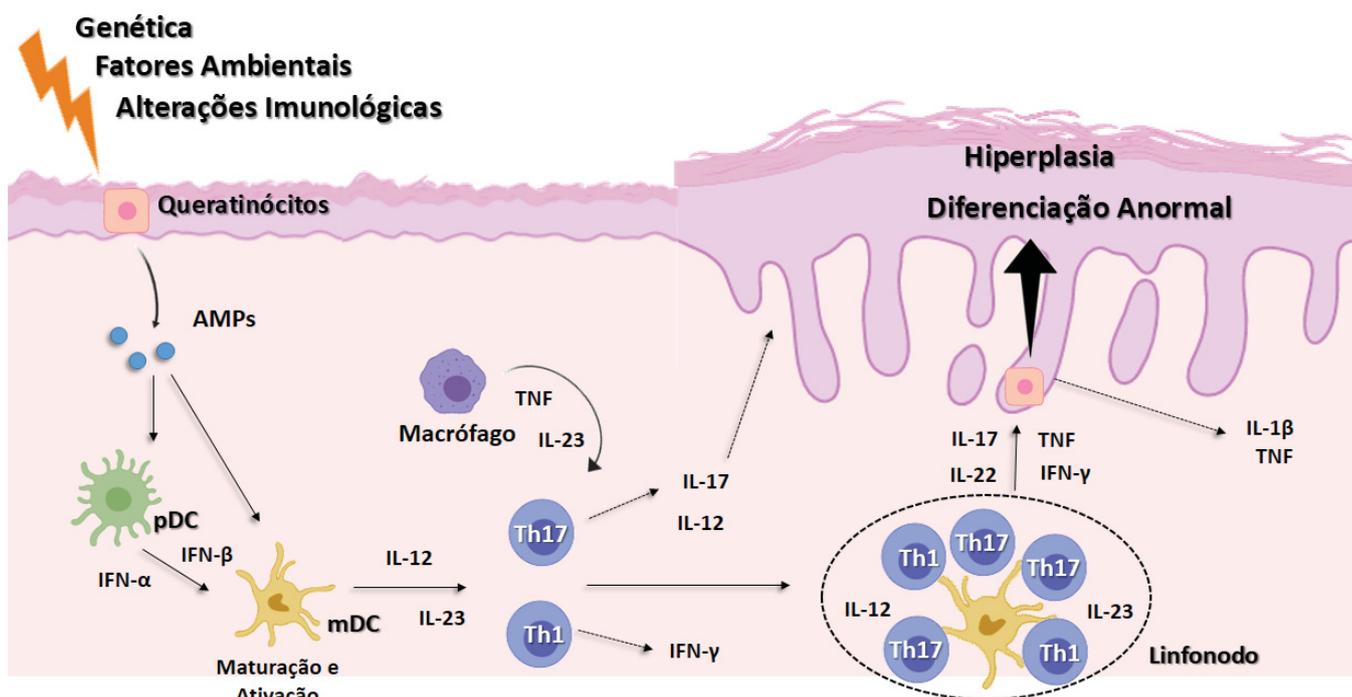


Figura 2. Representação esquemática simplificada de mecanismos envolvidos na imunopatogênese da Psoríase. Sabe-se que fatores genéticos, imunológicos e/ou ambientais podem ser gatilhos para o desenvolvimento da Psoríase. Nesse contexto, diante de um fator estressante, queratinócitos sintetizam e liberam AMPs, as quais promovem a ativação de pDCs. Estas células, por sua vez, promovem a ativação e maturação de mDCs através da síntese de IFN do tipo I. Após a maturação, mDCs migram para os linfonodos mais próximos, onde promovem a ativação e proliferação de Th1 e Th17. Uma vez ativados, estas células T deixam os linfonodos e migram para a pele, onde induzem a proliferação de queratinócitos e promovem a cronificação do processo inflamatório pela síntese de diversas citocinas pró-inflamatórias. Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

2. JUSTIFICATIVA

As doenças autoimunes afetam aproximadamente 5% da população mundial e são frequentemente associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade (Bowcock e Krueger, 2005; Ganapathy *et al.*, 2017; Romanelli *et al.*, 2018). De modo geral, as desordens autoimunes são doenças inflamatórias crônicas com etiologia pouco conhecida, ou desconhecida, que resultam da combinação da desregulação imune, suscetibilidade genética e fatores ambientais (Dutra, 2017b; Ganapathy *et al.*, 2017). Além disso, essas doenças são crônicas e debilitantes, afetando jovens e adultos, especialmente mulheres, e ocasionando enormes impactos econômicos (Dutra, 2017b; Ganapathy *et al.*, 2017; Kim e Krueger, 2015).

Atualmente, as principais terapias disponíveis tem como objetivo o controle da resposta imune a antígenos próprios, incluindo metotrexato, leflunomida e azatioprina (Dutra, 2017a; Ganapathy *et al.*, 2017). No entanto, estas terapias imunossupressoras são administradas por longos períodos e devido à pouca especificidade são associadas a diferentes efeitos colaterais, como, por exemplo, desequilíbrios metabólicos, toxicidades e risco de infecção (Ganapathy *et al.*, 2017; Wiseman, 2015). Outra classe de fármacos amplamente utilizada são os corticosteroides, contudo, efeitos colaterais também são comuns e podem variar de casos de acne à síndrome de *Cushing* (Dutra, 2017c; Foster, 2016; Wiseman, 2015).

Assim, as terapias atuais apresentam limitações, principalmente, associadas à perda de eficácia após longos períodos de tratamento, característica que somadas aos diferentes efeitos colaterais resultam em taxas reduzidas de adesão ao tratamento (Wiseman, 2015). Nesse cenário, sabe-se que uma melhor compreensão dos mecanismos subjacentes aos processos inflamatórios pode permitir o desenvolvimento de intervenções farmacológicas mais eficientes para a prevenção e/ou tratamento destas desordens (Pietrovski, Mendes, *et al.*, 2011).

Nesse contexto, há relatos do envolvimento do sistema das cininas na progressão da psoríase, uma das mais comuns doenças inflamatórias crônicas da pele (Malki, El *et al.*, 2013; Poblete *et al.*, 1991; Schremmer-Danninger *et*

al., 1999). Contudo, aspectos referentes ao papel das cininas nesta desordem cutânea ainda é pouco compreendido.

A ocorrência de cininas em tecidos afetados por condições patológicas tem naturalmente evocado o interesse referente às possíveis funções patológicas deste sistema (Campbell, 2000; Wilhelm, 2003). Embora a mera presença de cininas não garanta que estes peptídeos sejam fatores causais dessas doenças, evidências mostram que esta associação tem uma relação significativa (Campbell, 2000; Wilhelm, 2003). Corroborando, a presença e a influência dos receptores das cininas em células T, por exemplo, foram encontradas em várias condições inflamatórias, incluindo esclerose múltipla (Dutra *et al.*, 2011), lúpus eritematoso sistêmico (Prat *et al.*, 1999) e angioedema (Arcoleo *et al.*, 2018).

Por mais que a descoberta do sistema de cininas não seja recente, o seu estudo em campo clínico tem sido feito apenas nos últimos anos (Golias, Ch, Charalabopoulos, Stagikas, D, *et al.*, 2007). Como tal, antagonistas dos receptores B₁ e B₂ têm sido propostos como modalidades terapêuticas para o tratamento de muitas doenças (Sharma e Al-Sherif, 2006).

Nesse contexto, houve o interesse de avaliar a relevância das cininas e seus receptores no desenvolvimento e progressão da psoríase, com o intuito de contribuir na compreensão da patogênese e visando o possível estabelecimento de novos alvos terapêuticos para o tratamento desta desordem inflamatória da pele.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a participação do sistema das cininas no processo psoriático induzido por *Imiquimod* (IMQ) em camundongos.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar a presença dos receptores das cininas (B₁R e B₂R) na pele de camundongos, antes e após administração de IMQ, objetivando verificar possíveis alterações na expressão dos receptores cininérgicos;

- Usando animais nocautes para os receptores das cininas (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂) e antagonistas seletivos, avaliar a severidade da psoríase induzida por IMQ com base no índice clínico PASI (do inglês, *Psoriasis Area and Severity Index*);

- Avaliar alterações histopatológicas presentes na pele de animais nocautes para os receptores das cininas (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂) ou tratados com antagonistas, submetidos ao modelo de psoríase induzida por IMQ;

- Analisar possíveis alterações em indicadores de proliferação e diferenciação celular de queratinócitos, a partir de amostras teciduais da lesão psoriática de camundongos, nocautes para os receptores das cininas ou tratados com antagonistas, submetidos ao modelo de psoríase induzida por IMQ;

- Verificar o efeito dos receptores das cininas no influxo de células inflamatórias (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD11b⁺ e Ly6G⁺) nas lesões psoriáticas de camundongos nocautes para os receptores das cininas ou tratados com antagonistas e submetidos ao modelo de psoríase induzida por IMQ;

- Realizar a análise da presença de IL- 17 nas lesões psoriáticas de camundongos nocautes para os receptores das cininas ou tratados com antagonistas e submetidos ao modelo de psoríase induzida por IMQ;

- Avaliar a possível influência do sistema das cininas na resposta sistêmica induzida por IMQ, através da avaliação do peso de órgãos linfóides (baço, linfonodos inguinais e axilares).

- Analisar possíveis alterações no desenvolvimento e progressão do processo psoriático induzido por IMQ decorrentes do tratamento com Captopril;

- Avaliar o bem-estar de animais submetidos ao modelo de psoríase induzida por IMQ, utilizando como indicativo a atividade de nidificação;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Para a realização dos procedimentos experimentais foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 *wild type* (WT) e nocautes (*background* C57BL/6) para os receptores das cininas, gentilmente cedidos pelo professor Dr. João Bosco Pesquero, do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp). A geração de camundongos sem o receptor B₁ das cininas (KOB₁R), B₂ (KOB₂R) e os duplos nocautes (KOB₁B₂R) foram obtidas e previamente descritas por PESQUERO *et al.* (2000), BORKOWISKI *et al.* (1995) e CAYLA *et al.* (2002), respectivamente (Borkowski *et al.*, 1995; Cayla *et al.*, 2002; Pesquero *et al.*, 2000).

Os camundongos (machos e fêmeas, 8-10 semanas de idade, 20-25 g) foram alojados sob condições laboratoriais padrão, tendo livre acesso a ração e água, ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 7:00 da manhã), e sala com temperatura (23 ± 2 °C) e humidade ($60 \pm 10\%$) controlada. Os animais foram mantidos em grupos de 8-15 animais em gaiolas de polipropileno de fundo sólido (tamanho: 18 cm x 34 cm x 41 cm), recobertas por uma camada de maravalha (raspa de madeira picada) autoclavada e grades em INOX (*Insight Equipamentos*). No mínimo 24h antes da realização dos experimentos, os animais foram transferidos e mantidos na sala de experimento para adaptação. Todos os procedimentos experimentais foram realizados durante a fase clara. Os animais utilizados sempre foram aleatoriamente divididos em grupos.

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Seção de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO) sob o número 1185. Além disso, foram levadas em consideração diretrizes experimentais subscritas em ARRIVE (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments Guidelines*), objetivando reduzir fatores que possam vir a promover variações nos resultados e contribuindo para posteriores replicações dos resultados (Kilkenny *et al.*, 2011). Sempre que possível as avaliações e coletas de dados foram realizadas

de forma cega, ou seja, sem que os avaliadores soubessem quais eram os grupos experimentais em análise. Todo esforço foi feito para minimizar o número de animais utilizados e seu sofrimento.

4.2 MODELO ANIMAL DE PSORÍASE

Camundongos foram tricotomizados (Dia 0) e, posteriormente, submetidos à inflamação cutânea crônica induzida por múltiplas aplicações de IMQ (Dia 1-6). Neste modelo experimental, os animais receberam administrações tópicas diárias (80 mg) do creme comercialmente de IMQ (5%) (Modik; Germed Pharma, BR), durante 6 dias consecutivos. No sétimo dia, os animais foram eutanasiados por *overdose* de isoflurano e amostras teciduais coletadas para posteriores análises (Figura 3).

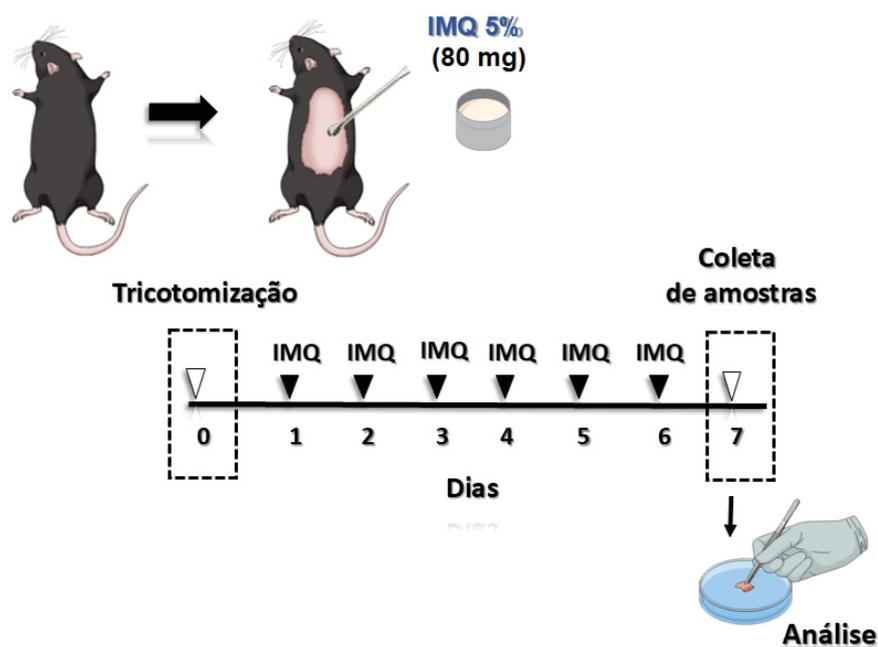


Figura 3. Representação esquemática do delineamento experimental. Camundongos (WT e nocautes) foram submetidos ao Modelo de Psoríase Experimental Induzido por IMQ. Inicialmente, os animais foram tricotomizados e, a partir de então, receberam diariamente administrações de IMQ 5% (80 mg), por 6 dias consecutivos. Ao final (7.º dia), os animais são eutanasiados e amostras teciduais coletadas para análise. Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Ademais, alguns camundongos WT foram tratados (30 min antes da administração de IMQ) com veículo (DMSO - 0,03% v/v, i.p), diferentes doses de

SSR240612C (0,1; 0,3 e 1,0 mg/Kg, i.p.; *Sanofi - Aventis*, DE), ou FR173657 (3, 10 e 30 mg/Kg, i.p.; *Astellas Pharma*, JP), diariamente, durante 6 dias consecutivos (Figura 4). Os dois antagonistas foram solubilizados usando DMSO (0,03% - v/v), o mesmo foi usado para tratar os animais do grupo veículo. As doses utilizadas tiveram como base referências da literatura (*Christianne et al.*, 1999; *Gougat et al.*, 2004).

Em outro grupo experimental, camundongos WT foram tratados por via oral com Captopril (10; 30 ou 100 mg/Kg, p.o.), 1 h antes da aplicação de IMQ, durante 6 dias consecutivos (Figura 4). Semelhantemente, o grupo veículo recebeu salina (p.o.), 1 h antes da aplicação tópica de IMQ. As doses utilizadas foram escolhidas com base em dados disponíveis na literatura (*Kambara et al.*, 2003; *Leor et al.*, 1994). O grupo Naive não recebeu nenhum tratamento.

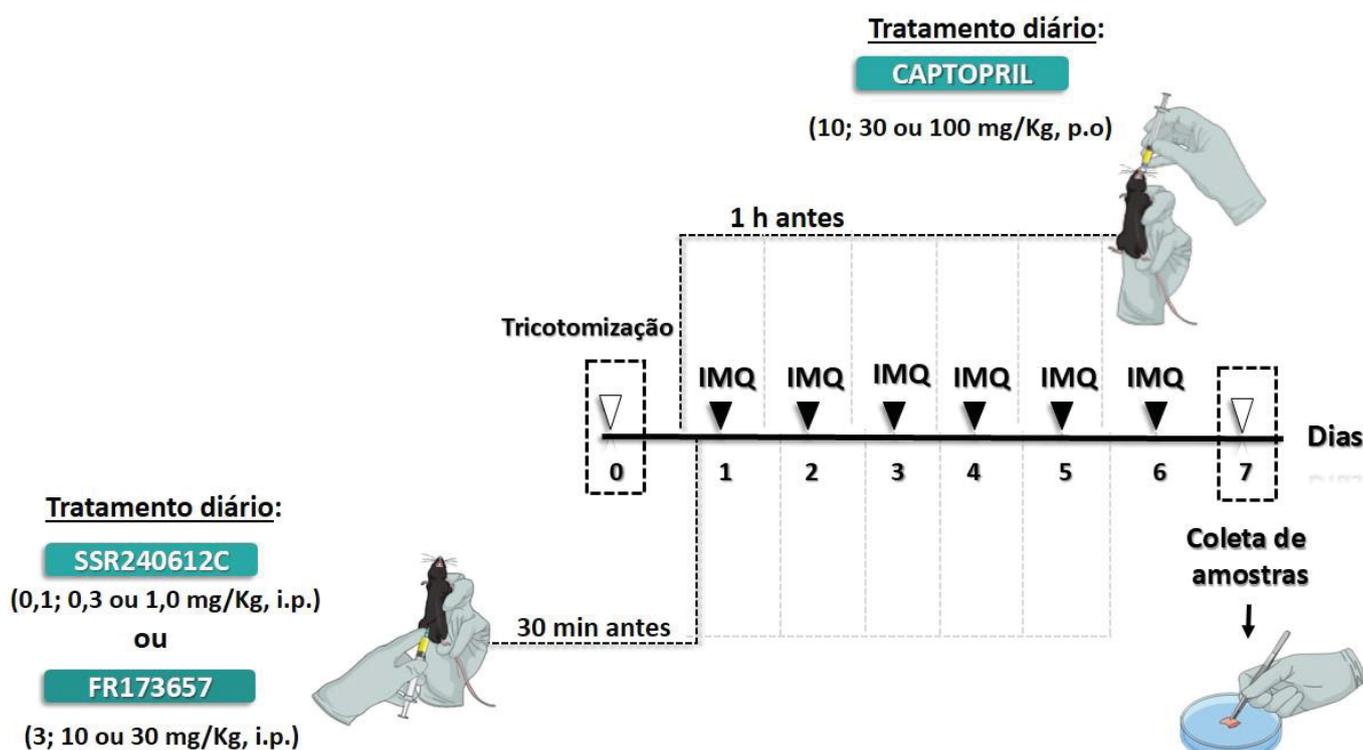


Figura 4. Representação esquemática dos tratamentos realizados (antagonistas seletivos para os receptores B₁ ou B₂ das cininas ou Captopril) durante a realização do protocolo experimental estabelecido. Camundongos foram submetidos ao Modelo de Psoríase Experimental Induzido por IMQ. Inicialmente, os animais foram tricotomizados e, a partir de então, receberam diariamente administrações IMQ por 6 dias consecutivos. Adicionalmente, foram realizados pré-tratamentos com SSR240612C (0,1; 0,3 e 1,0 mg/Kg, i.p.), ou FR173657 (3, 10 e 30 mg/Kg, i.p.), diariamente, 30 min antes da administração de IMQ. Semelhantemente, alguns animais receberam por via oral Captopril (10; 30 ou 100 mg/Kg), diariamente, 1h antes da administração de IMQ. No sétimo dia, os animais foram eutanasiados e amostras teciduais coletadas para análise. Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

4.3 AVALIAÇÃO DA SEVERIDADE DA INFLAMAÇÃO CUTÂNEA

Com o intuito de analisar a intensidade do processo inflamatório estabelecido ao longo do protocolo experimental, foi utilizado um sistema de avaliação baseado no escore clínico PASI. Desta forma, os animais foram avaliados diariamente e individualmente quanto aos índices de eritema, escarificação e descamação. Nesse sistema, cada índice foi pontuado independentemente em uma escala de 0 a 4 (0 - ausente, 1 - leve, 2 - moderado, 3 - grave, 4 - muito grave). O escore total (resultado da soma dos escores de eritema, escarificação e descamação) foi utilizado para mensurar a gravidade do processo inflamatório (escala 0-12), conforme descrito previamente por Fitts *et al.* (2009).

Durante as avaliações a extensão da lesão não foi levada em consideração, uma vez que, todos os camundongos tiveram a mesma área experimental. Todas as avaliações foram realizadas de forma cega e por 3-4 pesquisadores diferentes. Ao final, a média dos escores de cada camundongo foi calculada e geradas linhas de tendência para analisar possíveis alterações no desenvolvimento das lesões cutâneas induzidas por IMQ.

4.4 HISTOLOGIA

Amostras da pele psoriática (6 mm) foram coletadas de camundongos (WT e nocautes) no sétimo, e último dia, do protocolo experimental de psoríase induzida por IMQ. Subsequentemente, as biópsias foram fixadas em solução ALFAC (85 mL de álcool a 80%, 10 mL de formol a 40% e 5 mL de ácido acético glacial), sendo mantidas por 16 h. Posteriormente, as amostras foram desidratadas, embebidas em parafina, seccionadas em micrótomo (5 μ m), e coradas com hematoxilina e eosina (H & E).

Objetivando avaliar a celularidade e a espessura da epiderme, as amostras foram fotografadas com aumento de 200x em câmera digital acoplada a um microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão), e analisadas com o *software ImageJ*® versão 1.48 (*National Institute of Health*, EUA). Três a cinco campos oculares por seção (6-8 camundongos por grupo) foram capturados e submetidos à avaliação. A espessura da epiderme foi expressa em μ m.

4.5 IMUNOHISTOQUÍMICA

Amostras da pele psoriática (6 mm) foram coletadas e processadas como descrito no item anterior (4.4). Posteriormente, os cortes histológicos (5 µm) foram montados em lâminas previamente gelatinizadas. As lâminas foram submetidas a banhos de xilol, para desparafinização, e hidratadas com banhos sucessivos em concentrações decrescentes de álcool. Em seguida, as lâminas foram tratadas com glicina (0,1 M) e com H₂O₂ 3%, com o intuito de promover o bloqueio de radicais aldeídos, peroxidases endógenas e sítios inespecíficos, respectivamente. Posteriormente, as seções foram incubadas por 2 h com anticorpo policlonal anti-PCNA (1:100, sc-9857- Santa Cruz Biotech, Inc., EUA), ou anti- K14 (1:100, sc-17104 -Santa Cruz Biotech, Inc., EUA), à temperatura ambiente em câmara úmida. Após banhos em PBS, as lâminas foram incubadas com os respectivos anticorpos secundários conjugados com peroxidase (1:100, sc-2020 -Santa Cruz Biotech, Inc., USA) por uma hora à temperatura ambiente em câmara úmida. Os locais de ligação foram detectados com Kit de substrato DAB (Diaminobenzidina 3,3', BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA). O número de células epidérmicas imunomarcadas para PCNA e K14 foram quantificadas com o software ImageJ® versão 1.48 (*National Institute of Health*, EUA). A presença de grânulos marrons na epiderme foi definida como um sinal positivo. Para controles negativos, as seções foram processadas como descrito acima, sem anticorpo primário (dados não mostrados).

4.6 DETECÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

Objetivando avaliar a expressão de B₁R, B₂R, Ly6G, CD11b, CD3, CD4, CD8 e IL-17, amostras da pele (6 mm) foram emblocadas em *tissue-tek*, submetidas à criopreservação em nitrogênio líquido e armazenadas a - 80°C até sua utilização. As amostras foram seccionadas em criostato (resfriado a -35° C), e os cortes (5 µm) montados em lâminas previamente gelatinizadas. As seções foram lavadas com PBS (3x) e incubadas com acetona a 4°C (20 min). Posteriormente, as lâminas foram submetidas à incubação em solução contendo BSA (1%), Triton X-100 (0,3%) e PBS por 30 min, com o intuito de alterar a permeabilidade das membranas biológicas. Subsequentemente, as lâminas

foram incubadas *overnight* com anti- B₁R (anticorpo policlonal, 1:300, sc-15048- Santa Cruz Biotech, Inc., USA), anti-B₂R (anticorpo policlonal, 1:300, sc-25671- Santa Cruz Biotech, Inc., USA), anti- Ly6G (anticorpo monoclonal, 1:300, RB6-8C5 - Abcam plc Biotech, UK), anti-CD11b (anticorpo monoclonal, 1:300, 557396 - BD Pharmingen, San Jose, CA, USA), anti-CD3 (anticorpo monoclonal, 1:300, sc-70618 - Santa Cruz Biotech, Inc., USA), anti-CD4 (anticorpo monoclonal, 1:300, sc-70670 - Santa Cruz Biotech, Inc., USA), anti-CD8 (anticorpo monoclonal, 1:300, sc-18860 - Santa Cruz Biotech, Inc., USA), ou anti-IL17 (anticorpo policlonal, 1:300, ab91649 - Abcam plc Biotech, UK), a 4° C. Após esta primeira incubação, as amostras foram lavadas com PBS e incubadas com seus respectivos anticorpos secundários (diluição 1:300) por 2 h em temperatura ambiente e câmara úmida. Finalmente, após nova lavagem com PBS, os cortes foram coradas com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), e protegidos com Fluoromount-G (Thermo Fisher Scientific, Inc., EUA). As imagens foram adquiridas usando um microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão). A omissão do anticorpo primário foi usada como controle negativo (dados não mostrados). A média da intensidade de fluorescência (MIF) ou a quantificação do número de células marcadas foi realizada com o auxílio do *software* ImageJ® versão 1.48 (*National Institute of Health*, EUA).

4.7 ENSAIO DE CONSTRUÇÃO DE NINHO (do inglês, “*Nest Building*”)

Com o intuito de avaliar o bem-estar dos animais submetidos ao modelo de inflamação crônica tipo psoriática induzida por IMQ, foi utilizado o ensaio de construção de ninho (Jirkof, 2014). Desta forma, no sexto dia do protocolo experimental, os camundongos foram colocados em gaiolas individuais, cerca de uma hora antes da fase escura, e os resultados avaliados na manhã seguinte (Figura 5). Previamente, em cada gaiola foi adicionado um algodão prensado de 5 cm x 5cm (Sussex®), e os ninhos foram pontuados usando uma escala predefinida (0-5) (Figura 5). Resumidamente, a pontuação utilizada baseou-se em: (0) Material intocado; (1) Material manipulado e disperso na gaiola; (2) Material utilizado para construção de um ninho plano; (3) Material utilizado para construção de um ninho com forma bem definida (normalmente, circular); (4) material bem desfiado, ninho com forma bem definida e cúpula incompleta; (5)

ninho com forma bem definida, cúpula completa e fechada (Gaskill e Pritchett-Corning, 2016).

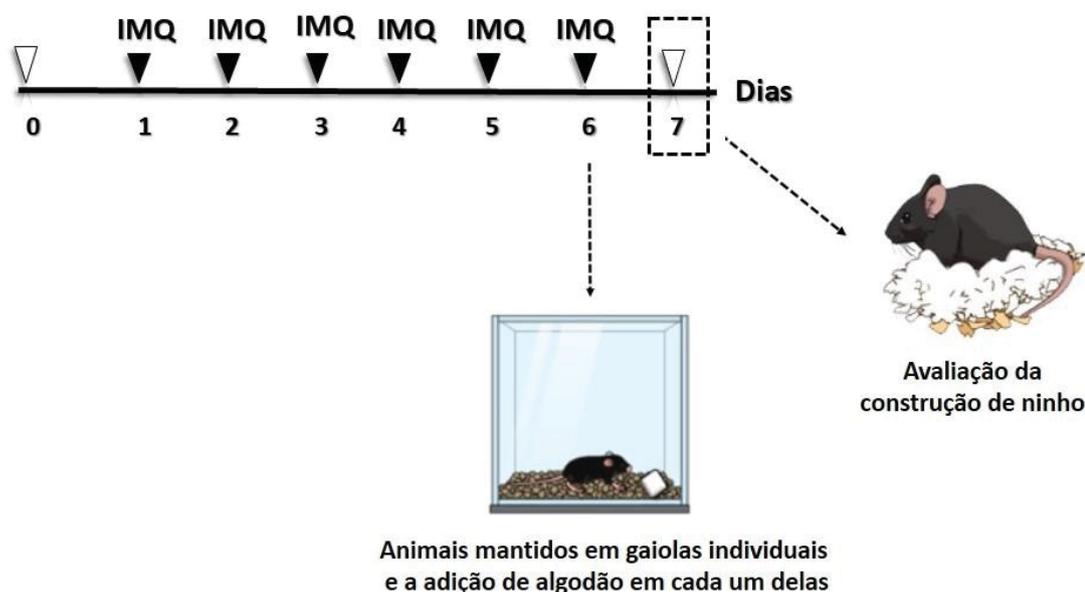


Figura 5. Representação esquemática da avaliação da atividade de nidificação. Objetivando avaliar o bem-estar de camundongos submetidos ao modelo de psoríase experimental induzido por IMQ foi realizada a avaliação da atividade de nidificação. Para isso, no 6º dia do protocolo experimental os animais foram separados e mantidos em gaiolas individuais, sendo adicionado algodão em cada uma das gaiolas. Posteriormente, no 7.º dia, foi realizada a avaliação da construção de ninho utilizando uma escala pré-definida. Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.

Os resultados experimentais são expressos como média \pm E.P.M. de n observações, onde n representa o número de animais. Para cada ensaio *in vivo* foram utilizados 6-8 animais diferentes em cada grupo. O cálculo do tamanho amostral foi realizado com o auxílio do *software G * Power 3.1.9.2* (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf). A avaliação estatística foi realizada por *One-way ANOVA*, seguida pelo teste post hoc de *Newman-Keuls*, para comparações múltiplas.

Com relação ao índice PASI, 3-4 pesquisadores diferentes foram responsáveis pela realização das avaliações, em seguida, foi realizada a média dos escores de cada animal, e a comparação entre os grupos foi avaliada por ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post-hoc* de *Newman-Keuls*. A razão para esta normalização é a possibilidade de comparação da condição patológica

ao longo dos dias entre diferentes tratamentos ou animais nocautes. A avaliação do teste de *Nest Building* foi realizada por *One-way ANOVA* (teste não paramétrico, *Kruskal–Wallis test*) seguido do teste de múltiplas comparações de *Dunn's*. O nível de significância aceito para os testes foi $p < 0,05$. Todos os testes foram realizados utilizando o *software* estatístico *GraphPad Prism* versão 6.0, San Diego, Califórnia, EUA (*GraphPad Software*, CA, EUA).

5. RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DOS RECEPTORES B₁ E B₂ DAS CININAS NA PELE DE CAMUNDONGOS

Inicialmente, com o intuito de avaliar a presença dos receptores cininérgicos (B₁R e B₂R) na pele de camundongos, tratados ou não com IMQ, amostras teciduais foram coletadas e submetidos a análise por imunofluorescência (Figura 6 e 7). Os resultados obtidos mostram a presença dos B₁ e B₂ das cininas na pele saudável de camundongos, com expressão detectável principalmente na epiderme (Figura 6A e 7). Além disso, após 6 dias de tratamento com IMQ, houve intenso aumento na MIF referente aos dois receptores cininérgicos, sendo este aumento de $505,17 \pm 19,92\%$ e $32,74 \pm 1,12\%$ para os receptores B₁ e B₂, respectivamente, em comparação ao grupo Naive ($p < 0,05$) (Figura 6B e 7).

Uma vez verificada a presença dos receptores B₁ e B₂ das cininas na pele, bem como o aumento desses receptores na resposta inflamatória induzida por IMQ, avaliou-se o potencial papel dos receptores cininérgicos no desenvolvimento e progressão do processo psoriático.

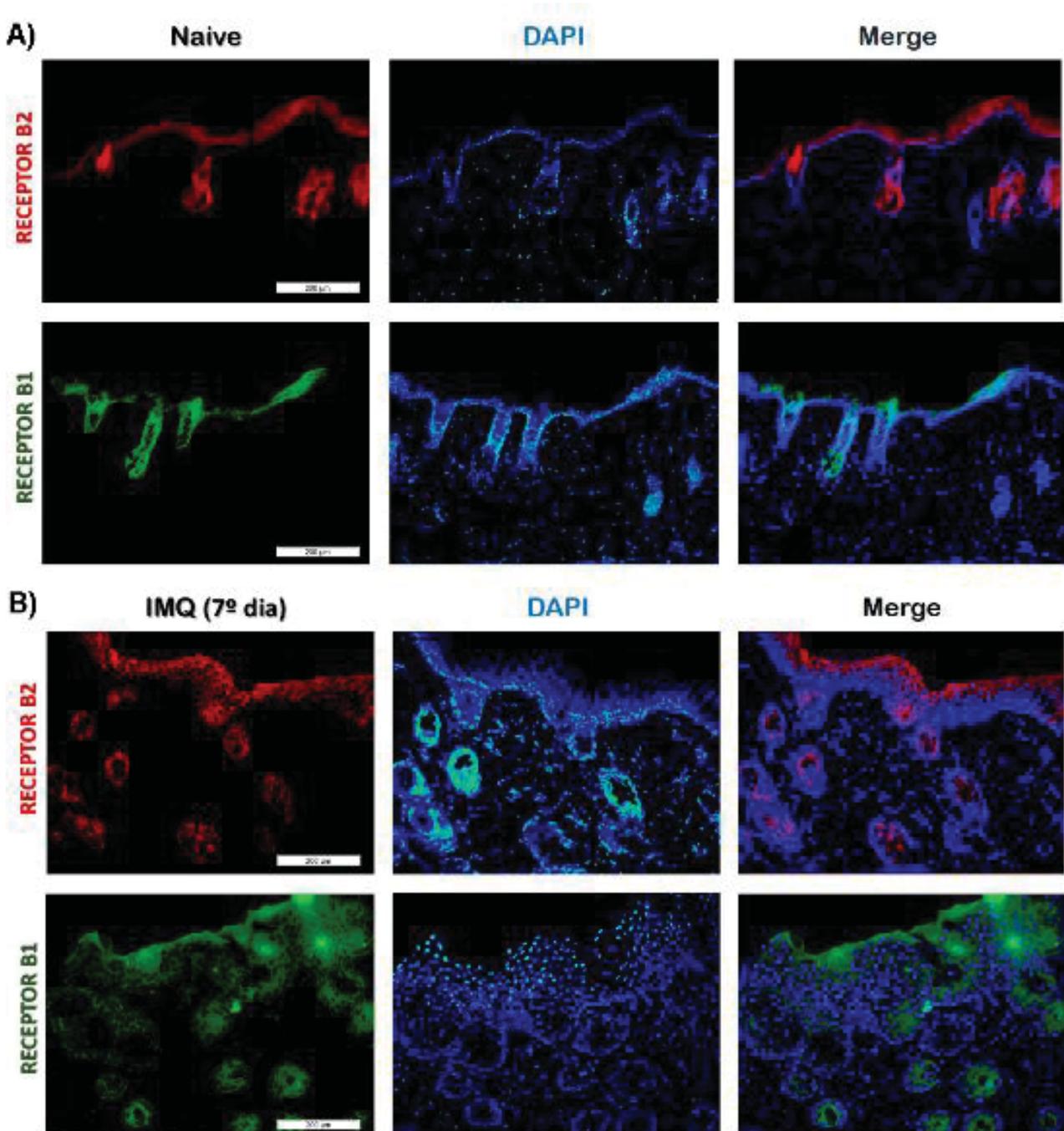


Figura 6. Análise da presença dos receptores B₁ e B₂ das cininas na pele. Biópsia (6 mm) da pele de camundongos C57BL/6 (A) Naive (normal) e (B) submetidos ao modelo de inflamação crônica induzida por aplicações múltiplas de IMQ, foram criopreservadas, seccionadas (5 µm) e analisadas por imunofluorescência com o intuito de verificar a presença dos receptores cininérgicos (B₁R e B₂R). Os painéis mostram células imunorreativas para os receptores cininérgicos B₁ (verde) e B₂ (vermelho), assim como, a marcação para DAPI (azul). As imagens foram adquiridas com microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão). A média da intensidade de fluorescência (MIF) foi realizada com o auxílio do software ImageJ® (Aumento de 200x, escala de 200µm).

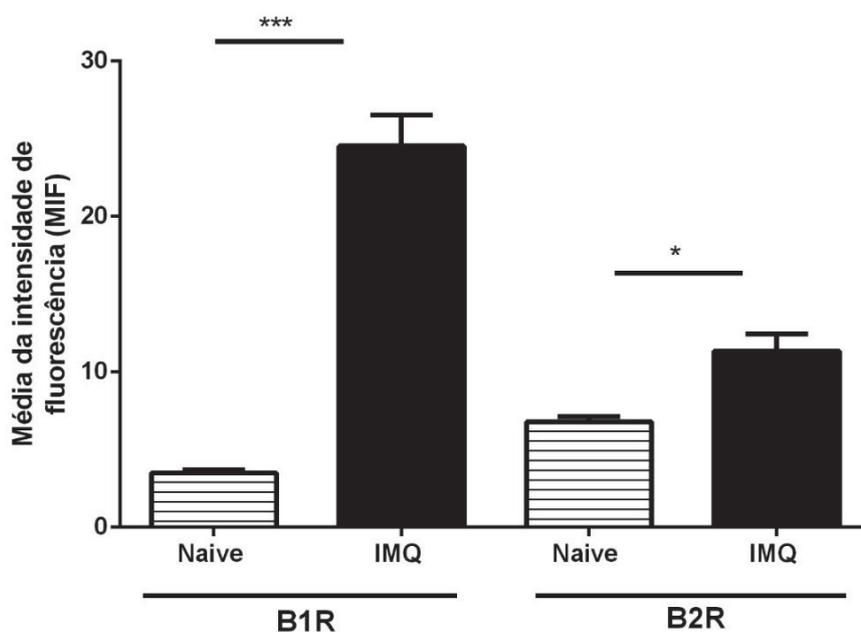
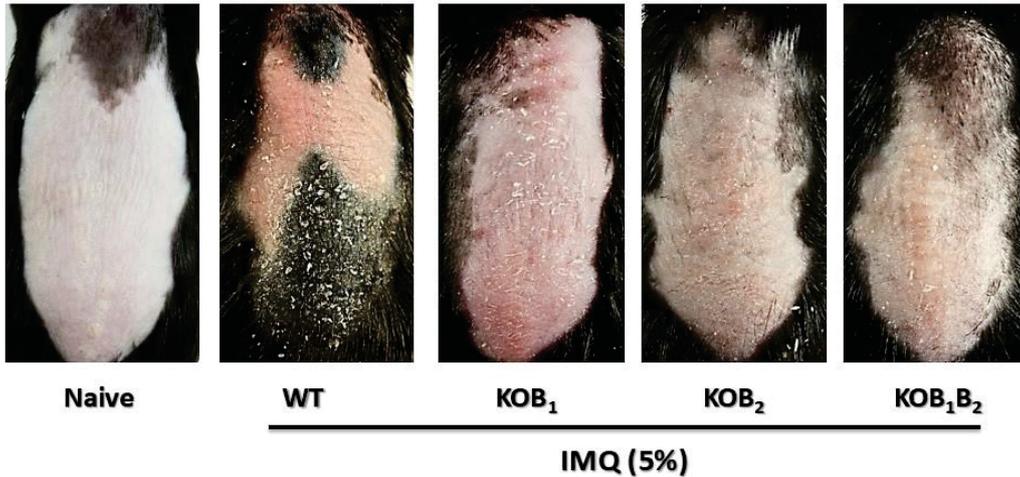


Figura 7. Quantificação da MIF dos receptores B₁ e B₂ das cininas na pele. Com o intuito de mensurar a presença dos receptores cininérgicos na pele de camundongos (A) Naive e (B) submetidos ao modelo de psoríase induzida por IMQ, foi realizada a quantificação da MIF com o auxílio do *software* ImageJ®. As barras verticais representam a média ± E.P.M (n=6) de cada grupo. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (*One-way ANOVA*), seguida pelo teste de *Newman-Keuls*. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao grupo Naive, * p<0,05 e *** p<0,001.

5.2 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES DAS CININAS NO PROCESSO PSORIÁTICO INDUZIDO POR IMQ.

Com base no escore PASI, apresentado na Figura 8, os resultados mostram que a aplicação repetida de IMQ promove aumento gradual das lesões tipo psoriáticas, causando eritema, descamação e espessamento da pele dos animais pertencentes ao grupo WT, quando comparado ao grupo Naive (não tratado) (p<0,001) (Figura 8). Entretanto, animais nocautes para os receptores B₁ (KOB₁), B₂ (KOB₂), assim como o duplo nocaute (KOB₁B₂), tratados com IMQ, apresentaram índices menores em todos os parâmetros avaliados, quando comparados com o grupo WT (controle) (p<0,001) (Figura 8 A e B).

A)



B)

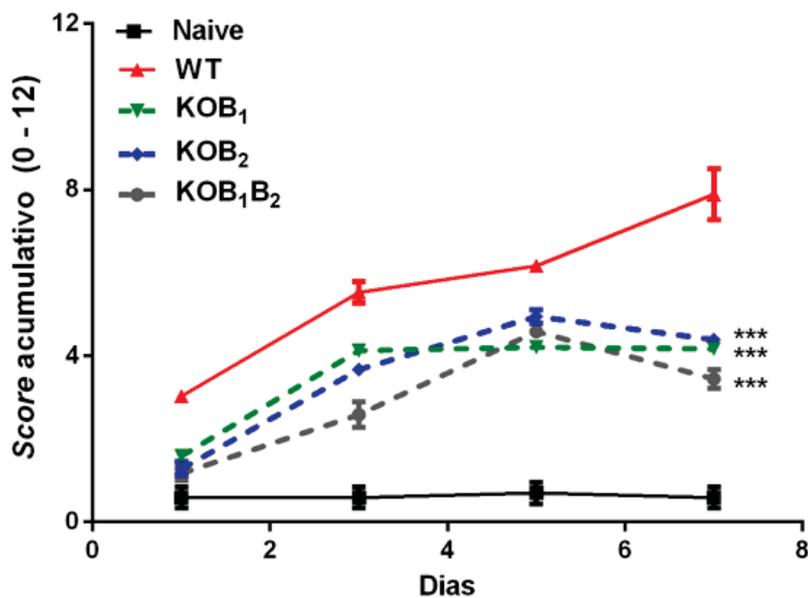


Figura 8. Avaliação da participação dos receptores das cininas no desenvolvimento do processo psoriático induzido por aplicações múltiplas de IMQ. Animais nocautes para os receptores das cininas (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂) e WT (controle), foram submetidos ao modelo de inflamação crônica induzida por aplicações múltiplas de IMQ. Ao longo do protocolo experimental, foram realizados registros fotográficos e realizada a avaliação da gravidade do processo psoriático utilizando índice PASI. (A) Fotos representativas da lesão psoriática de animais nocautes para os receptores B₁ e B₂ das cininas e WT no 7º dia do modelo experimental de psoríase. (B) O score acumulado foi obtido através da soma dos parâmetros Eritema, Escarificação e Descamação (score 0 – 12). Os pontos representam a média das avaliações dos animais de cada grupo (n = 6 – 8 animais) ao longo do protocolo experimental. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (*Two- way ANOVA*), seguida pelo teste de *Newman-Keuls*. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao grupo WT, *** p<0,001

Resultados semelhantes foram observados após o tratamento de animais WT, ao longo do protocolo experimental, com SSR240612C (antagonista seletivo de B₁R) ou FR173657 (antagonista seletivo de B₂R) (Figura 9 e 10). Assim, o tratamento com ambos os antagonistas promoveu menos descamação, escurificação e eritema, quando comparados ao grupo veículo (dados não mostrados). Conseqüentemente, os grupos que receberam SSR240612C e FR173657 apresentaram menores escores PASI, indicando redução da severidade do processo psoriático induzido por IMQ, em todas as doses avaliadas, em comparação ao grupo veículo (DMSO 0,03% v/v) ($p < 0,05$) (Figura 9B e 10B).

O grupo veículo não apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo IMQ, indicando que a administração de DMSO (0,03% v/v; i.p) não interferiu no processo de psoríase induzido pelo IMQ (Figura 9 e 10).

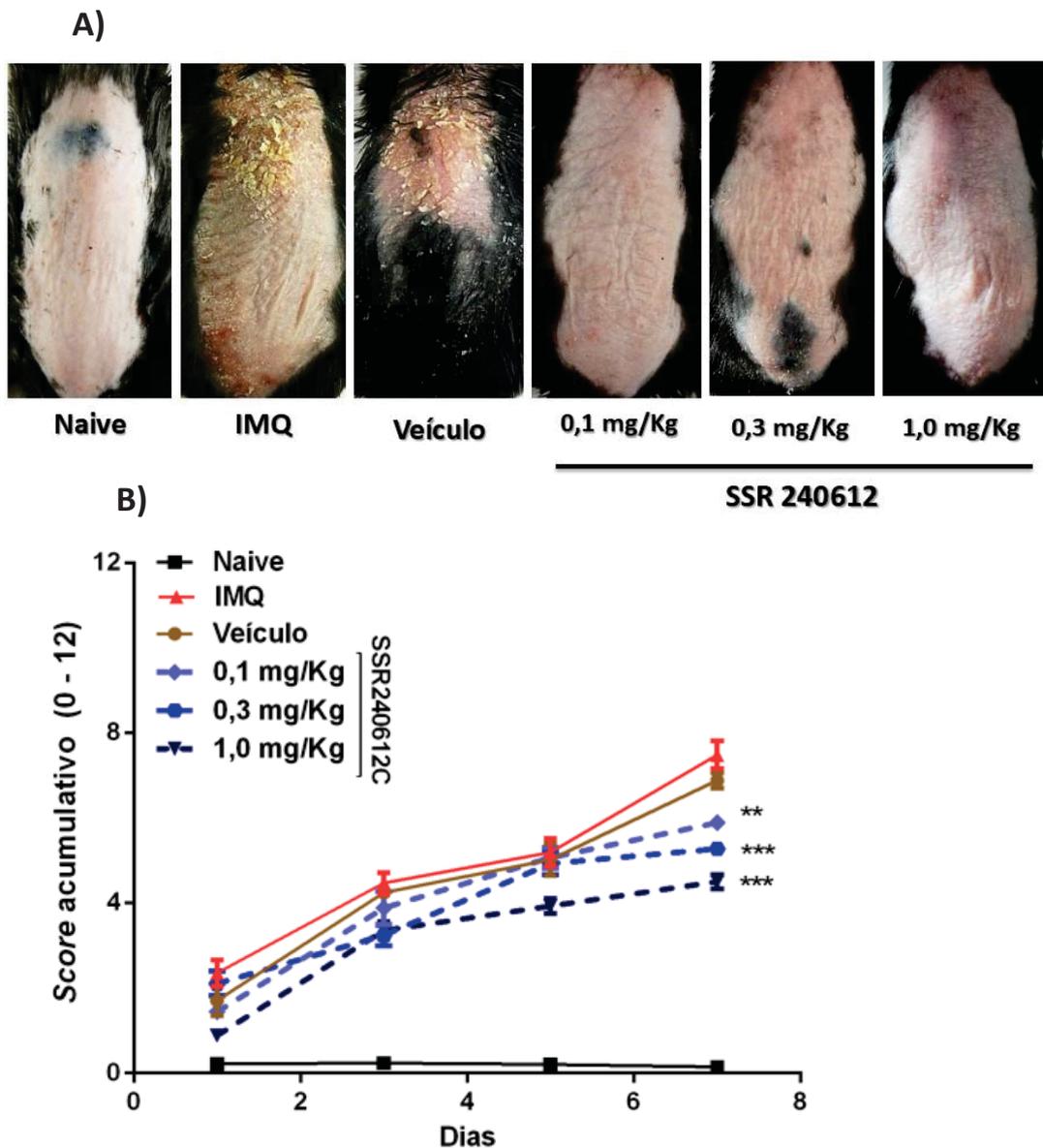
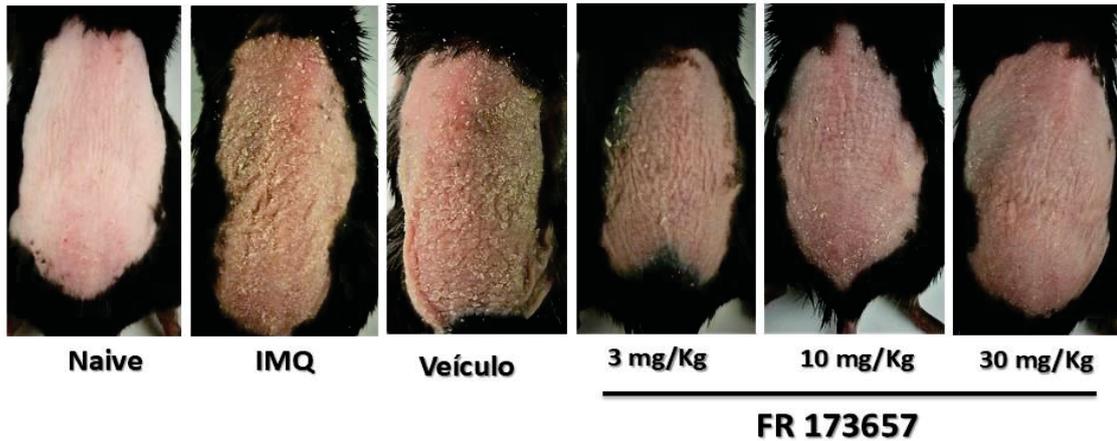


Figura 9. Avaliação da participação do receptor B₁ das cininas na formação e progressão das lesões tipo psoriáticas induzidas por múltiplas aplicações de IMQ Objetivando verificar a participação do receptor B₁ das cininas no processo psoriático, animais foram submetidos ao modelo de inflamação crônica induzida por aplicações múltiplas de IMQ. Neste modelo experimental, a indução do processo inflamatório é realizada uma vez ao dia, por seis dias. Sendo que, 30 minutos antes da aplicação tópica de IMQ, os animais receberam diariamente a administração (i.p) de SSR240612C (antagonista seletivo para o receptor B₁ das cininas) em diferentes doses (0,1; 0,3 ou 1,0 mg/Kg) ou o veículo utilizado (DMSO 0.03%, v/v). Com o intuito de avaliar a gravidade do quadro psoriático ao longo do período experimental foram realizados registros fotográficos diários e avaliações utilizando o índice PASI. (A) Fotos representativas da lesão psoriática (7^o dia) de animais que receberam pré-tratamento diário com diferentes doses (0,1; 0,3 ou 1,0 mg/Kg) do antagonista do receptor B₁ das cininas (SSR240612C), ao longo do protocolo experimental. (B) O score acumulativo foi obtido através da soma dos parâmetros Eritema, Escarificação e Descamação (score 0 – 12). Os pontos representam a média das avaliações dos animais de cada grupo (n = 6 – 8 animais), ao longo do protocolo experimental. A análise estatística foi verificada através da análise de variância (*Two -way ANOVA*), seguida pelo teste de *Newman-Keuls*. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao grupo veículo, * p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001.

A)



B)

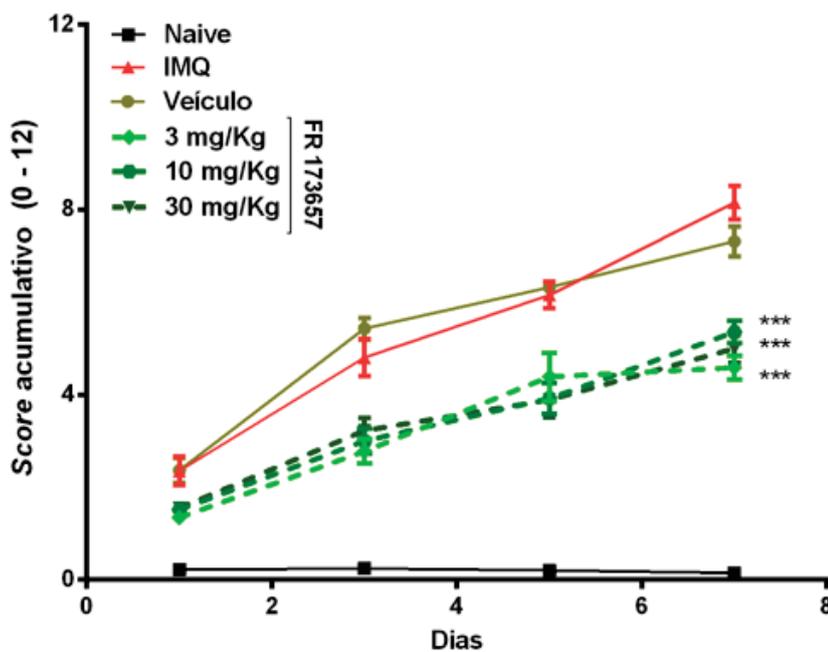


Figura 10. Avaliação da participação do receptor B₂ das cininas na formação e sustentação do processo inflamatório crônico tipo psoriático induzido por IMQ. Objetivando verificar a participação do receptor B₂ das cininas no processo psoriático, animais C57BL/6 foram submetidos ao modelo de psoríase induzida por aplicações múltiplas de IMQ. Neste modelo experimental, a indução do processo inflamatório é realizada uma vez ao dia, por seis dias. Sendo que, 30 minutos antes da aplicação tópica de IMQ, os animais receberam diariamente a administração (i.p) de FR173657 (antagonista seletivo do receptor B₂ das cininas) em diferentes doses (3; 10 e 30 mg/Kg), ou o veículo (DMSO - 0,03% v/v). Com o intuito de avaliar a gravidade do quadro psoriático ao longo do período experimental foram realizados diariamente registros fotográficos e avaliações utilizando o índice PASI. (A) Fotos representativas da lesão psoriática (7° dia) de animais que receberam pré-tratamento diário com diferentes doses (3; 10 ou 30 mg/Kg) do antagonista do receptor B₂ das cininas (FR 173657), durante o modelo experimental. (B) O score acumulativo foi obtido através da soma dos parâmetros Eritema, Escarificação e Descamação (score 0 – 12). Os pontos representam a média das avaliações dos animais de cada grupo (n = 6 – 8 animais), ao longo do protocolo experimental. A análise estatística foi verificada através da análise de variância (Two-way ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao grupo WT, * p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001.

5.3 INFLUÊNCIA DOS RECEPTORES DAS CININAS NAS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS CARACTERÍSTICAS DA PSORÍASE

Na tentativa de avaliar a relevância dos receptores de cininas na psoríase, amostras de pele foram coletadas no último dia do protocolo experimental (7º dia). A análise histopatológica, como apresentada na Fig. 11, demonstra que os camundongos WT que receberam IMQ apresentaram lesões características da psoríase, ou seja, espessamento epidérmico e intenso infiltrado celular (Figura 11 e 12). Assim, quantificações mostraram aumento significativo do número de núcleos corados ($125,00 \pm 18,25\%$) na derme de animais WT tratados com IMQ, indicando aumento do infiltrado celular, em comparação com o grupo Naive ($p < 0,05$) (Figura 11 e 12). Em contraste, foi observada redução da celularidade dermal nas lesões psoriáticas, induzidas por IMQ, de animais com ausência de receptores cininérgicos (Figura 11 e 12A). As reduções no influxo celular foram de $80,16 \pm 6,26\%$ (KOB₁), $98,27 \pm 5,92\%$ (KOB₂) e $94,01 \pm 5,22\%$ (KOB₁B₂), quando comparados ao grupo controle WT (média de 211 células/campo) ($p < 0,001$) (Figura 11 e 12A).

As mensurações também mostraram evidências de hiperplasia epidérmica induzida pelo IMQ, havendo espessamento da epiderme de animais do grupo WT (aumento de $174,78 \pm 8,36\%$), relativo ao grupo Naive (média de $6,18 \mu\text{m}$) ($p < 0,001$) (Figura 11 e 12B). Como ilustrado na Figura 12B, os animais nocautes para os receptores das cininas apresentaram redução do espessamento epidérmico induzido por IMQ, havendo reduções iguais a $12,19 \pm 3,34\%$ (KOB₁), $11,88 \pm 4,84\%$ (KOB₂) e $25,93 \pm 2,41\%$ (KOB₁B₂), quando comparado ao grupo WT (Figura 11 e 12B). O que sugere que os receptores cininérgicos podem estar envolvidos na modulação da taxa de proliferação dos queratinócitos, durante processos hiperproliferativos.

Conforme representado nas Figuras 11 e 12, não foram observadas diferenças significativas na celularidade e espessura da epiderme de animais nocautes Naive (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂), quando comparados ao grupo WT naive ($p > 0,05$).

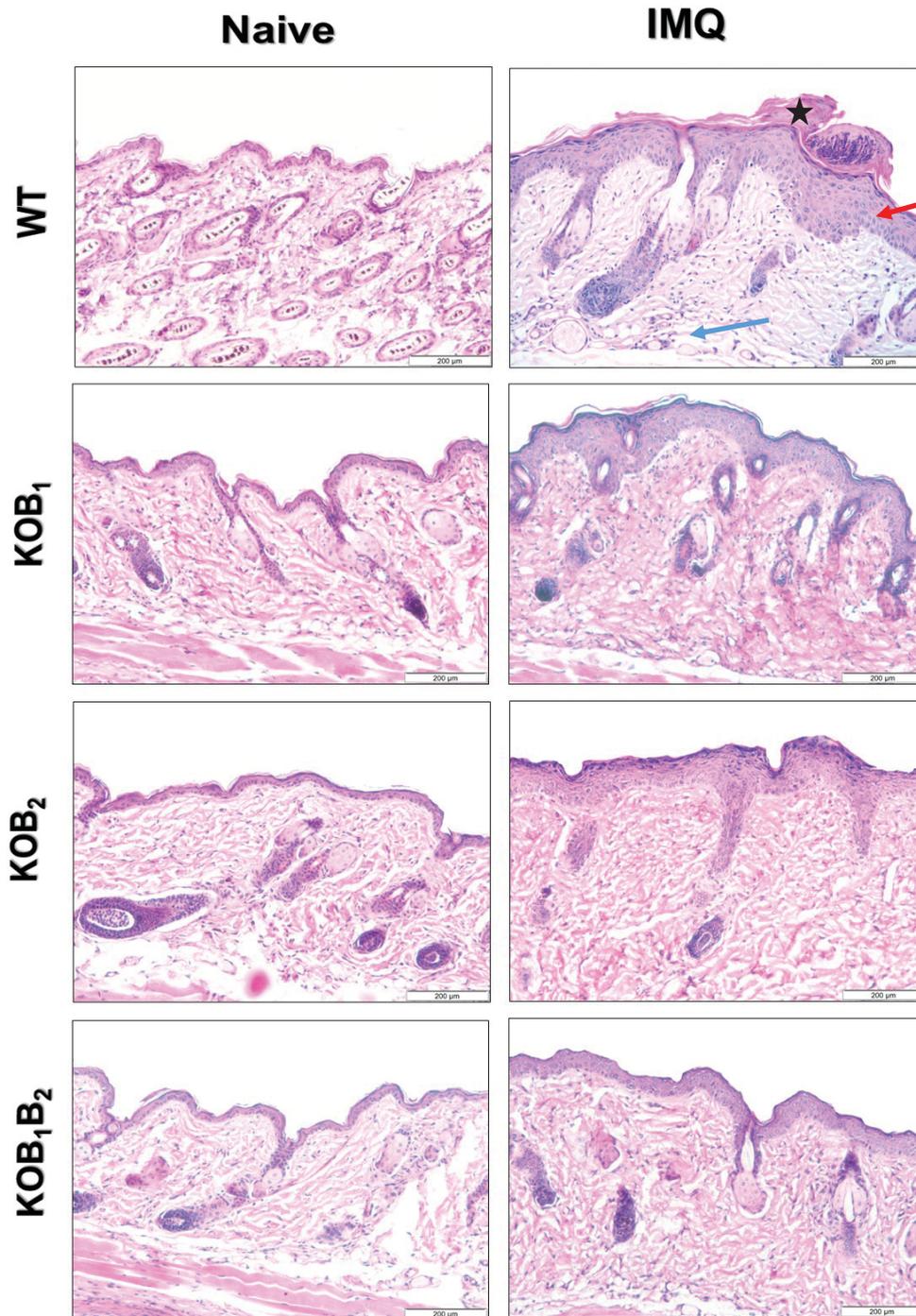


Figura 11. Fotos representativas da histologia da pele de animais nocautes para os receptores das cininas (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂) e animais WT submetidos ao modelo de inflamação crônica tipo psoriática induzida por IMQ. Amostras teciduais (6 mm) foram coletadas no 7° dia do protocolo experimental com o auxílio de um *punch*. Posteriormente, as biópsias foram fixadas em ALFAC, desidratadas, emblocadas, seccionadas em cortes de 5 µm e coradas com hematoxilina e eosina (H.E). As imagens foram adquiridas com microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão). A flecha azul indica região de intensa celularidade na derme; a flecha vermelha indica hiperplasia epidermal; e a estrela aponta hiperqueratose induzida por IMQ (Aumento de 200x, escala de 200µm).

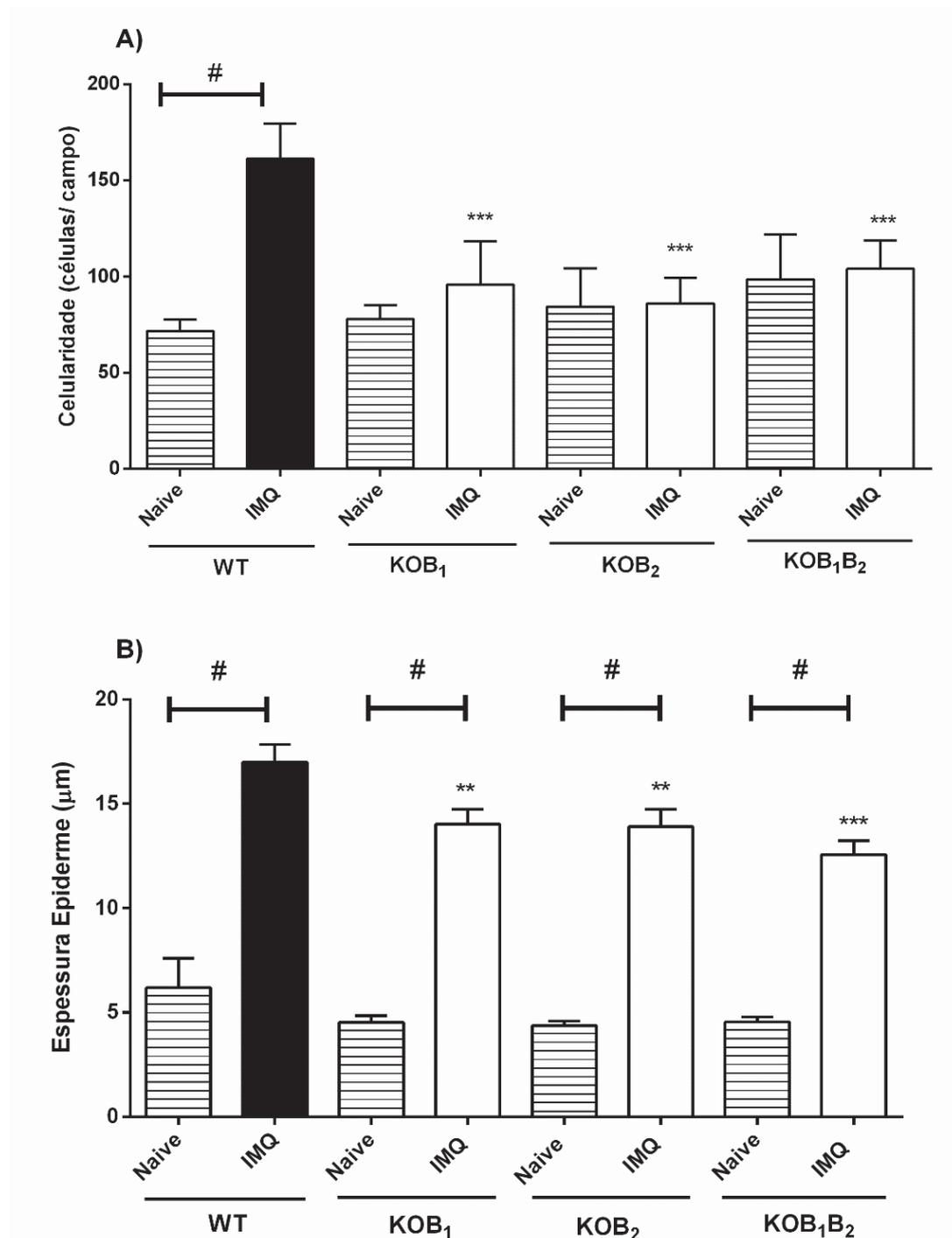


Figura 12. Influência do receptor B₁ e B₂ das cininas no infiltrado celular e espessamento epidermal induzida por IMQ. Camundongos C57BL/6 nocautes para os receptores das cininas (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂) e WT (controle), receberam administrações tópicas de IMQ (80mg/dia), durante 6 dias. No último dia do modelo experimental, os animais foram eutanasiados e amostras da pele coletadas e submetidas à análise histológica. (A) quantificação da celularidade e (B) mensuração da espessura da epiderme realizadas com o auxílio do *software ImageJ*®. As barras verticais representam a média ± E.P.M (n=6-8) de cada grupo. A análise estatística foi verificada através da análise de variância (*One-way ANOVA*), seguida pelo teste de *Newman-Keuls*. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao grupo WT, * p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001. # Denota diferença estatística entre o grupo Naive e IMQ (p<0,05).

Consistente com os resultados obtidos em animais nocautes para o receptor B₁ (KOB₁), o número de células infiltradas na pele psoriática foi significativamente reduzido nos grupos pré-tratados com SSR240612C, sendo estas reduções de $34,56 \pm 9,58\%$ (0,1 mg/Kg), $39,57 \pm 4,05\%$ (0,3 mg/Kg) e $54,61 \pm 2,51\%$ (1,0 mg/Kg), quando comparados ao grupo veículo (média de 122 células/campo) (Figura 13 e 14A). Semelhantemente, mensurações mostraram que o bloqueio farmacológico do receptor B₁ das cininas promoveu redução de $44,80 \pm 0,71\%$ (0,1 mg/Kg), $41,69 \pm 0,68\%$ (0,3 mg/Kg) e $44,92 \pm 0,64\%$ (1,0 mg/Kg) no espessamento epidermico induzido por IMQ, quando comparado ao grupo veículo (média de 21,44 μ m) (Figura 13 e 14B).

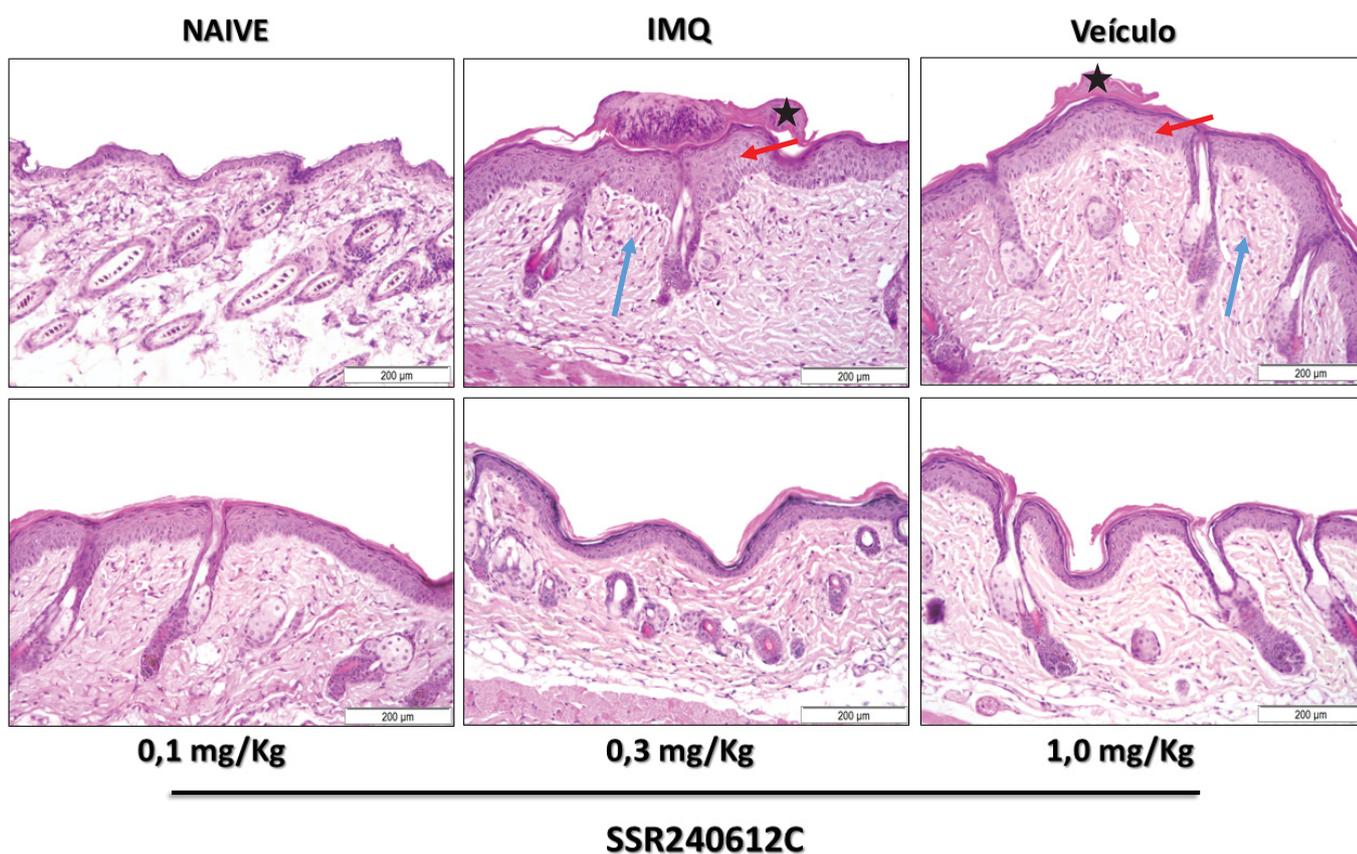


Figura 13. Fotos representativas da histologia da pele de animais tratamentos com **SSR240612C** na psoríase induzida por IMQ. As amostras teciduais (6 mm) foram coletadas no sétimo e último dia do protocolo experimental. Posteriormente, as biópsias foram fixadas em ALFAC, desidratadas, emblocadas, seccionadas em cortes de 5 μ m e coradas com H.E. As imagens foram adquiridas com microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão). A flecha azul indica região de intensa celularidade na derme; a flecha vermelha indica hiperplasia epidermal; e a estrela aponta hiperqueratose induzida por IMQ (Aumento de 200x, escala de 200 μ m).

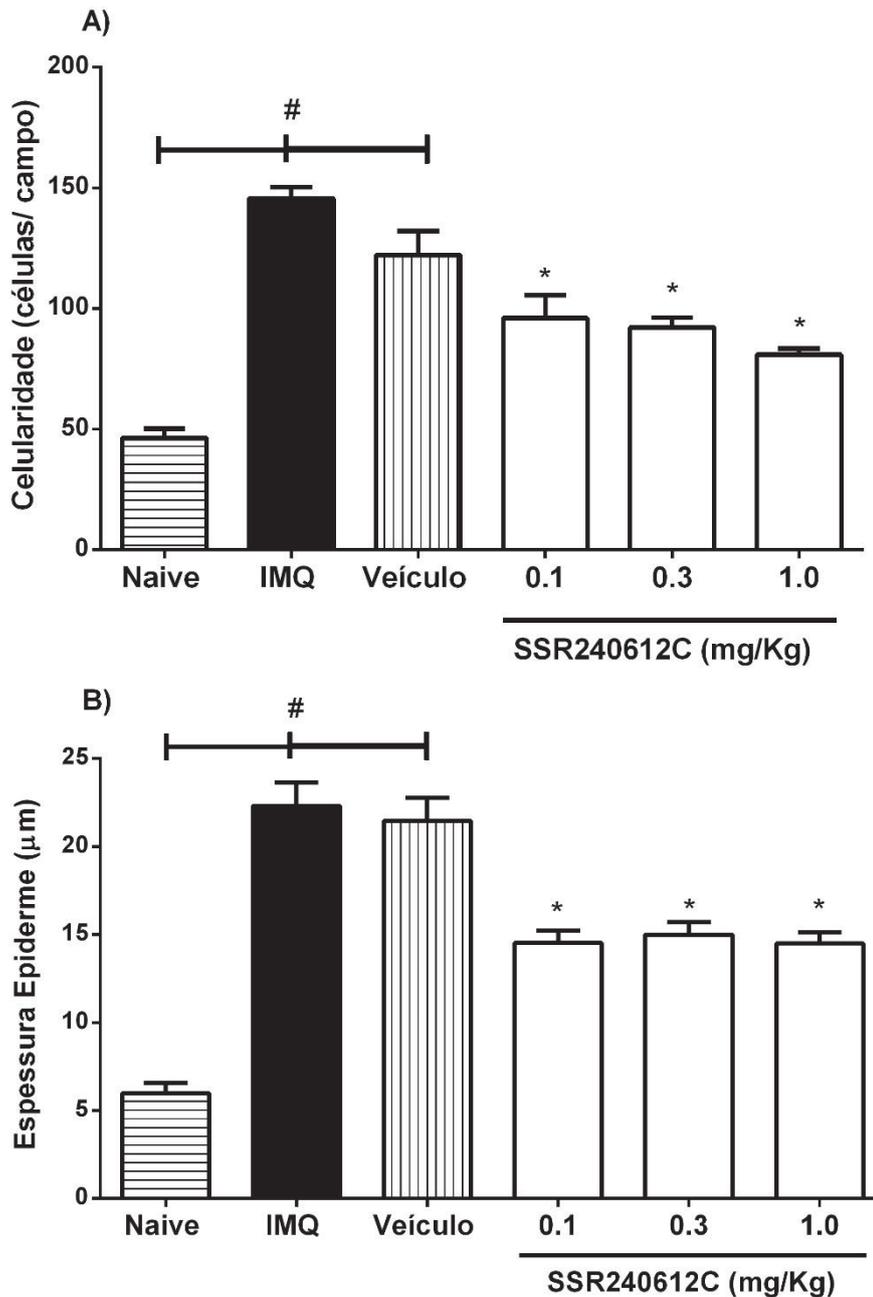


Figura 14. Efeito do bloqueio farmacológico do receptor B₁ das cininas no infiltrado celular e na espessura da epiderme de animais submetidos ao modelo de inflamação crônica tipo psoriática induzida por IMQ. Com o intuito de verificar a participação do receptor B₁ das cininas no processo psoriático, animais foram submetidos ao modelo de inflamação crônica induzida por aplicações múltiplas de IMQ. Sendo que, 30 min antes da aplicação tópica de IMQ, os animais receberam diariamente a administração (i.p.) de SSR240612C (antagonista seletivo para o receptor B₁ das cininas) em diferentes doses (0,1; 0,3 e 1,0 mg/Kg), assim como, o veículo utilizado (DMSO -0,03% v/v). No sétimo dia, os animais foram eutanasiados e amostras da pele coletadas e submetidas à análise histológica. (A) Quantificação do influxo celular e (B) mensuração da espessura da epiderme realizadas com o auxílio do *software* ImageJ®. As barras verticais representam a média ± EPM (n=5-6) de cada grupo. A análise estatística foi verificada através da análise de variância (*One-way ANOVA*), seguida pelo teste de *Newman-Keuls*. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao grupo veículo, ** p<0,01 e *** p<0,001. # Denota diferença estatística entre o grupo Naive e IMQ (p<0,05), ou Naive e veículo (p<0,05).

Em adição, como ilustrado na Figuras 15 e 16A, o número de leucócitos infiltrados foi acentuadamente atenuado em animais tratados com FR172357, relativo ao grupo veículo (média de 175 células/campo). Sendo estas reduções iguais a $74,28 \pm 5,23\%$ (3 mg/Kg), $72,77 \pm 5,55\%$ (10 mg/Kg) e $87,62 \pm 4,22\%$ (30 mg/Kg), quando comparados ao grupo veículo (Figuras 15 e 16A).

Da mesma forma, o bloqueio farmacológico do receptor B₂ foi capaz de reduzir a hiperplasia epidermal induzida por IMQ nos grupos tratados com 3 mg/Kg ($44,03 \pm 0,59\%$), 10 mg/Kg ($32,72 \pm 0,74\%$) e 30 mg/Kg ($30,94 \pm 0,79\%$) de FR 172357, comparado ao grupo veículo (espessura média de 21,44 μm) (Figura 15 e 16B).

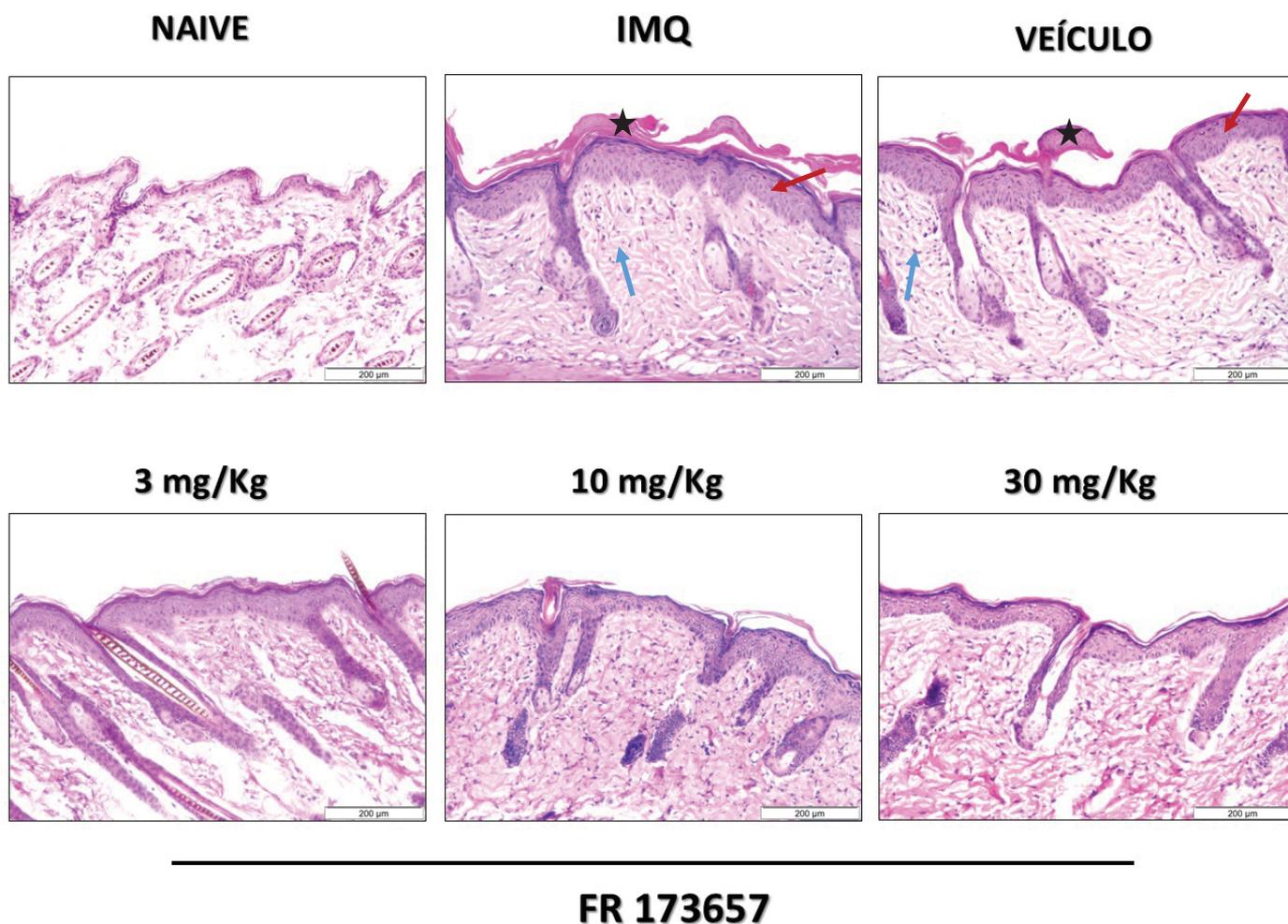


Figura 15. Fotos representativas da histologia da pele de animais que receberam diariamente o tratamento com FR 173657 ao longo do modelo psoríase induzida por IMQ. As amostras teciduais (6 mm) foram coletadas no sétimo, e último dia do protocolo experimental, com o auxílio de um *punch*. Posteriormente, as biópsias foram fixadas em ALFAC, desidratadas, emblocadas, seccionadas em contes de 5 μm e coradas com H.E. As imagens foram adquiridas com microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão). A flecha azul indica região de intensa celularidade na derme; a flecha vermelha indica hiperplasia epidermal; e a estrela aponta hiperqueratose induzida por IMQ (Aumento de 200x, escala de 200 μm).

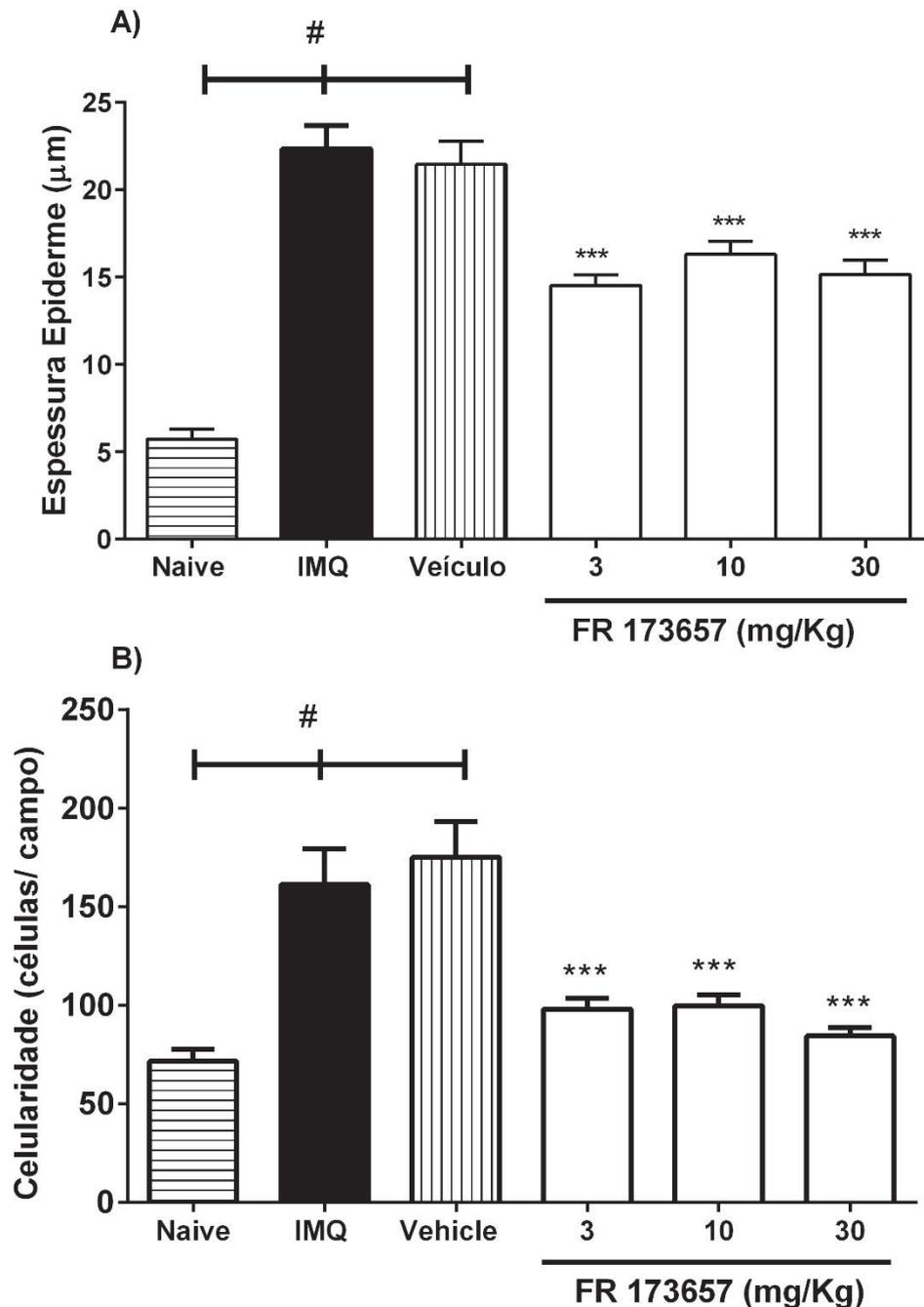


Figura 16. Efeito do antagonista dos receptores B_2 das cininas no infiltrado celular e no espessamento da epiderme induzido por IMQ. Com o intuito de verificar a participação do receptor B_2 das cininas no processo psoriático, animais foram submetidos ao modelo de inflamação crônica tipo psoriática induzida por IMQ (80 mg/dia). Sendo que, 30 minutos antes da aplicação tópica de IMQ, os animais receberam administrações diárias (i.p) de FR 173657 (antagonista seletivo do receptor B_2 das cininas) em diferentes doses (3;10 e 30 mg/Kg), ou o veículo utilizado (DMSO -0,03% v/v). No sétimo dia, os animais foram eutanasiados e amostras da pele coletadas e submetidas à análise histológica. A quantificação do (A) influxo celular e (B) a mensuração da espessura da epiderme foram realizadas com o auxílio do *software ImageJ®*. As barras verticais representam a média \pm E.P.M (n=6-8) de cada grupo. A análise estatística foi verificada através da análise de variância (*One-way ANOVA*), seguida pelo teste de *Newman-Keuls*. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao grupo veículo, *** $p < 0,001$. # Denota diferença estatística entre o grupo Naive e IMQ ($p < 0,05$), ou Naive e veículo ($p < 0,05$).

A fim de verificar a possível influência dos receptores B₁ e B₂ de cininas na modulação da proliferação de queratinócitos durante processos inflamatórios, investigamos a presença de células imunomarcadas para o PCNA (PCNA – do inglês, *Proliferating cell nuclear antigen*). Esta análise revelou que o número de células positivas para PCNA foi maior na lesão psoriática de camundongos WT tratados com IMQ (aumento de $58,47 \pm 2,95\%$), com os queratinócitos corados dispostos ao longo das diferentes camadas da epiderme, refletindo uma proliferação desregulada (Figura 17A e B). Por outro lado, reduções na taxa de proliferação de queratinócitos foram observadas em animais tratados com IMQ que não expressam receptores de cininas B₁ e B₂ (Figura 17A e B). Assim, resultados mostraram redução no número de queratinócitos corados em KOB₁ ($28,02 \pm 4,16\%$), KOB₂ ($12,05 \pm 1,49\%$) e KOB₁B₂ ($46,91 \pm 5,22\%$), comparado ao grupo WT (média de 55 células positivas/campo) (Figura 17B). Animais Naive apresentam poucos queratinócitos imunomarcados para PCNA, estando estes localizadas, principalmente, na camada basal da epiderme (média de 21 células positivas/campo) (Figura 17A).

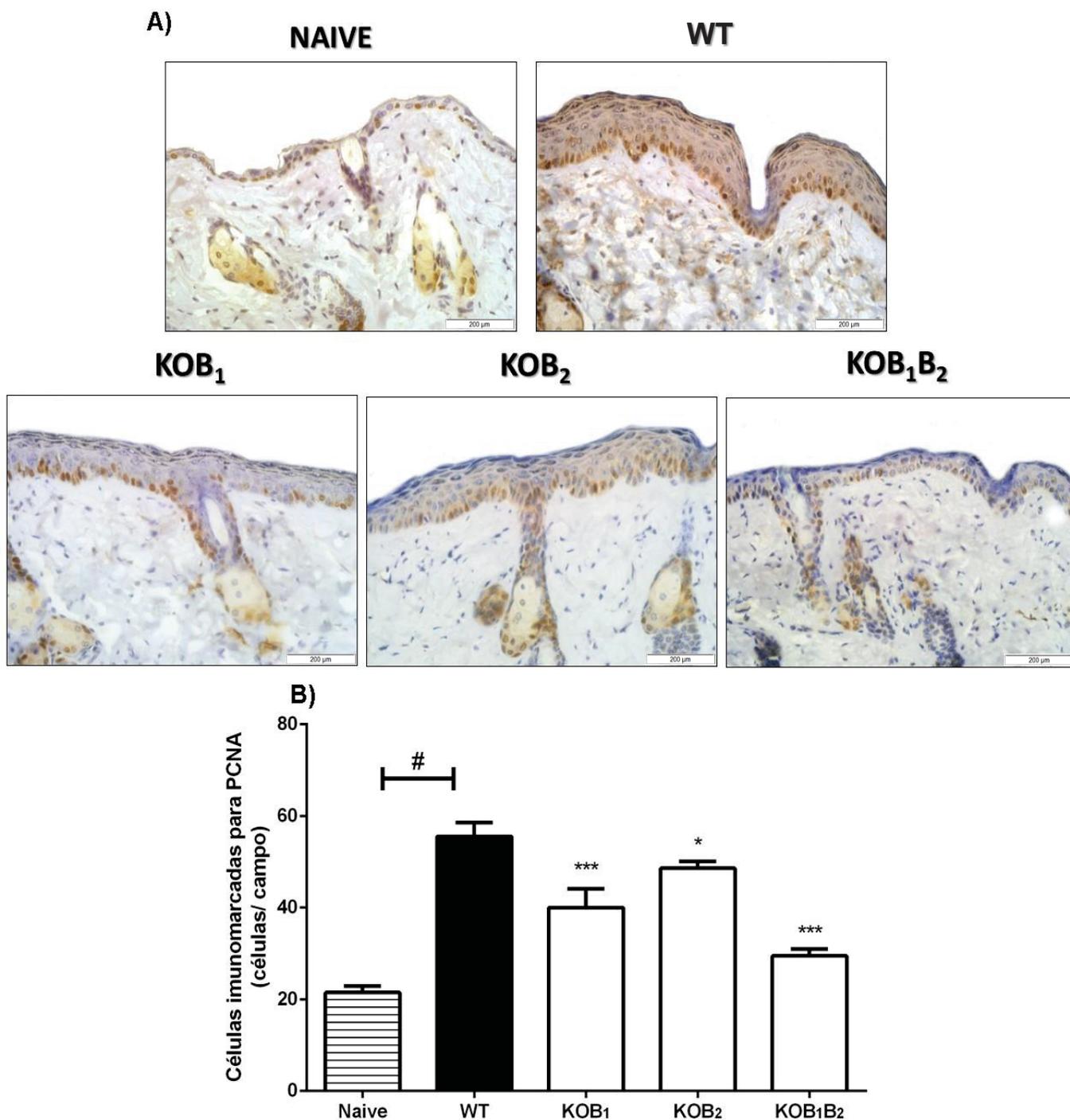


Figura 17. Avaliação da hiperproliferação de queratinócitos causada por IMQ em animais nocautes para os receptores das cininas. Camundongos nocautes para os receptores das cininas (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂) e WT receberam administrações tópicas de IMQ (80 mg/dia), durante 6 dias. No último dia do modelo experimental, os animais foram eutanasiados e amostras da pele coletadas e submetidas à avaliação imunohistoquímica do PCNA. (A) Fotos representativas de queratinócitos imunomarcados para PCNA em cada um dos grupos experimentais. (B) A quantificação do número de queratinócitos positivamente marcados para PCNA, realizada com o auxílio do *software ImageJ*®. As barras verticais representam a média \pm E.P.M (n=6-8) de cada grupo. A análise estatística foi verificada através da análise de variância (*One-way ANOVA*), seguida pelo teste de *Newman-Keuls*. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao grupo WT, * p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001. # Denota diferença estatística entre o grupo Naive e IMQ (p<0,05) (Aumento de 400x, escala de 200 μ m).

Como representado na Figura 18, os resultados mostraram que o tratamento diário dos animais com SSR240612C foi capaz de reverter em $36,64 \pm 3,41\%$ (0,1 mg/Kg), $41,09 \pm 2,05\%$ (0,3 mg/Kg) e $66,78 \pm 2,06\%$ (1,0 mg/Kg) a hiperproliferação dos queratinócitos induzida por IMQ, quando comparado ao grupo veículo (média de 54 células positivas/campo) ($p < 0,05$) (Figura 19B). Adicionalmente, o bloqueio farmacológico do receptor B₂ das cininas resultou em menos queratinócitos marcados positivamente para PCNA em animais tratados com 10 mg/Kg ($32,98 \pm 2,51\%$) e 30 mg/Kg ($54,14 \pm 1,14\%$) de FR 172357, comparado ao grupo veículo (média de 53 células positivas/campo) (Figura 19 A e B). Mais uma vez, no grupo tratado com veículo (0,03% DMSO v/v) não foi observada diferença quando comparado ao grupo IMQ ($p > 0,05$).

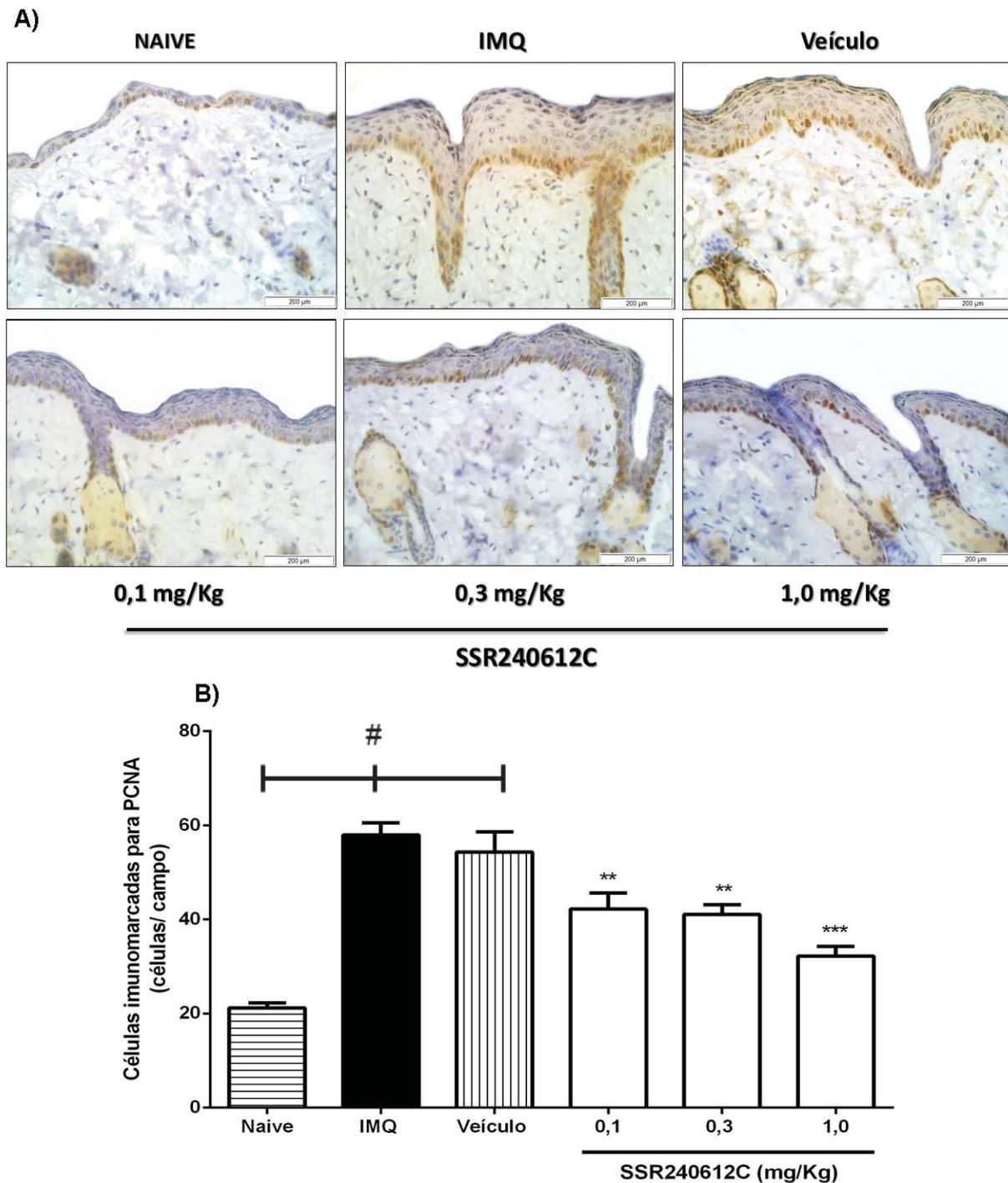


Figura 18. Efeito do antagonista dos receptores B₁ das cininas na hiperproliferação de queratinócitos induzida por IMQ. Camundongos foram submetidos ao modelo de inflamação crônica tipo psoriática induzida por IMQ. Sendo que, 30 min antes da aplicação tópica de IMQ, os animais receberam administração diárias (i.p) de SSR240612C (antagonista seletivo para o receptor B₁ das cininas) em diferentes doses (0,1; 0,3 ou 1,0 mg/Kg), ou veículo (DMSO -0,03% v/v). No último dia do modelo experimental, os animais foram eutanasiados e amostras da pele coletadas e submetidas à avaliação de queratinócitos positivos para PCNA. (A) Fotos representativas de queratinócitos imunomarcados para PCNA em cada um dos grupos experimentais. (B) Quantificação do número de queratinócitos positivamente marcados para PCNA realizada com o *software* ImageJ®. As barras verticais representam a média ± E.P.M (n=6-8) de cada grupo. A análise estatística foi verificada através da análise de variância (*One-way ANOVA*), seguida pelo teste de *Newman-Keuls*. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao grupo veículo, ** p<0,01 e *** p<0,001. # Denota diferença estatística entre o grupo Naive e IMQ (p<0,05), ou Naive e veículo (p<0,05). (Aumento de 400x, escala de 200µm).

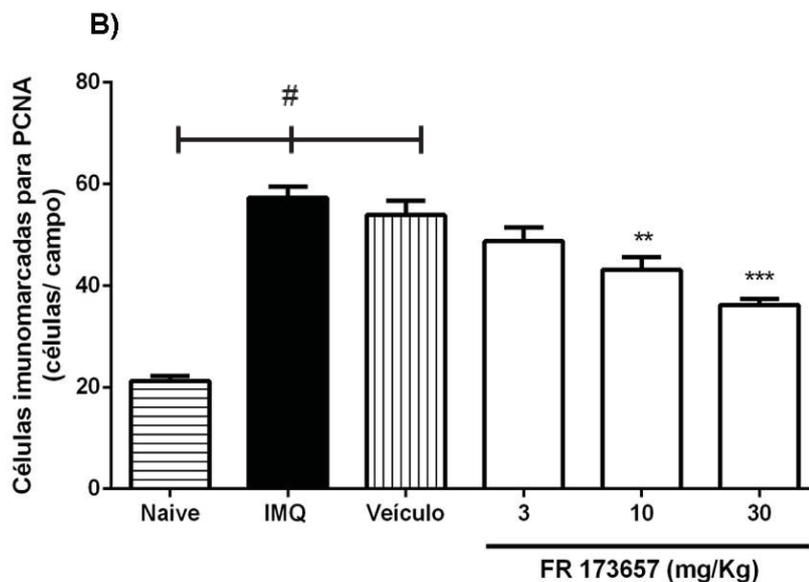
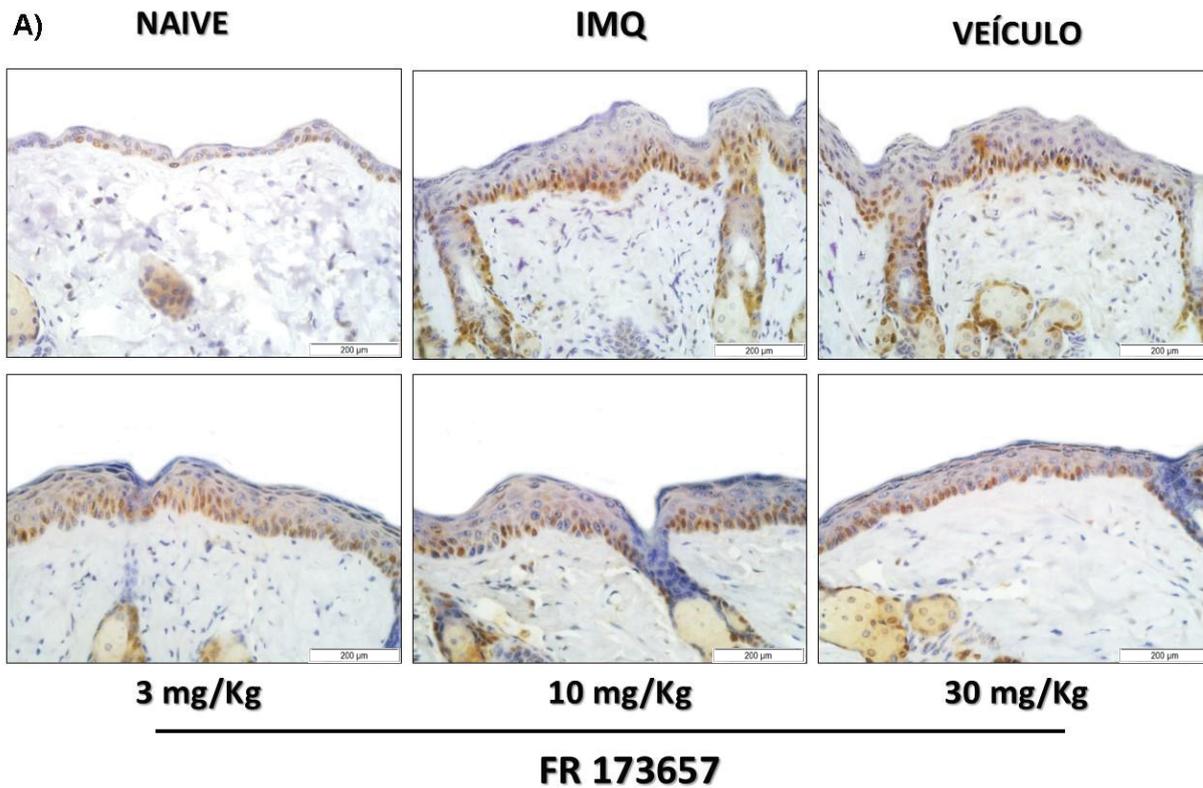


Figura 19. Efeito do antagonista de receptores B₂ na modulação da proliferação de queratinócitos durante o processo psoriático induzido por IMQ. Camundongos foram submetidos ao modelo de psoríase induzida por aplicações de IMQ. Neste modelo experimental, a indução do processo inflamatório é realizada uma vez ao dia, por seis dias. Sendo que, 30 minutos antes da aplicação tópica de IMQ, os animais receberam diariamente a administração (i.p) de FR 173657 (antagonista seletivo do receptor B₂ das cininas) em diferentes doses (3; 10 e 30 mg/Kg), ou o veículo (DMSO -0,03% v/v). No último dia do modelo experimental, os animais foram eutanasiados e amostras da pele coletadas e submetidas à avaliação imunohistoquímica para PCNA. (A) Fotos representativas de queratinócitos imunomarcados para PCNA em cada um dos grupos experimentais. (B) A quantificação do número de queratinócitos positivamente marcados para PCNA, realizada com o *software* ImageJ®. As barras verticais representam a média ± E.P.M (n=6-8) de cada grupo. A análise estatística foi verificada através da análise de variância (*One-way* ANOVA), seguida pelo teste de *Newman-Keuls*. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao grupo veículo, ** p<0,01 e *** p<0,001. # Denota diferença estatística entre o grupo Naive e IMQ (p<0,05), ou Naive e veículo (p<0,05). (Aumento de 400x, escala de 200µm).

Objetivando verificar a participação dos receptores cininérgicos no processo de diferenciação de queratinócitos, foi realizada a análise imunohistoquímica da citoqueratina 14 (K14) em amostras da pele de animais submetidos ao modelo de psoríase induzida por IMQ.

Células coradas com K14 estão localizadas na camada basal da epiderme de animais Naive (média de 20 células positivas/campo) (Figura 20A). Em contraste, o número de queratinócitos positivos para K14 foram significativamente aumentados em camundongos WT tratados com IMQ (aumento de $38,95 \pm 3,44\%$), refletindo redução do processo de diferenciação celular na epiderme (Figura 20A).

Como mostrado na Figura 20B, a ausência dos receptores B₁ e B₂ das cininas reduziu em $19,69 \pm 2,05\%$ (KOB₁) e $25,15 \pm 3,88\%$ (KOB₂) o número de queratinócitos K14-positivos, quando comparado com WT tratado com IMQ (média de 49 células positivas/campo) (Figura 20B). Da mesma forma, a ausência de ambos os receptores cininérgicos (KOB₁B₂) reestabeleceu em $32,18 \pm 2,66\%$ a diferenciação dos queratinócitos, ambos comparados ao grupo WT (Figura 13B).

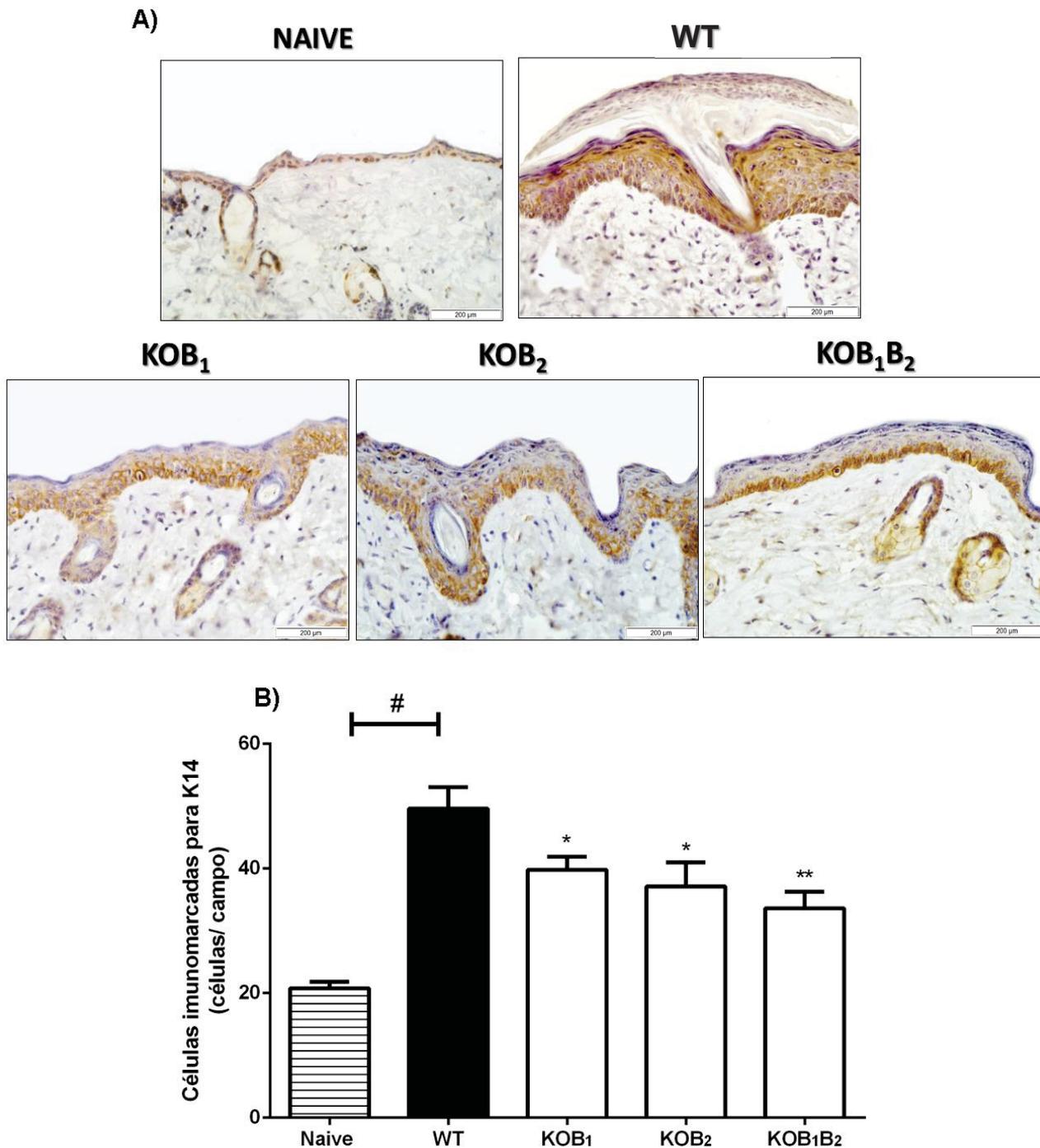


Figura 20. Análise do envolvimento dos receptores das cininas no processo de diferenciação de queratinócitos. Camundongos C57BL/6 nocautes para os receptores das cininas (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂) e *wild type* (WT), receberam administrações tópicas de IMQ (80mg/dia), durante 6 dias. No último dia do modelo experimental, os animais foram eutanasiados e amostras da pele coletadas e submetidas à avaliação de células imunopositivas para K14. (A) Fotos representativas de queratinócitos imunomarcados para K14 em cada um dos grupos experimentais. (B) Quantificação do número de queratinócitos imunomarcados para K14, realizada com o auxílio do *software ImageJ*®. As barras verticais representam a média ± E.P.M (n=6-8) de cada grupo. A análise estatística foi verificada através da análise de variância (*One-way ANOVA*), seguida pelo teste de *Newman-Keuls*. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao grupo WT, * p<0,05 e ** p<0,01. # Denota diferença estatística entre o grupo Naive e IMQ (p<0,05) (Aumento de 400x, escala de 200μm).

Corroborando com os resultados anteriores, conforme ilustrado na Figura 21, o bloqueio do receptor B₁ das cininas por SSR240612C (1,0 mg/Kg) reduziu em $42,05 \pm 0,71\%$ o número de queratinócitos indiferenciados, induzido por IMQ, quando comparado ao grupo veículo (média de 50 células positivas/campo) ($p < 0,05$) (Figura 21B).

Do mesmo modo, a administração de FR172357 inibiu o aumento de queratinócitos marcados positivamente para K14 nas doses de 10 mg/Kg ($51,62 \pm 3,05\%$) e 30 mg/Kg ($51,01 \pm 1,80\%$), comparado ao grupo veículo (média de 48 células positivas/campo) ($p < 0,05$) (Figura 22 A e B).

Em conjunto, esses resultados sugerem que o sistema de cininas está claramente envolvido na severidade do infiltrado de células inflamatórias, na hiperproliferação e diferenciação anormal de queratinócitos na pele psoriática

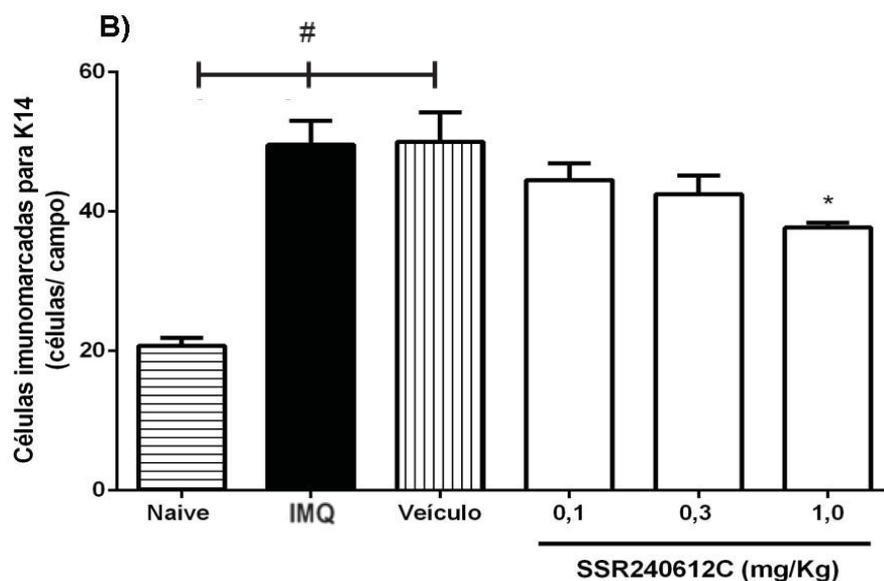
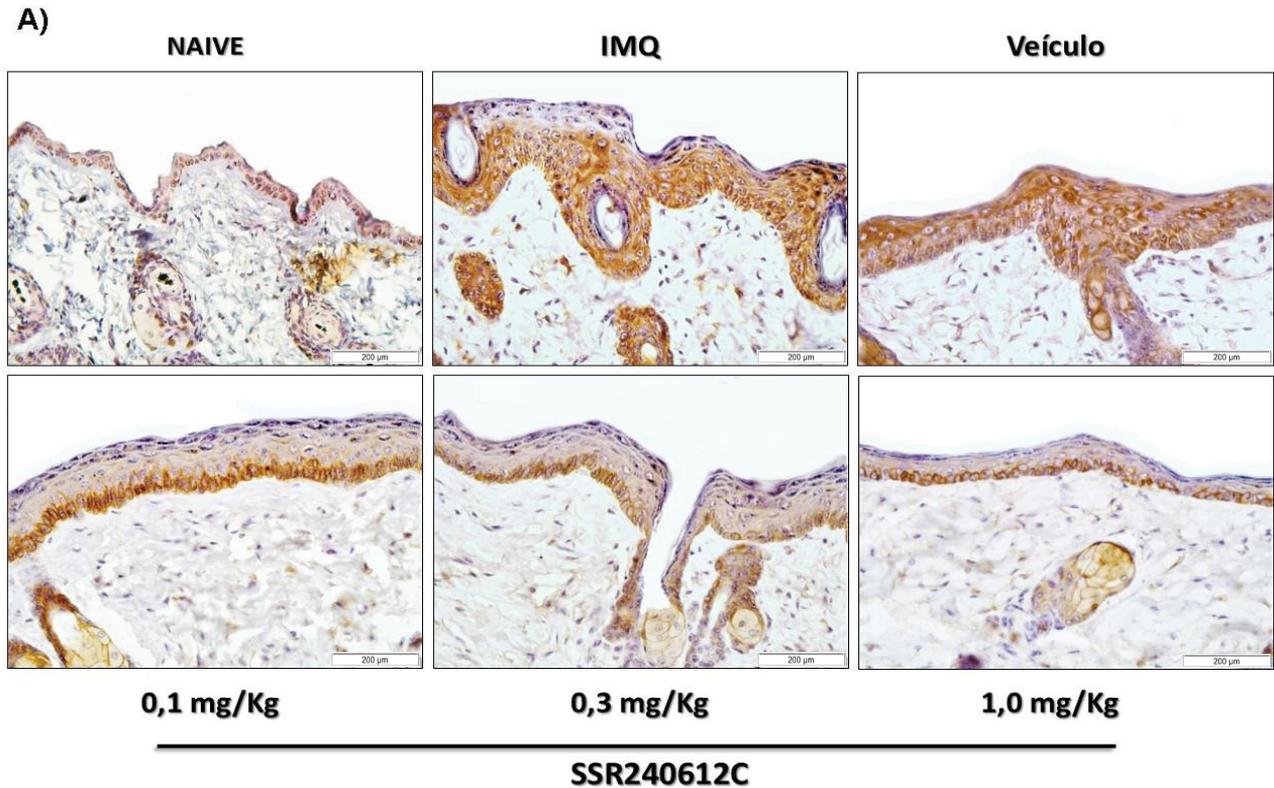


Figura 21. Influência do receptor B₁ das cininas na diferenciação de queratinócitos. Camundongos foram submetidos ao modelo de psoríase induzida por IMQ. Neste modelo experimental, a indução do processo inflamatório é realizada uma vez ao dia, por seis dias. Sendo que, 30 minutos antes da aplicação tópica de IMQ, os animais receberam diariamente a administração (i.p) de SSR240612C (antagonista seletivo para o receptor B₁ das cininas) em diferentes doses (0,1; 0,3 ou 1,0 mg/Kg), ou veículo (DMSO -0,03% v/v). No último dia do modelo experimental, os animais foram eutanasiados e amostras da pele coletadas e submetidas à avaliação de células imunopositivas para K14. (A) Fotos representativas de queratinócitos imunomarcados para K14 em cada um dos grupos experimentais. (B) Quantificação do número de queratinócitos marcados para K14, realizado com o auxílio do *software ImageJ*®. As barras verticais representam a média ± E.P.M (n=6-8) de cada grupo. A análise estatística foi verificada através da análise de variância (*One-way ANOVA*), seguida pelo teste de *Newman-Keuls*. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao grupo veículo, *p<0,05. # Denota diferença estatística entre o grupo Naive e IMQ (p<0,05), ou Naive e veículo (p<0,05). (Aumento de 400x, escala de 200µm).

A)

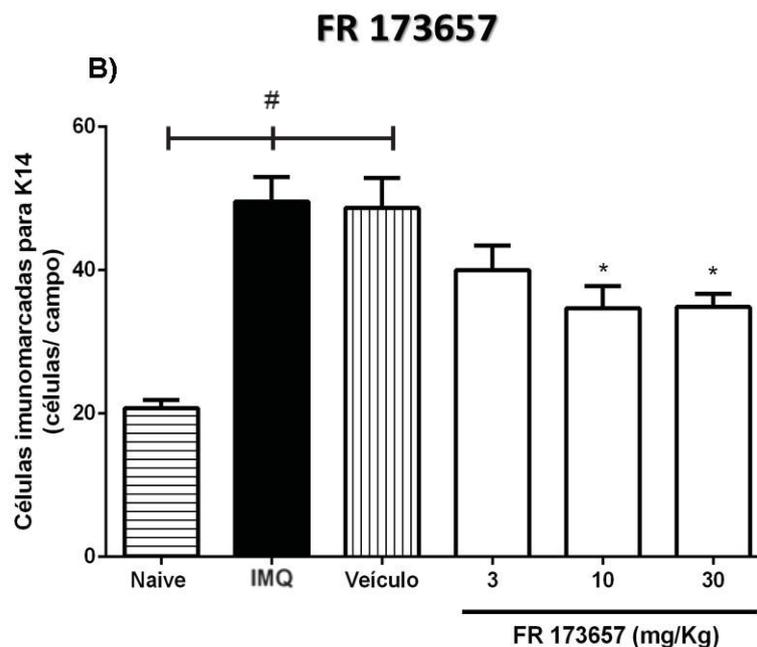
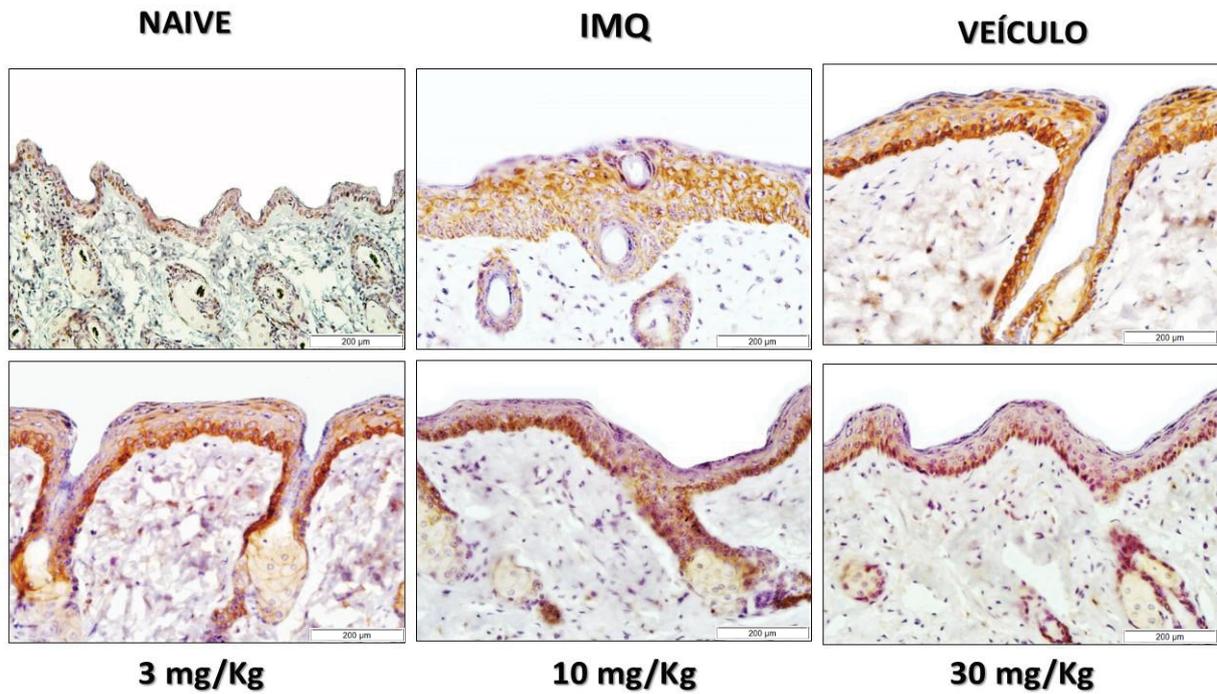


Figura 22. Participação do receptor B₂ das cininas no processo de diferenciação dos queratinócitos durante o processo inflamatório tipo psoriático induzido por IMQ. Animais foram submetidos ao modelo de psoríase induzida por IMQ. Sendo que, 30 minutos antes da aplicação tópica de IMQ, animais receberam diariamente FR 173657 (antagonista seletivo do receptor B₂ das cininas) em diferentes doses (3; 10 e 30 mg/Kg, i.p), ou veículo (DMSO -0,03% v/v). No último dia do modelo experimental, os animais foram eutanasiados e amostras da pele coletadas e submetidas à avaliação imunohistoquímica para K14. (A) Fotos representativas de queratinócitos imunomarcados para K14 em cada um dos grupos experimentais. (B) A quantificação do número de queratinócitos positivamente marcados foi realizada com o *software* ImageJ®. As barras verticais representam a média ± E.P.M (n=6-8) de cada grupo. A análise estatística foi verificada através da análise de variância (One-way ANOVA), seguida pelo teste de *Newman-Keuls*. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao grupo veículo, * p<0,05. # Denota diferença estatística entre o grupo Naive e IMQ (p<0,05), ou Naive e veículo (p<0,05). (Aumento de 400x, escala de 200µm).

5.4 ANÁLISE DO EFEITO DO TRATAMENTO COM CAPTOPRIL NO PROCESSO PSORIÁTICO INDUZIDO POR IMQ

Até o momento os resultados obtidos indicam participação do sistema das cininas na progressão e sustentação do processo psoriático. Assim, a próxima pergunta a ser respondida foi se o aumento de cininas no tecido inflamado poderia causar efeito oposto ao que foi observado com o silenciamento dos receptores do sistema das cininas. Para tanto, utilizamos o inibidor da ECA, uma cininase, que é responsável pela inativação das cininas e testamos no processo psoriático induzido por IMQ. Para isso, os animais receberam diariamente, 1 h antes das aplicações de IMQ, o pré-tratamento (p.o.) com diferentes doses de Captopril (10; 30 ou 100 mg/Kg), e procedemos a avaliação do eritema, escarificação e descamação utilizando o PASI como ferramenta (Figuras 23 e 24).

Os dados mostram que o tratamento com Captopril ao longo do protocolo experimental resultou em exacerbação do processo psoriático induzido por IMQ, principalmente ao intensificar a descamação na dose de 100 mg/Kg (Figuras 23 e 24C).

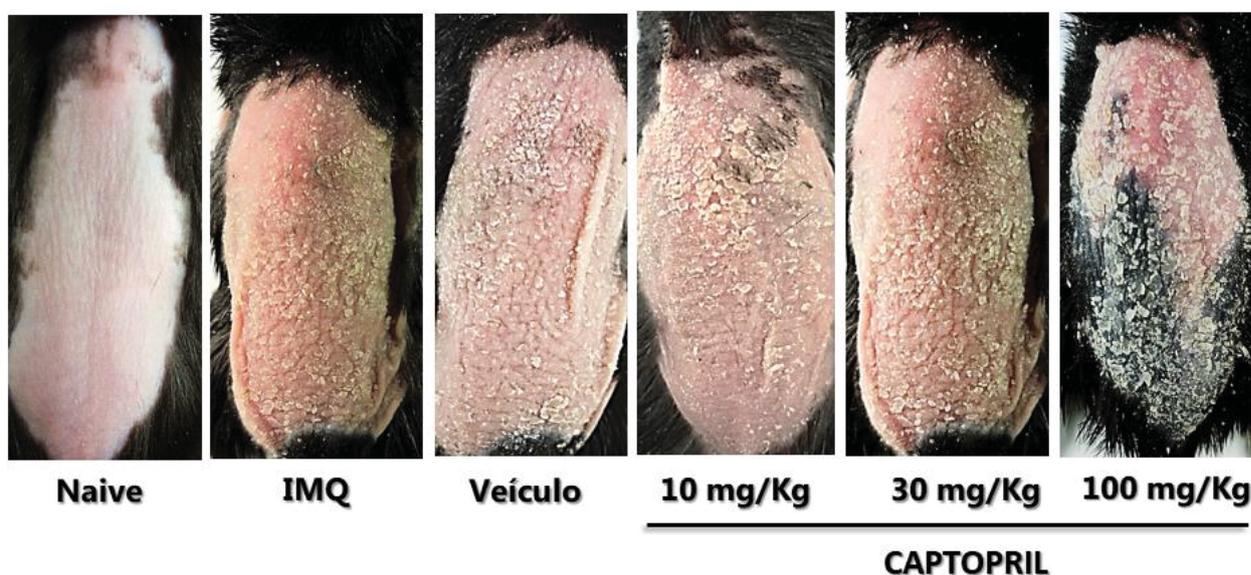


Figura 23. Fotos representativas de camundongos pré-tratados com Captopril na psoríase induzida por IMQ. Fotos representativas do dorso de animais (7° dia) que receberam pré-tratamento diário com diferentes doses (10, 30 ou 100 mg/Kg) de Captopril ao longo do modelo experimental de psoríase induzida por IMQ.

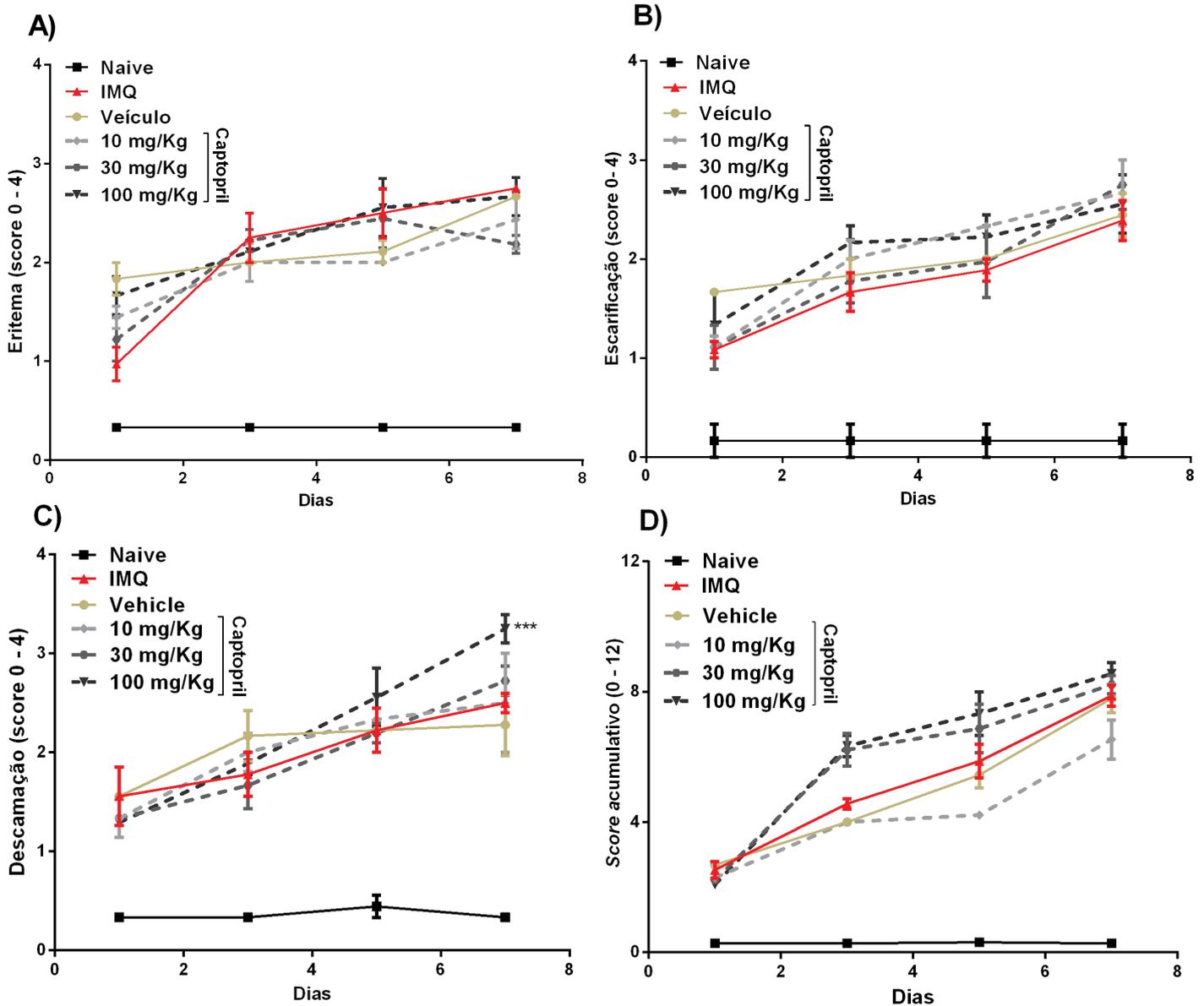


Figura 24. Avaliação da influência do tratamento com Captopril no desenvolvimento do processo psoriático induzido por IMQ. Objetivando verificar a influência das cininas no processo psoriático, animais WT foram tratados com captopril (10; 30 e 100 mg/Kg, p.o.) ou salina (veículo) 60 min antes da aplicação tópica de IMQ. Para avaliar a gravidade do quadro psoriático estabelecido foram realizados registros fotográficos diários e avaliações utilizando o escore PASI. A análise dos parâmetros: (A) Descamação, (B) Eritema e (C) Escarificação, foi realizada utilizando scores de 0 - 4. (D) O score acumulativo foi obtido através da soma dos parâmetros Eritema, Escarificação e Descamação (score 0- 12). Os pontos representam a média das avaliações dos animais de cada grupo (n = 6- 8 animais), ao longo do protocolo experimental. A análise estatística foi verificada através da análise de variância (ANOVA de duas vias), seguida pelo teste de *Newman-Keuls*. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao grupo Veículo, *** p<0,001.

Objetivando analisar se o bloqueio da enzima responsável pela degradação das cininas promovido pelo tratamento com Captopril, seria capaz de induzir alterações no infiltrado de células inflamatórias, foi realizada a quantificação da celularidade na pele dos animais submetidos ao processo psoriático induzido por IMQ (Figura 25 e 26A).

Os resultados mostraram que a maior dose avaliada de Captopril (100 mg/Kg) foi capaz de intensificar o influxo de células inflamatórias induzido por IMQ, promovendo aumento de $51,74 \pm 3,08\%$ no número de núcleos corados, quando comparado ao grupo Veículo (média de 135 células/campo) ($p < 0.05$) (Figura 25 e 26A). Similarmente, o tratamento com Captopril acentuou o espessamento da epiderme induzido por IMQ, sendo observado aumento de $31,99 \pm 8,16\%$ (100 mg/Kg) quando comparado ao grupo Veículo (média de $56,52 \mu\text{m}$) ($p < 0.05$) (Figura 25 e 26B). Conforme disposto anteriormente, IMQ promoveu aumento de $38,74 \pm 9,83\%$ no número de núcleos corados, e hiperplasia igual a $29,21 \pm 1,51\%$, quando comparado ao grupo Naive ($p < 0,001$) (Figura 25 e 26). Não foi observado alterações significativas entre os resultados obtidos no grupo IMQ e Veículo ($p > 0,05$) (Figuras 25 e 26).

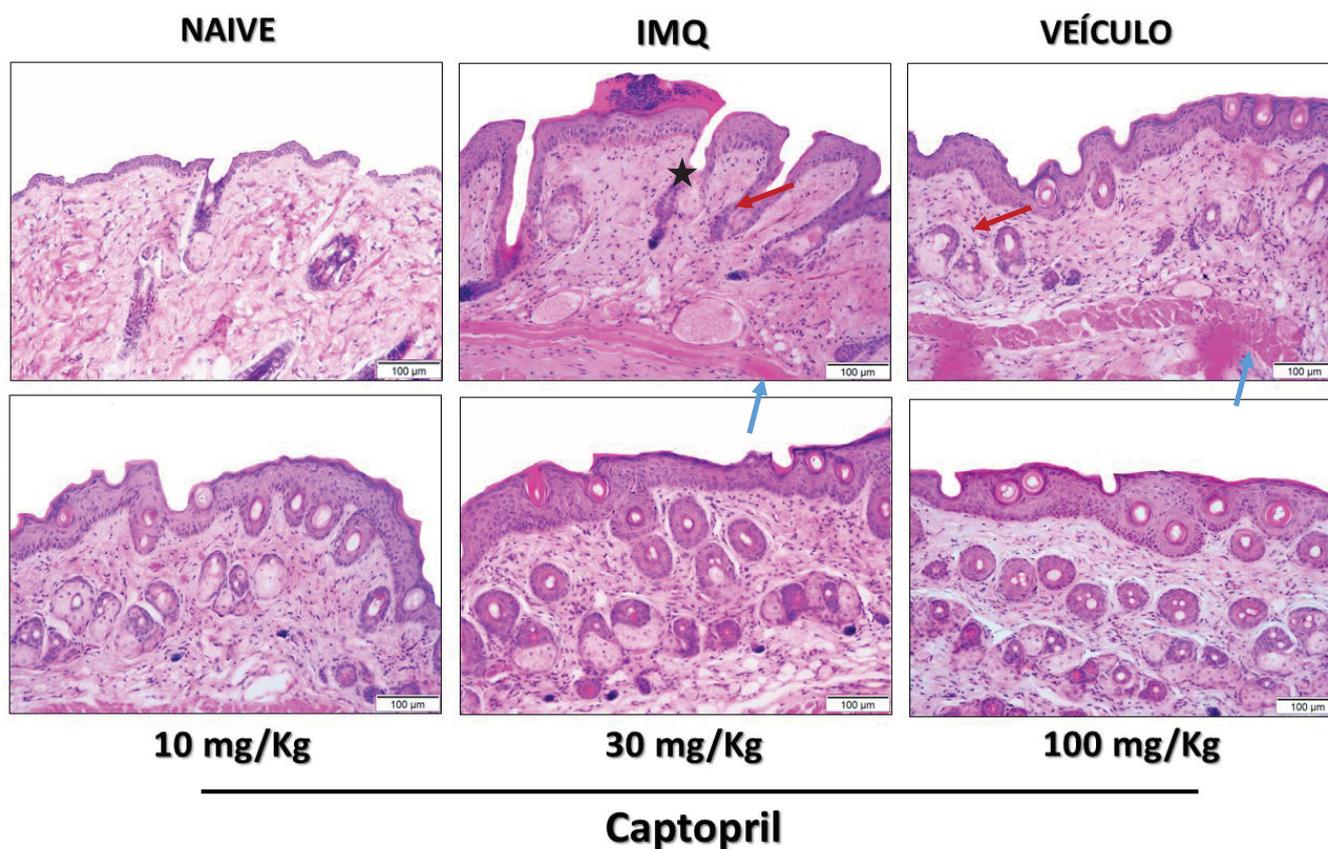


Figura 25. Fotos representativas da histologia da pele de animais WT que receberam o pré-tratamento com Captopril ao longo do protocolo de inflamação crônica tipo psoriática induzida por IMQ. As amostras teciduais (6 mm) foram coletadas no sétimo dia do protocolo experimental com o auxílio de um *punch*. Posteriormente, as biópsias foram fixadas em ALFAC, desidratadas, emblocadas, seccionadas em cortes de 5 µm e coradas com hematoxilina e eosina (H.E). As imagens foram adquiridas com microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão). A flecha azul indica região de intensa celularidade na derme; a flecha vermelha indica hiperplasia epidermal; e a estrela aponta hiperqueratose induzida por IMQ (Aumento de 200x, escala de 100µm).

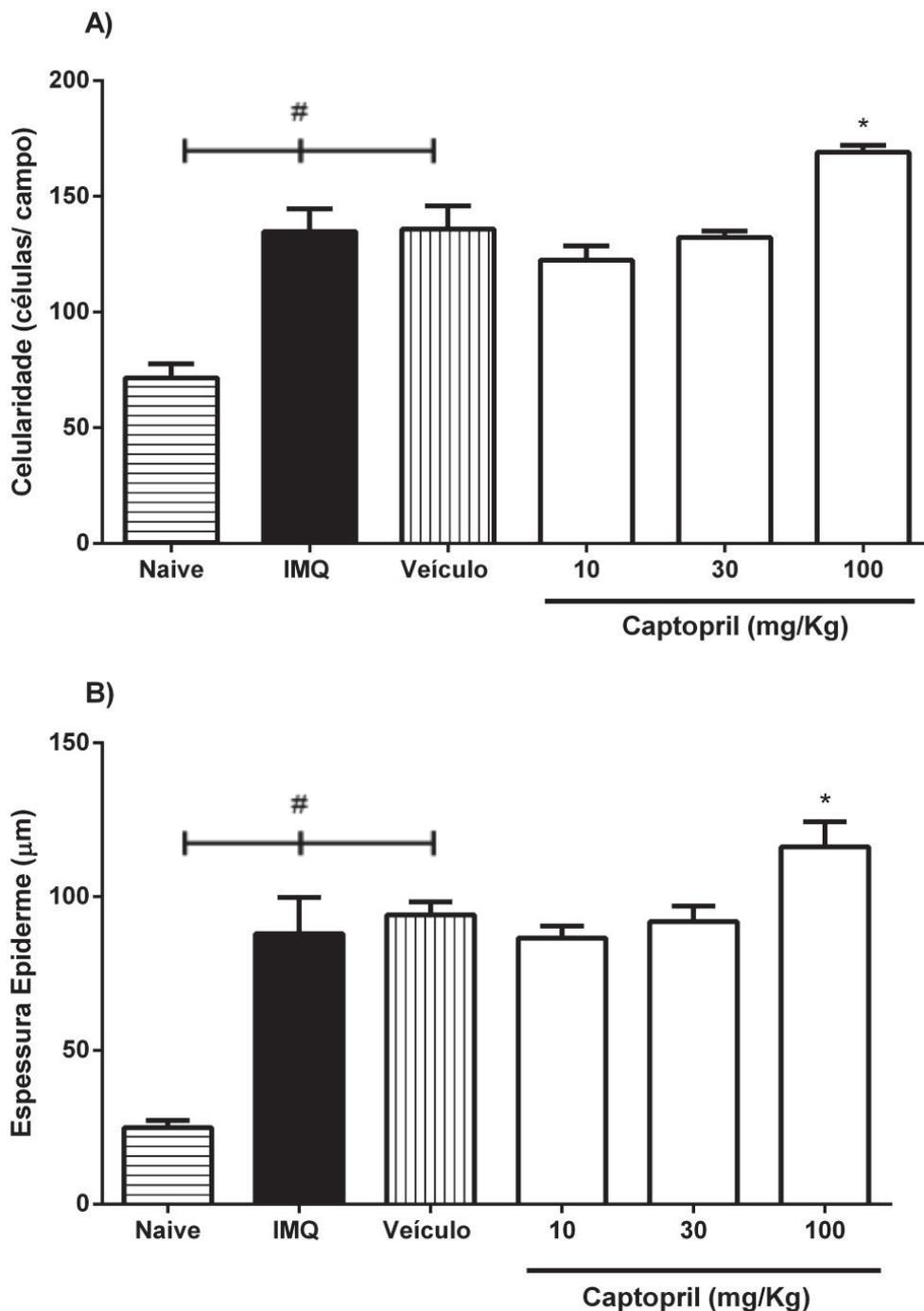


Figura 26. Influência do tratamento com Captopril no infiltrado celular e na espessura da epiderme de animais WT submetidos ao modelo de inflamação crônica tipo psoriática induzida por IMQ. Camundongos foram submetidos ao modelo de psoríase induzida por IMQ (80 mg/dia). Sendo que, 60 minutos antes da aplicação tópica de IMQ, os animais receberam diariamente o administração de Captopril (10; 30 e 100 mg/Kg, p.o.), ou do veículo (salina). No sétimo dia, os animais foram eutanasiados e amostras da pele coletadas e submetidas à análise histológica. (A) Quantificação da celularidade e a (B) mensuração da espessura da epiderme foram realizadas com o auxílio do *software* ImageJ®. As barras verticais representam a média \pm E.P.M (n=6-8) de cada grupo. A análise estatística foi verificada através da análise de variância (ANOVA de uma via), seguida pelo teste de *Newman-Keuls*. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao grupo Veículo, * $p < 0,05$. # Denota diferença estatística entre o grupo Naive e IMQ ($p < 0,05$), ou Naive e veículo ($p < 0,05$).

Com o intuito de verificar o efeito do pré-tratamento com Captopril na taxa de proliferação dos queratinócitos, foi realizada a análise da presença de queratinócitos positivos para PCNA, através de ensaio de imunohistoquímica (Figura 27). Conforme visualizado anteriormente, após 6 dias de administrações tópicas de IMQ houve aumento do número de queratinócitos imunomarcadas para PCNA, sendo este aumento de $70,96 \pm 4,73\%$, quando comparado ao grupo Naive (média de 20 células positivas/campo) ($p < 0.05$). Adicionalmente, as quantificações mostraram que a maior dose avaliada de Captopril (100 mg/Kg) foi capaz de ampliar em $34,02 \pm 2,74\%$ a proliferação dos queratinócitos, induzida por IMQ, quando comparada ao grupo Veículo (média de 53 células positivas/campo) ($p < 0.05$) (Figura 27B). Como representado na Figura 27, não foi observada diferença estatística entre o grupo IMQ e veículo ($p > 0.05$).

A)

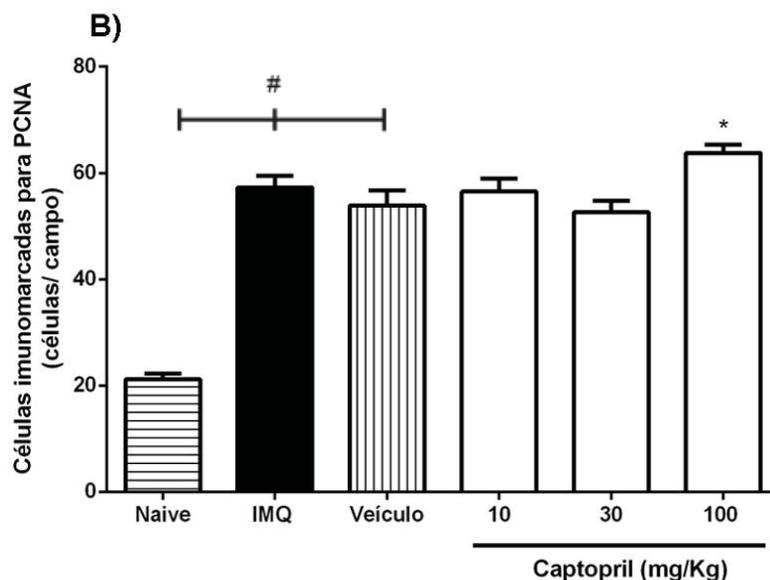
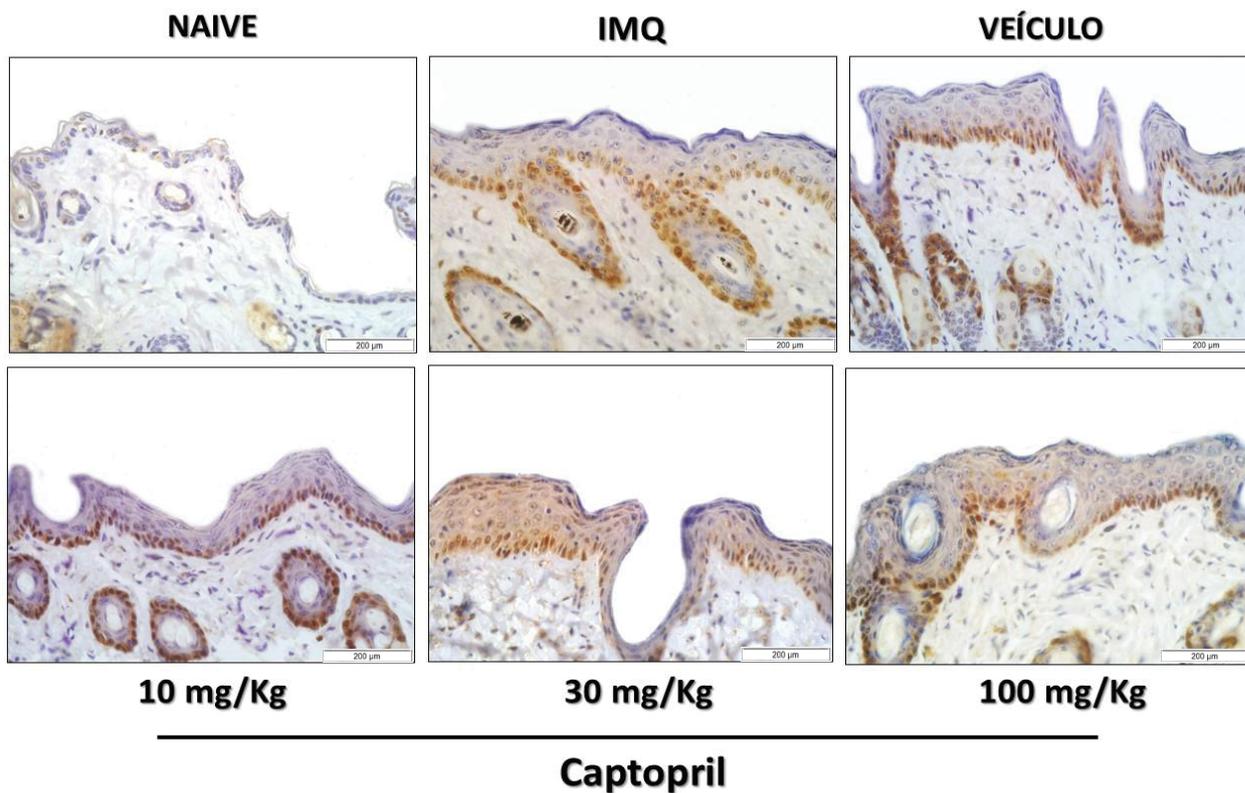


Figura 27. Efeito do tratamento com Captopril na taxa de proliferação de queratinócitos induzida por IMQ. Camundongos foram submetidos ao modelo de psoríase induzida por IMQ, sendo que, 60 minutos antes da aplicação tópica de IMQ, os animais receberam diariamente o administração de Captopril (10; 30 e 100 mg/Kg, p.o.), ou do veículo (salina). No sétimo dia, os animais foram eutanasiados e amostras da pele coletadas e submetidas à análise por imunohistoquímica. (A) Fotos representativas de todos os grupos experimentais. (B) Quantificação do número de queratinócitos positivos para PCNA, realizadas com o auxílio do *software* ImageJ®. As barras verticais representam a média \pm E.P.M (n=6-8) de cada grupo. A análise estatística foi verificada através da análise de variância (ANOVA de uma via), seguida pelo teste de *Newman-Keuls*. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao grupo Veículo, * $p < 0,05$. # Denota diferença estatística entre o grupo Naive e IMQ ($p < 0,05$), ou Naive e veículo ($p < 0,05$). (Aumento de 400x, escala de 200 μ m).

Adicionalmente, com o intuito de avaliar o efeito da inibição da ECA no processo de diferenciação dos queratinócitos, foi realizada a quantificação do número de células imunomarcadas para K14 (Figura 28). Os dados obtidos mostraram que o tratamento com Captopril (100 mg/Kg) promoveu aumento do número de queratinócitos indiferenciados na epiderme de animais submetidos ao modelo de psoríase induzida por IMQ, sendo este aumento igual a $49,18 \pm 4,19\%$, quando comparado ao grupo Veículo (média de 48 células positivas/campo) ($p < 0.01$) (Figura 28B). Conforme representado na Figura 28B, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos IMQ e Veículo ($p > 0.05$).

Em conjunto, esses resultados sugerem que o tratamento com Captopril causa piora no quadro inflamatório relacionado com o aumento do infiltrado de células inflamatórias. Somado a este efeito, o captopril causou também aumento da taxa de proliferação e intensificou a diferenciação anormal dos queratinócitos na pele psoriática. Como o mecanismo de ação do captopril envolve a redução da degradação de cininas, estas podem ser responsáveis pelo aumento na gravidade da psoríase induzida pelo IMQ.

A)

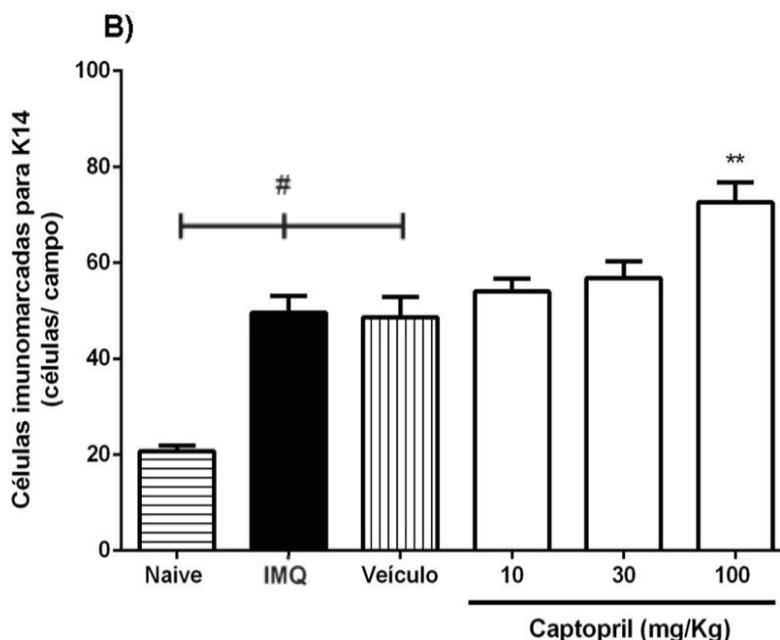
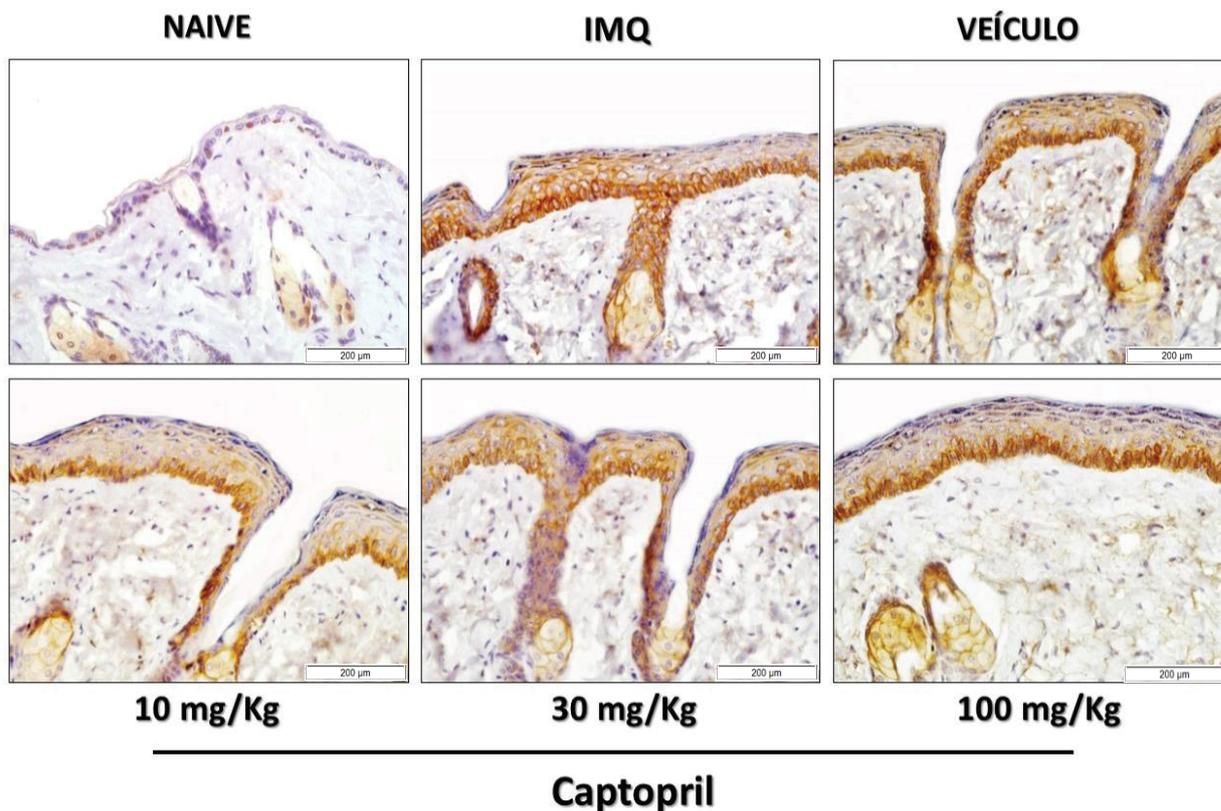


Figura 28. Influência do tratamento com Captopril na taxa de queratinócitos indiferenciados no modelo de psoríase induzida por IMQ. Camundongos foram tratados com Captopril (10; 30 e 100 mg/Kg, p.o.) ou o veículo (salina) 60 minutos antes da aplicação tópica de IMQ por 6 dias. No sétimo dia, os animais foram eutanasiados e amostras da pele coletadas e submetidas à análise por imunohistoquímica para detecção da K14. (A) Fotos representativas de todos os grupos experimentais. (B) Quantificação do número de queratinócitos positivos para K14, realizada com o auxílio do software *ImageJ*®. As barras verticais representam a média \pm E.P.M (n=6-8) de cada grupo. A análise estatística foi verificada através da análise de variância (ANOVA de uma via), seguida pelo teste de *Newman-Keuls*. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao grupo Veículo, * p<0,05. # Denota diferença estatística entre o grupo Naive e IMQ (p<0,05), ou Naive e veículo (p<0,05). (Aumento de 400x, escala de 200 µm).

5.5 INFLUÊNCIA DOS RECEPTORES B₁ E B₂ DAS CININAS NO PERFIL DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS PRESENTES NAS LESÕES PSORIÁTICAS INDUZIDAS POR IMQ.

Com o intuito de avaliar a presença de neutrófilos na pele psoriática, foram utilizados anticorpos direcionados à proteína Ly6G (Lee *et al.*, 2013). Os resultados obtidos mostraram que as múltiplas administrações de IMQ promoveram aumento na média da MIF de Ly6G⁺ ($648,47 \pm 53,31\%$), comparado ao grupo Naive ($p < 0,001$) (Figura 29). No entanto, camundongos nocautes para os receptores cininérgicos tratados com IMQ exibiram reduções de $54,42 \pm 7,27\%$ (KOB₁), $47,70 \pm 4,29\%$ (KOB₂) e $43,53 \pm 3,17\%$ (KOB₁B₂) na MIF de Ly6G⁺, quando comparado com o grupo WT ($p < 0,001$) (Figura 29 e 30).

Da mesma forma, o tratamento com SSR240612C (1,0 mg/Kg) ou FR 173657 (30 mg/Kg) causaram redução de $34,46 \pm 4,47\%$ e $44,36 \pm 9,03\%$ na MIF de Ly6G⁺, respectivamente, quando comparados ao grupo veículo ($p < 0,05$) (Figura 31 e 32). Por fim, as análises evidenciaram aumento da MIF de Ly6G⁺ ($25,97 \pm 8,44\%$) na pele de animais tratados com Captopril (100 mg/Kg), durante o protocolo experimental do modelo de psoríase induzida por IMQ, quando comparados ao grupo veículo ($p < 0,05$) (Figura 31 e 32).

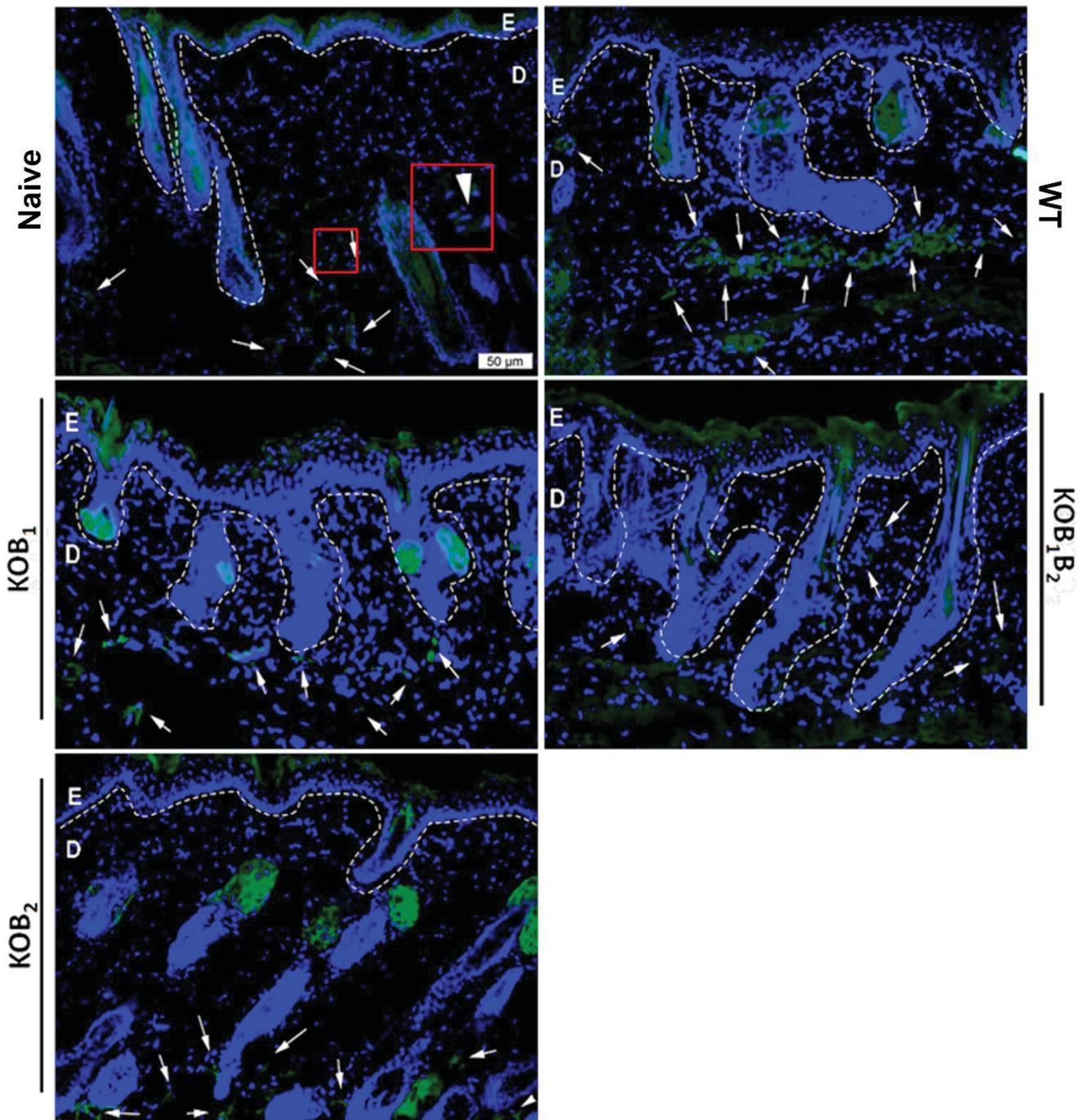


Figura 29. Imagens representativas de células Ly6G⁺ na lesão psoriática de animais WT e nocautes para o receptor das cininas submetidos ao modelo de psoríase induzido por IMQ. Amostras teciduais foram coletadas no sétimo e último dia do protocolo experimental. Posteriormente, foram inseridas em tissue-tek e submetidas à criopreservação. As biópsias foram seccionadas em criostato (resfriado a -35° C), e os cortes (5 μm) submetidos à análise da presença de células Ly6G⁺ através de imunofluorescência. As flechas brancas indicam regiões de marcações positivas para Ly6G (verde). As imagens foram adquiridas com microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão). A média da intensidade de fluorescência (MIF) foi realizada com o auxílio do software ImageJ® (Aumento de 200x, escala de 50μm). E – epiderme e D – derme .

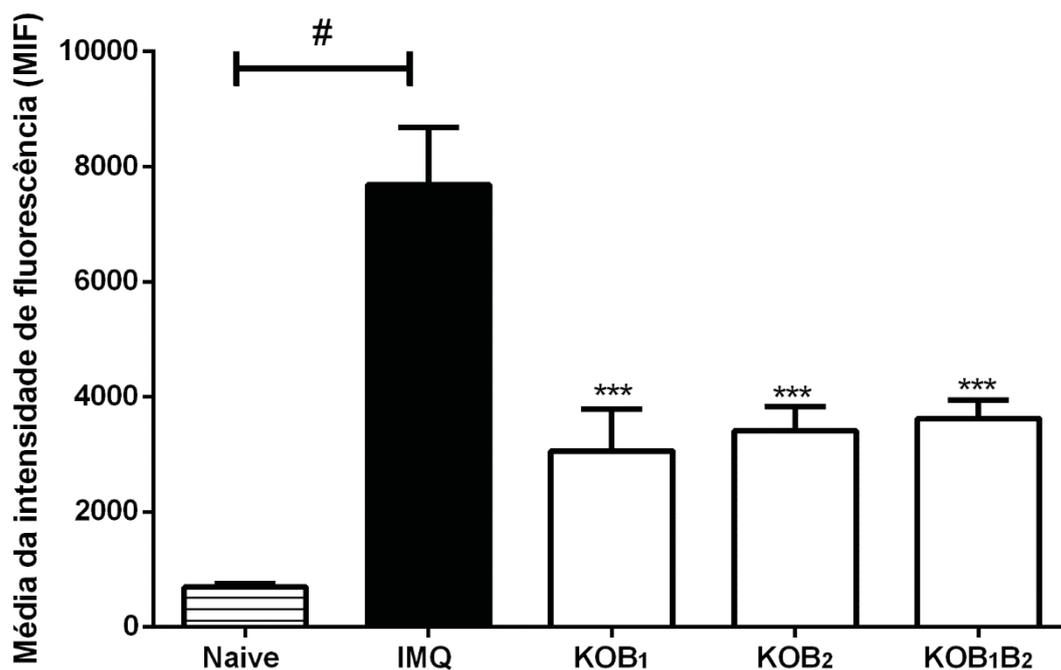


Figura 30. Participação dos receptores B₁ e B₂ das cininas no influxo de neutrófilos. Objetivando avaliar a participação dos receptores cininérgicos em processos que compõem o influxo de neutrófilos, amostras teciduais de camundongos nocautes para os receptores das cininas (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂) e WT foram analisadas por imunofluorescência. A MIF de células positivamente marcadas para Ly6G⁺ foi realizada com o auxílio do *software* ImageJ®. As barras verticais representam a média ± E.P.M (n=6-8) de cada grupo. A análise estatística foi verificada através da análise de variância (*One-way ANOVA*), seguida pelo teste de *Newman-Keuls*. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao grupo WT, *** p<0,001. # Denota diferença estatística entre o grupo Naive e IMQ (p<0,05).

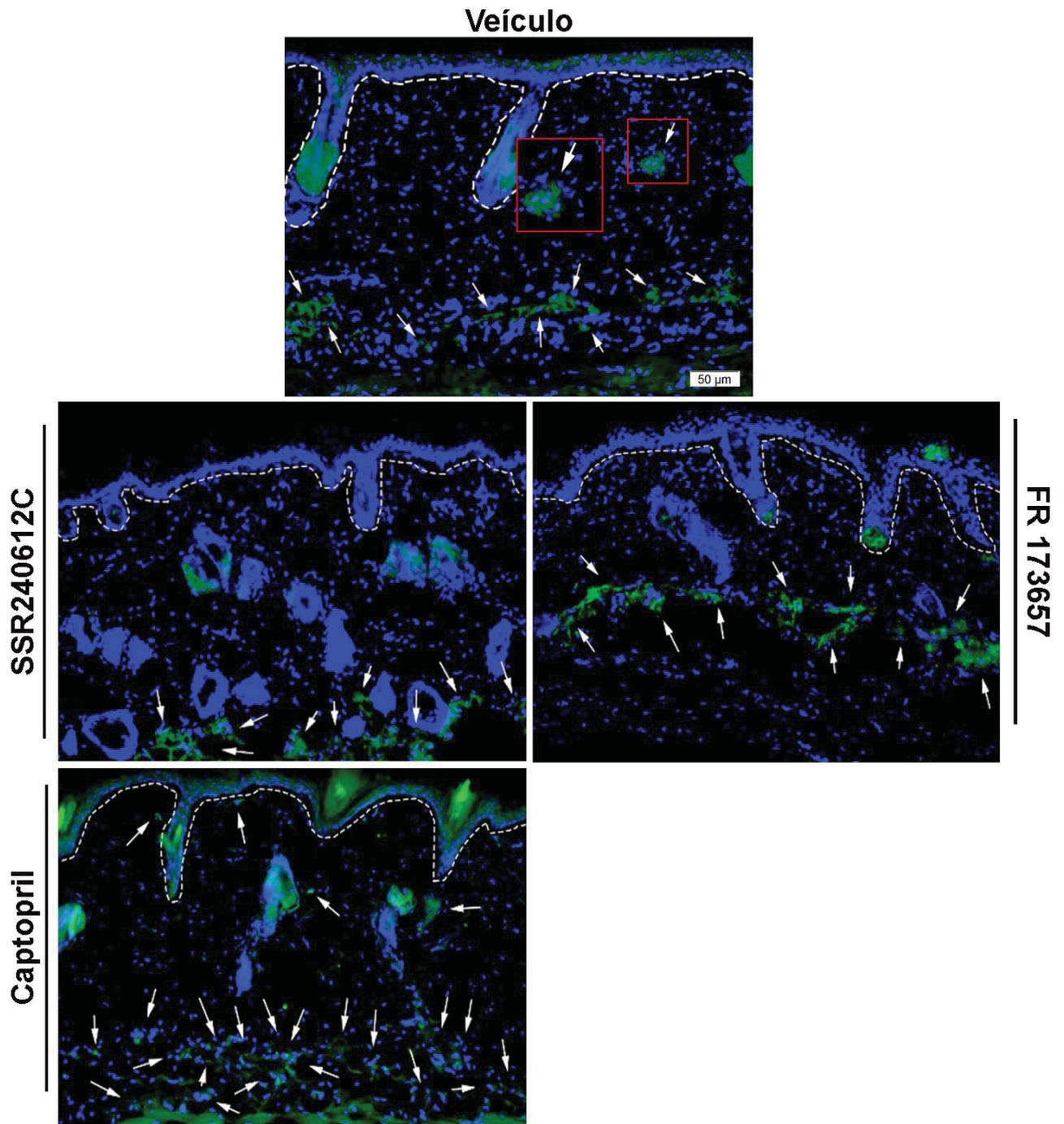


Figura 31. Imagens representativas de células Ly6G+ na lesão psoriática de animais pré-tratados com SSR240612C, FR173657 ou Captopril. Amostras teciduais foram coletadas no sétimo e último dia do protocolo experimental. Posteriormente, foram inseridas em tissue-tek e submetidas à criopreservação. As biópsias foram seccionadas em criostato (resfriado a -35° C), e os cortes ($5\ \mu\text{m}$) submetidos à análise da presença de células Ly6G+ através de imunofluorescência. As flechas brancas indicam regiões de marcações positivas para Ly6G (verde). As imagens foram adquiridas com microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão). A média da intensidade de fluorescência (MIF) foi realizada com o auxílio do software ImageJ® (Aumento de 200x, escala de $50\ \mu\text{m}$). E – epiderme e D – derme.

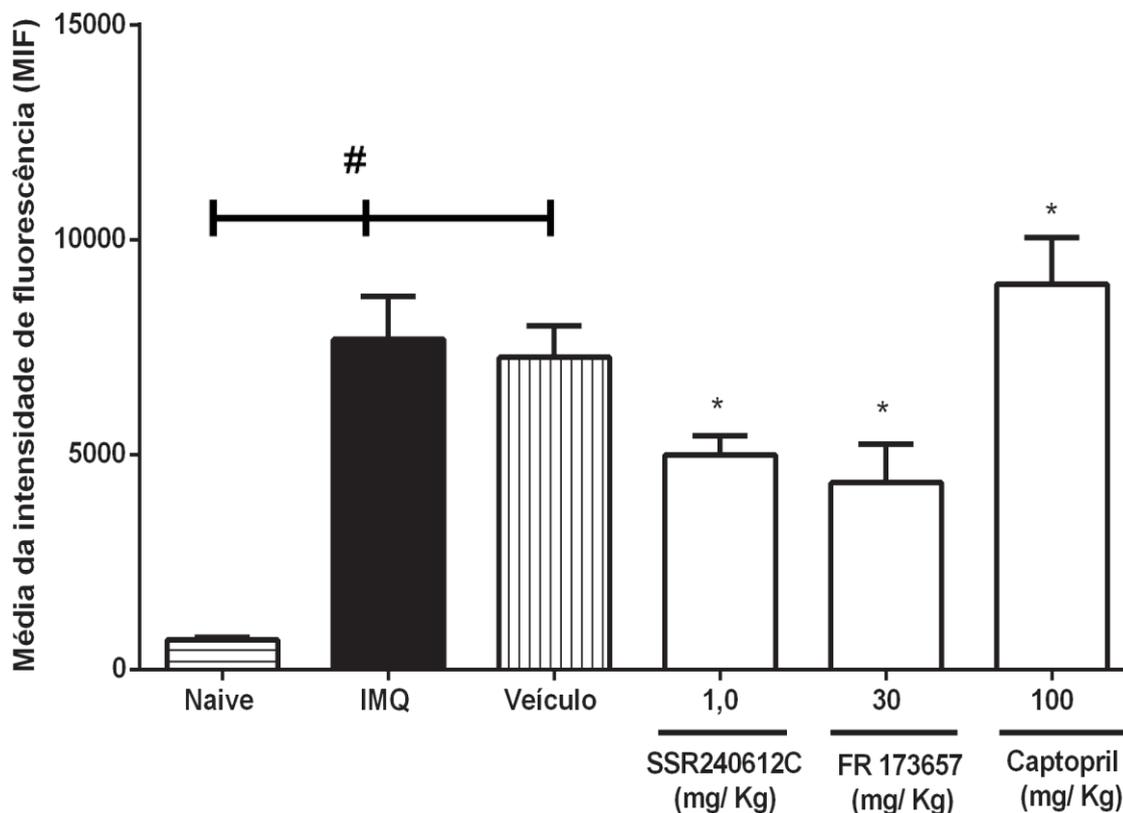


Figura 32. Efeito do tratamento com antagonistas das cininas ou Captopril no influxo de neutrófilos. Objetivando avaliar a participação do sistema das cininas no influxo de neutrófilos para o tecido inflamado, amostras da pele de camundongos tratados com SSR240612C (1,0 mg/Kg), FR 173657 (30 mg/Kg) ou Captopril (100 mg/Kg), ao longo do modelo de psoríase induzida por IMQ, foram analisadas por imunofluorescência. A MIF de células positivamente marcadas para Ly6G⁺, realizada com o auxílio do software ImageJ®. As barras verticais representam a média \pm E.P.M (n=6-8) de cada grupo. A análise estatística foi verificada através da análise de variância (*One-way ANOVA*), seguida pelo teste de Newman-Keuls. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao grupo Veículo, * $p < 0,05$. # Denota diferença estatística entre o grupo Naive e IMQ ($p < 0,05$), ou Naive e veículo ($p < 0,05$).

Tendo como objetivo avaliar a participação dos receptores B₁ e B₂ das cininas no influxo de macrófagos para a lesão psoriática, foi realizada a análise da MIF do marcador celular CD11b (Figuras 33 - 36). Conforme representado nas Figuras 33 e 34, a administração tópica de IMQ promoveu aumento da MIF para CD11b⁺ ($1185,22 \pm 31,83\%$), indicando aumento do número de macrófagos infiltrados na pele de animais WT em relação ao grupo Naive ($p < 0,001$) (Figura 33). Em contraste, a ausência dos receptores cininérgicos afetou o infiltrado de mononucleares, uma vez que, nos grupos KOB₁ e KOB₂ foram observadas reduções de $31,59 \pm 8,10\%$ e $85,34 \pm 3,75\%$, na MIF para CD11b⁺, respectivamente. Além disso, no grupo duplo nocaute (KOB₁B₂) foi observada

redução de $84,70 \pm 3,68\%$ na MIF para $CD11b^+$, ambos comparados com o grupo WT ($p < 0,001$) (Figura 33 e 34).

Corroborando, o bloqueio do receptor B_1 (SSR240612C) e B_2 (FR 173657) das cininas reduziu em $61,15 \pm 2,51\%$ e $84,68 \pm 4,24\%$ a MIF para $CD11b^+$, respectivamente, comparado ao grupo veículo (Figuras 35 e 36).

Intensificando os indícios de participação do sistema das cininas em processos que resultam na migração de macrófagos para a pele psoriática, os resultados mostraram que o bloqueio da cininase ECA, pela administração de Captopril (100 mg/Kg), intensificou em $33,57 \pm 66,26\%$ a MIF para $CD11b^+$, relativo ao grupo veículo ($p < 0,05$) (Figuras 35 e 36). Como ilustrado na Figura 36, não foram observadas diferenças significativas entre o grupo IMQ e Veículo ($p > 0,05$).

Estes dados apoiam evidências de que os receptores de cininas estão provavelmente envolvidos em processos que medeiam a migração de neutrófilos e macrófagos para a pele psoriática.

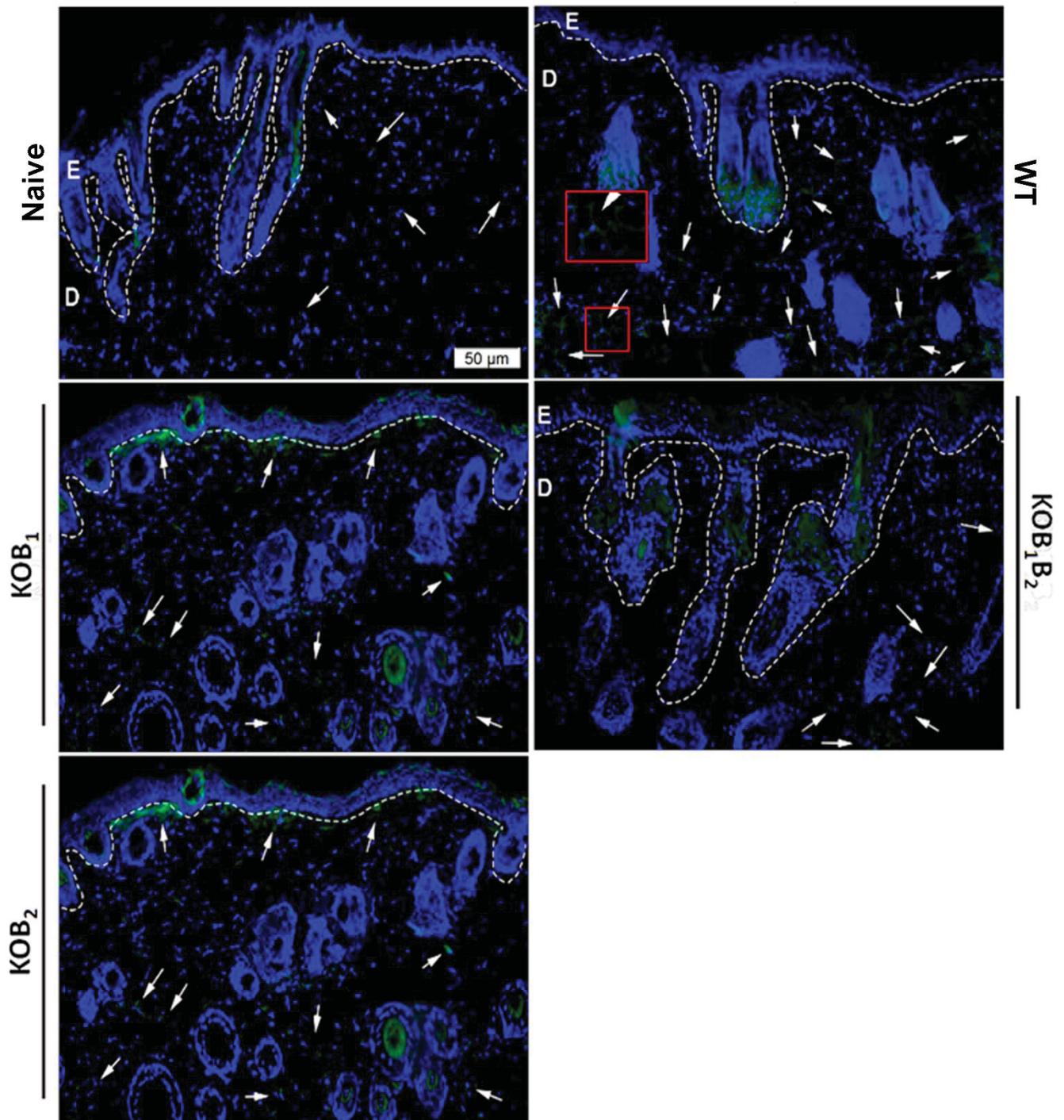


Figura 33. Fotos representativas de células CD11b+ na lesão psoriática de animais WT e nocautes para o receptor das cininas submetidos ao modelo de psoríase induzido por IMQ. Amostras teciduais foram coletadas no sétimo dia do protocolo experimental. Posteriormente, foram inseridas em tissue-tek e submetidas à criopreservação. As biópsias foram seccionadas em criostato (resfriado a -35°C), e os cortes ($5\ \mu\text{m}$) submetidos à análise da presença de células CD11b+ através de imunofluorescência. As flechas brancas indicam regiões de marcações positivas para CD11b (verde). As imagens foram adquiridas com microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão). A média da intensidade de fluorescência (MIF) foi realizada com o auxílio do software ImageJ® (Aumento de 200x, escala de $50\ \mu\text{m}$). E – epiderme e D – derme .

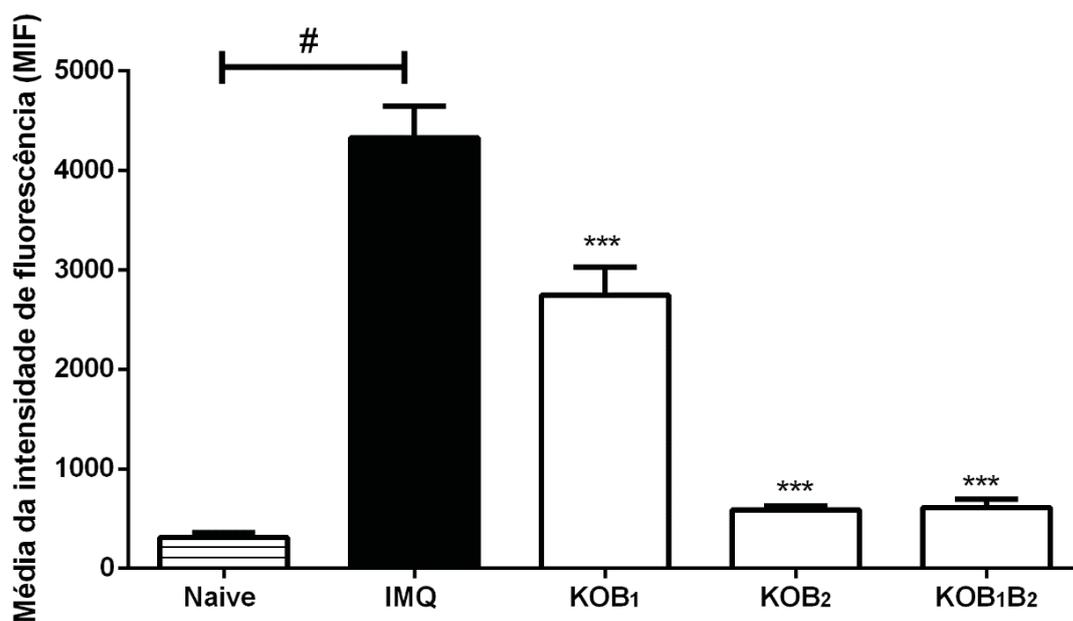


Figura 34. Influência dos receptores B₁ e B₂ das cininas no influxo de macrófagos induzido por IMQ. Objetivando avaliar a participação dos receptores cininérgicos no influxo de macrófagos, amostras teciduais de camundongos, nocautes para os receptores das cininas (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂) e WT, submetidos ao modelo de psoríase induzida por IMQ, foram analisadas por imunofluorescência. A MIF de células positivamente marcadas para CD11b⁺ foi realizada com o auxílio do *software* ImageJ®. As barras verticais representam a média ± E.P.M (n=6-8) de cada grupo. A análise estatística foi verificada através da análise de variância (One-way ANOVA), seguida pelo teste de *Newman-Keuls*. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao grupo WT, *** p<0,001. # Denota diferença estatística entre o grupo Naive e IMQ (p<0,05).

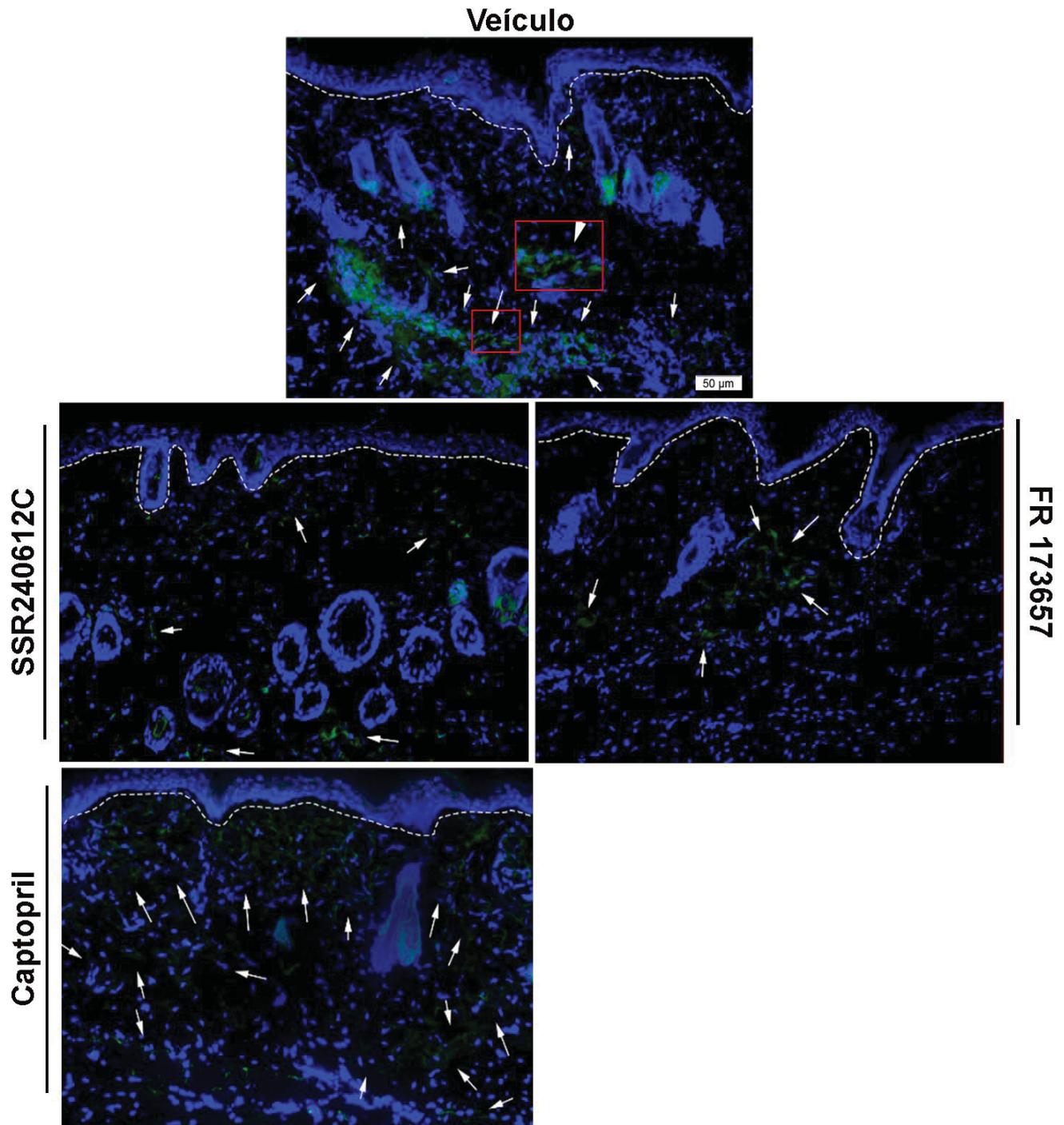


Figura 35. Fotos representas de células CD11b+ na lesão psoriática de animais tratados com SSR240612C, FR173657 ou Captopril. Amostras teciduais foram coletadas no sétimo dia do protocolo experimental. Posteriormente, foram inseridas em tissue-tek e submetidas à criopreservação. As biópsias foram seccionadas em criostato (resfriado a -35°C), e os cortes ($5\ \mu\text{m}$) submetidos à análise da presença de células CD11b+ através de imunofluorescência. As flechas brancas indicam regiões de marcações positivas para CD11b (verde). As imagens foram adquiridas com microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão). A média da intensidade de fluorescência (MIF) foi realizada com o auxílio do software ImageJ® (Aumento de 200x, escala de $50\ \mu\text{m}$). E – epiderme e D – derme.

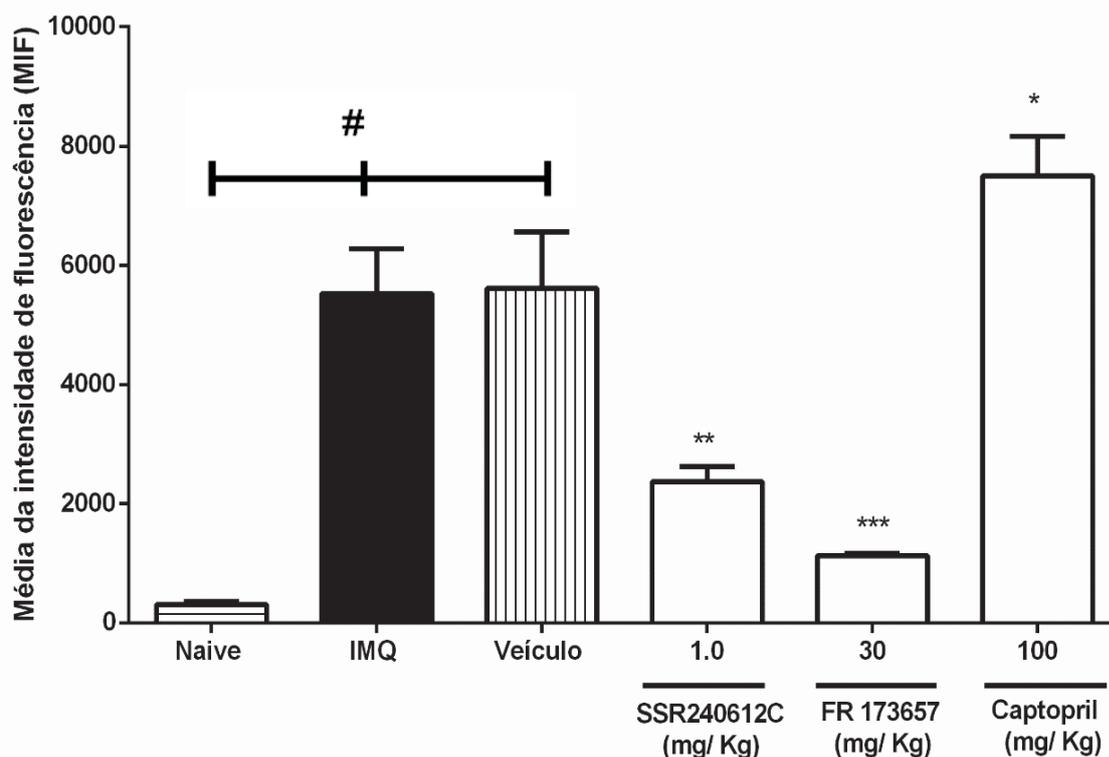


Figura 36. Efeito dos antagonistas das cininas e do captopril no influxo de macrófagos causado por IMQ. Objetivando avaliar a participação do sistema das cininas no influxo de macrófagos, amostras da pele de camundongos tratados com SSR240612C (1,0 mg/Kg), FR 173657 (30 mg/Kg) ou Captopril (100 mg/Kg), ao longo do modelo de psoríase induzida por IMQ, foram analisadas por imunofluorescência. A MIF de células positivamente marcadas para CD11b⁺ foi realizada com o auxílio do software ImageJ®. As barras verticais representam a média \pm E.P.M (n=6-8) de cada grupo. A análise estatística foi verificada através da análise de variância (One-way ANOVA), seguida pelo teste de *Newman-Keuls*. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao grupo Veículo, * p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001. # Denota diferença estatística entre o grupo Naive e IMQ (p<0,05), ou Naive e veículo (p<0,05).

Além disso, a presença de linfócitos T na lesão psoriática induzida por IMQ foi avaliada quantificando as células imunopositivas para CD3 (Lambert e Genin, 2004). A partir das quantificações, foi possível observar que as administrações tópicas de IMQ promoveram aumento do número de células CD3⁺ ($128,89 \pm 1,82\%$), quando comparado ao grupo Naive (média de 6 células positivas/campo) (p<0,001) (Figuras 37 e 38). Por outro lado, foi observada redução do número de células T CD3⁺ nas lesões psoriáticas de animais KOB₁ ($26,05 \pm 2,74\%$), KOB₂ ($34,81 \pm 1,03\%$) e KOB₁B₂ ($49,72 \pm 0,89\%$) submetidos ao modelo de psoríase induzida por IMQ, quando comparado ao grupo WT (média de 20 células positivas /campo) (Figura 38).

Dando sustentação a estes achados, a administração de SSR240612C e FR 173657 reduziram em $38,01 \pm 1,52\%$ e $63,72 \pm 1,58\%$ o número de células imunomarcadas para CD3⁺, respectivamente, quando comparado com o grupo

Veículo (média de 20 células positivas/campo) (Figuras 39 e 40). Não foram observadas alterações significativas entre os animais que receberam Captopril (média de 17 células positivas /campo) e o grupo Veículo ($p>0,05$) (Figura 40). Como ilustrado na Figura 40, o grupo IMQ e Veículo apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$).

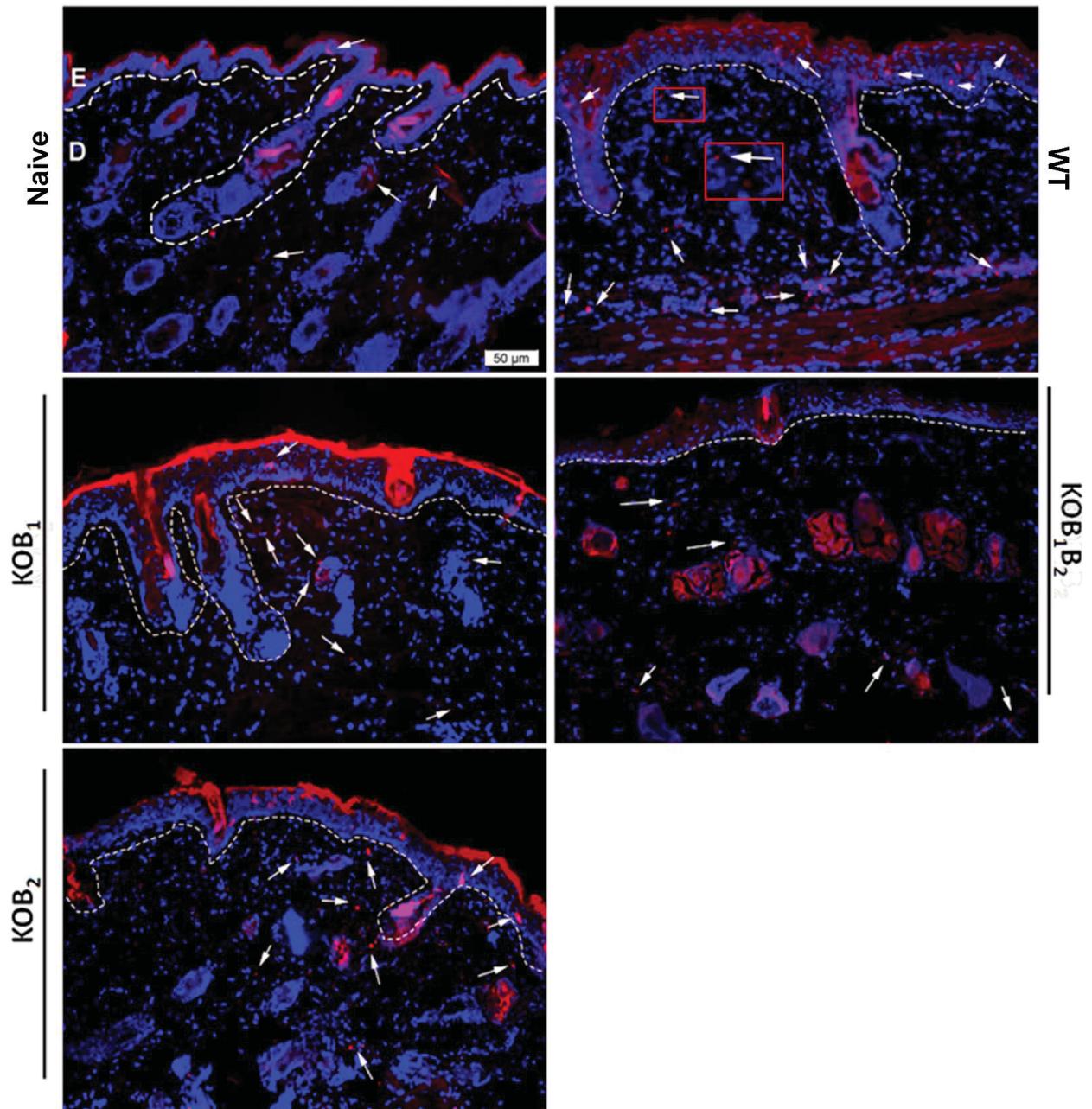


Figura 37 - Fotos representativas de células CD3⁺ na lesão psoriática de animais WT e nocautes para o receptor das cininas submetidos ao modelo de psoríase induzido por IMQ. Amostras teciduais foram coletadas no sétimo dia do protocolo experimental. Posteriormente, foram inseridas em tissue-tek e submetidas à criopreservação. As biópsias foram seccionadas em criostato (resfriado a -35° C), e os cortes (5 µm) submetidos à análise da presença de células CD3⁺ através de imunofluorescência. As flechas brancas indicam regiões de marcações positivas para CD3 (vermelho). As imagens foram adquiridas com microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão). A quantificação do número de células marcadas foi realizada com o auxílio do software ImageJ® (Aumento de 200x, escala de 50µm). E – epiderme e D – derme.

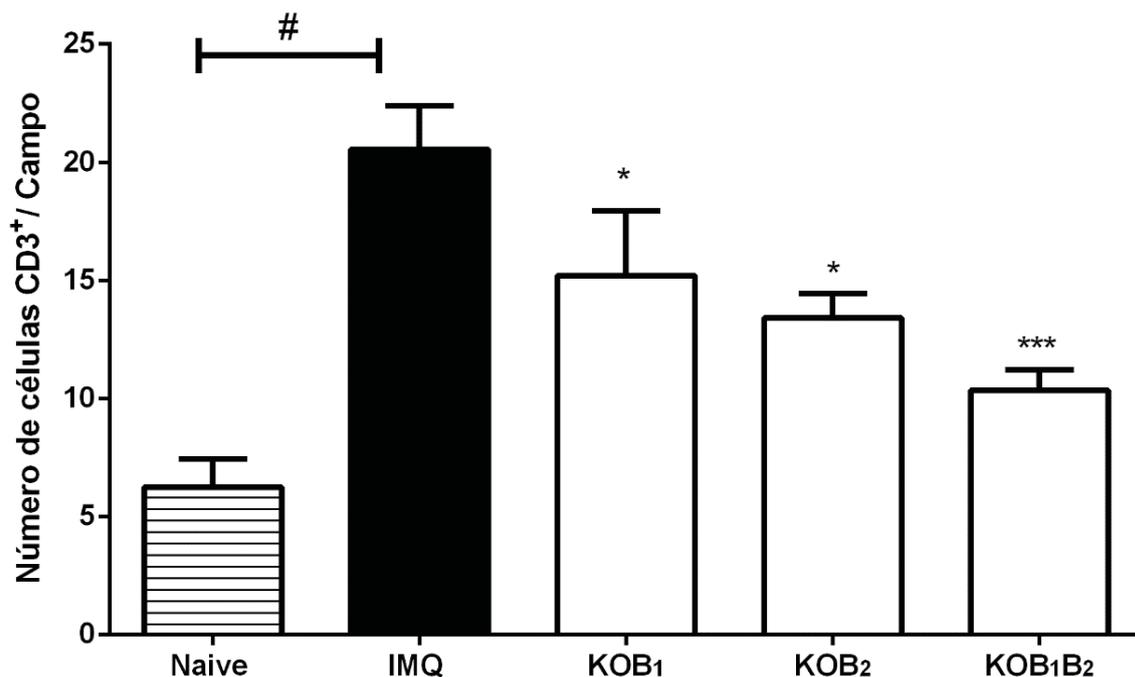


Figura 38. Análise da participação dos receptores B₁ e B₂ das cininas na migração de linfócitos T. Objetivando avaliar a participação dos receptores cininérgicos na migração de linfócitos T para a pele psoriática, amostras teciduais de camundongos nocautes para os receptores das cininas (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂) e WT, submetidos ao modelo de psoríase induzida por IMQ, foram analisadas por imunofluorescência. A quantificação de células CD3⁺ foi realizada com o auxílio do *software* ImageJ®. As barras verticais representam a média ± E.P.M (n=6-8) de cada grupo. A análise estatística foi verificada através da análise de variância (One-way ANOVA), seguida pelo teste de *Newman-Keuls*. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao grupo WT, * p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001. # Denota diferença estatística entre o grupo Naive e IMQ (p<0,05).

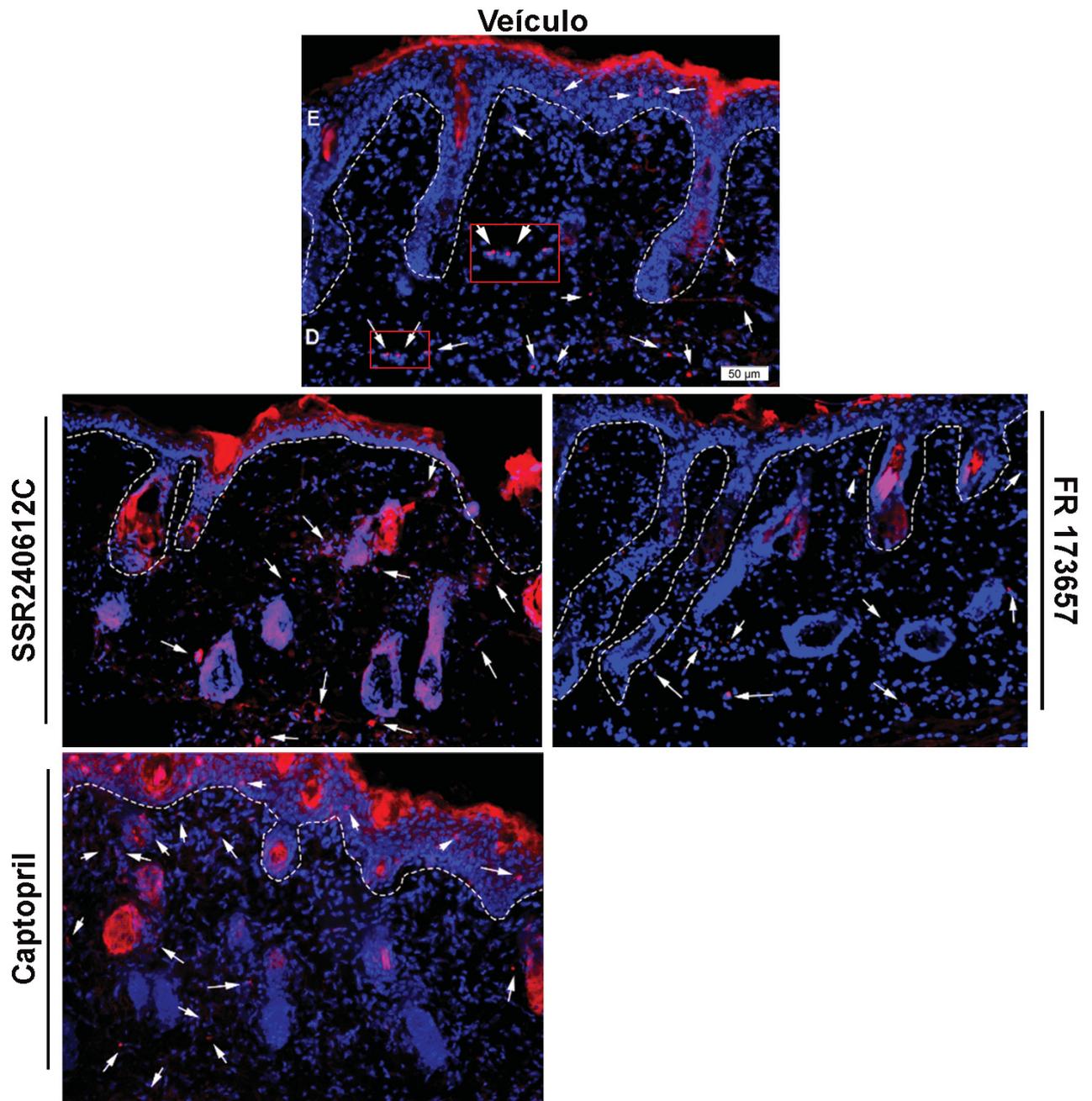


Figura 39. Fotos representas de células CD3+ na lesão psoriática de animais pré-tratados com SSR240612C, FR173657 ou Captopril. Amostras teciduais foram coletadas no sétimo dia do protocolo experimental. Posteriormente, foram inseridas em tissue-tek e submetidas à criopreservação. As biópsias foram seccionadas em criostato (resfriado a -35°C), e os cortes ($5\ \mu\text{m}$) submetidos à análise da presença de células CD3+ através de imunofluorescência. As flechas brancas indicam regiões de marcações positivas para CD3 (vermelho). As imagens foram adquiridas com microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão). A quantificação do número de células marcadas foi realizada com o auxílio do software ImageJ® (Aumento de 200x, escala de $50\ \mu\text{m}$) E – epiderme e D – derme.

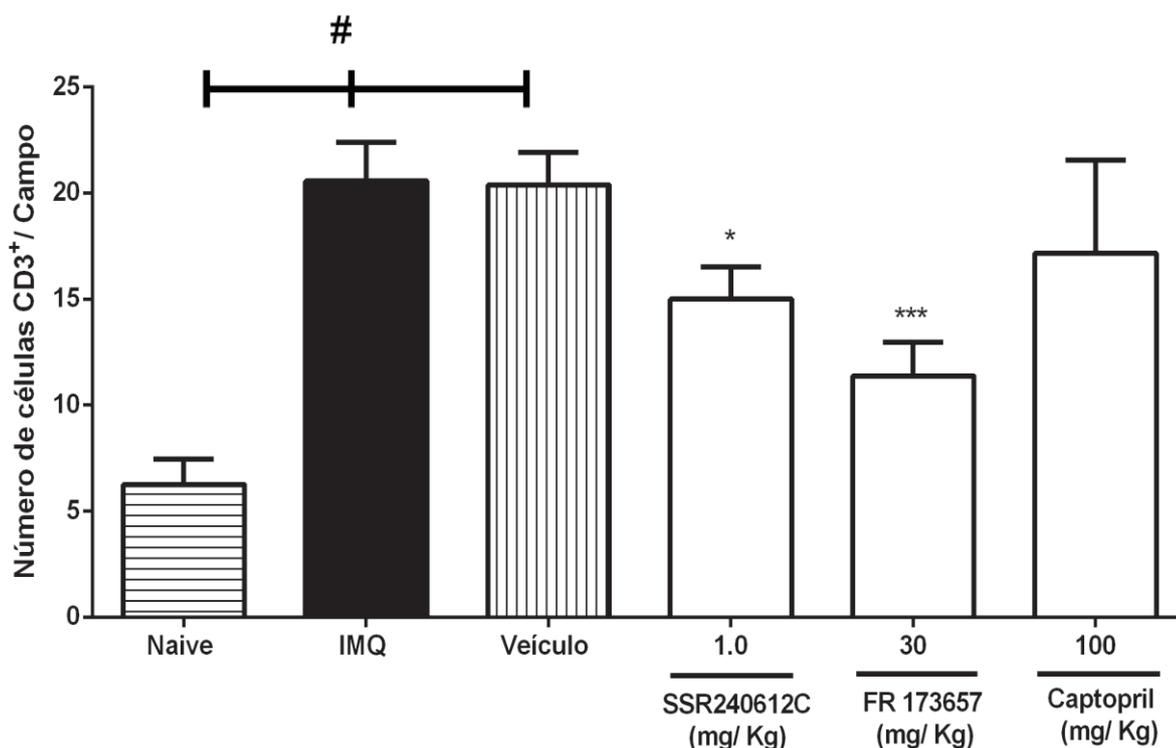


Figura 40. Efeito do tratamento com antagonistas das cininas e com captopril na migração de células T para a lesão psoriática induzida por IMQ. Objetivando avaliar a participação do sistema das cininas na migração de linfócitos T para a lesão psoriática, amostras da pele de camundongos tratados com SSR240612C (1,0 mg/Kg), FR 173657 (30 mg/Kg) ou Captopril (100 mg/Kg), ao longo do modelo de psoríase induzida por IMQ, foram analisadas por imunofluorescência. A quantificação de células positivas para CD3⁺ foi realizada com o auxílio do software ImageJ®. As barras verticais representam a média ± E.P.M (n=6-8) de cada grupo. A análise estatística foi verificada através da análise de variância (One-way ANOVA), seguida pelo teste de *Newman-Keuls*. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao grupo Veículo, * p<0,05 e *** p<0,001. # Denota diferença estatística entre o grupo Naive e IMQ (p<0,05), ou Naive e veículo (p<0,05).

Adicionalmente, a análise da presença dos subconjuntos de células T CD4⁺ e CD8⁺ foi realizada na pele de animais submetidos ao modelo de inflamação crônica induzida por IMQ, através de imunofluorescência (Figura 41-44). Com relação às células T CD4⁺, os resultados mostraram aumento de 320 ± 2,11% no número de células imunomarcadas positivamente na pele de animais WT que receberam IMQ, quando comparado ao grupo Naive (média de 2 células positivas/campo) (p<0,001) (Figura 41 e 42).

Conforme ilustrado na Figura 42, em animais submetidos ao modelo de psoríase induzida por IMQ, a ausência dos receptores B₁ e B₂ das cininas resultou reduções expressivas no número de linfócitos T CD4⁺, sendo estas reduções de 51,64 ± 1,31% (KOB₁), 50,03 ± 1,36% (KOB₂) e 61,54 ± 1,06%

(KOB₁B₂), quando comparado ao grupo WT (média de 13 células positivas/campo) ($p < 0,01$).

Reforçando estes achados, a administração de SSR240612C (1,0 mg/Kg) promoveu redução de $80,27 \pm 0,81\%$ no número de células imunomarcadas para CD4⁺, enquanto o bloqueio do receptor B₂ das cininas, por FR 173657, reduziu em $44,45 \pm 0,56\%$ o número de células T CD4⁺ presentes nas lesões psoriáticas induzidas por IMQ, quando comparados ao grupo Veículo (média de 13 células positivas/campo) (Figura).

Animais tratados com Captopril não apresentaram alterações significativas no número de células positivas para CD4⁺ (média de 12 células positivas/campo), relativo ao grupo Veículo ($p > 0,05$) (Figura 43 e 44).

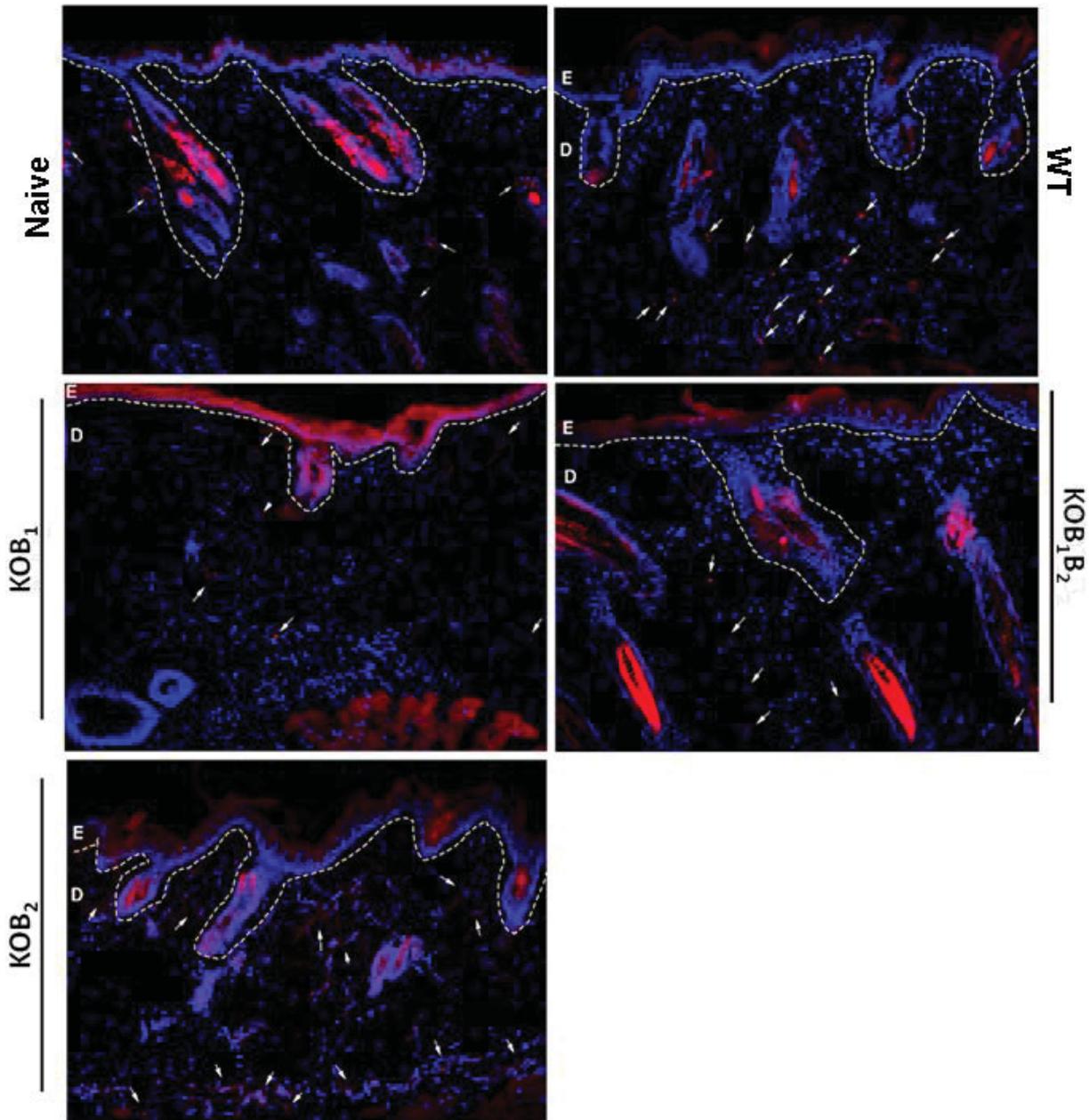


Figura 41. Fotos representas de células CD4⁺ na lesão psoriática de animais WT e nocautes para o receptor das cininas submetidos ao modelo de psoríase induzido por IMQ. Amostras teciduais foram coletadas no sétimo dia do protocolo experimental. Posteriormente, foram inseridas em tissue-tek e submetidas à criopreservação. As biópsias foram seccionadas em criostato (resfriado a -35° C), e os cortes (5 µm) submetidos à análise da presença de células CD4⁺ através de imunofluorescência. As flechas brancas indicam regiões de marcações positivas para CD4 (vermelho). As imagens foram adquiridas com microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão). A quantificação do número de células marcadas foi realizada com o auxílio do software ImageJ® (Aumento de 200x, escala de 50µm). E – epiderme e D – derme.

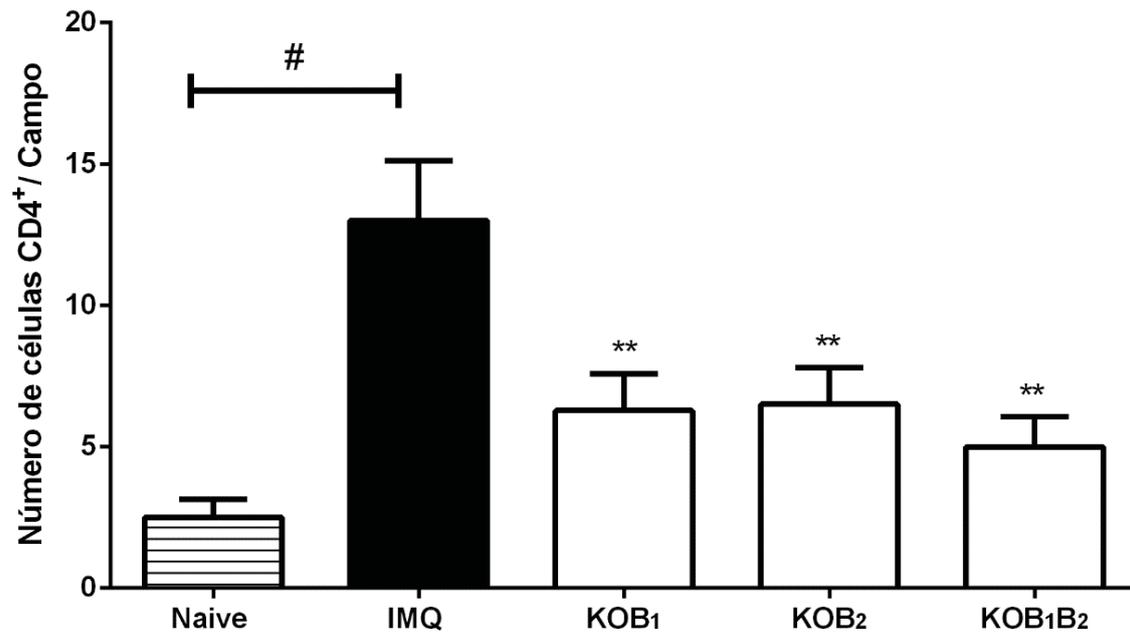


Figura 42. Participação dos receptores da cininas (B1R e B2R) na migração de células CD4+ para a lesão psoriática induzida por IMQ. Objetivando avaliar a participação dos receptores cininérgicos na migração de linfócitos T CD4+, amostras das lesões psoriáticas de camundongos nocautes para os receptores das cininas (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂) e WT, submetidos ao modelo de psoríase induzida por IMQ, foram analisadas pelo software ImageJ®. As barras verticais representam a média ± E.P.M (n=6-8) de cada grupo. A análise estatística foi verificada através da análise de variância (One-way ANOVA), seguida pelo teste de *Newman-Keuls*. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao grupo WT, ** p<0,01. # Denota diferença estatística entre o grupo Naive e IMQ (p<0,05).

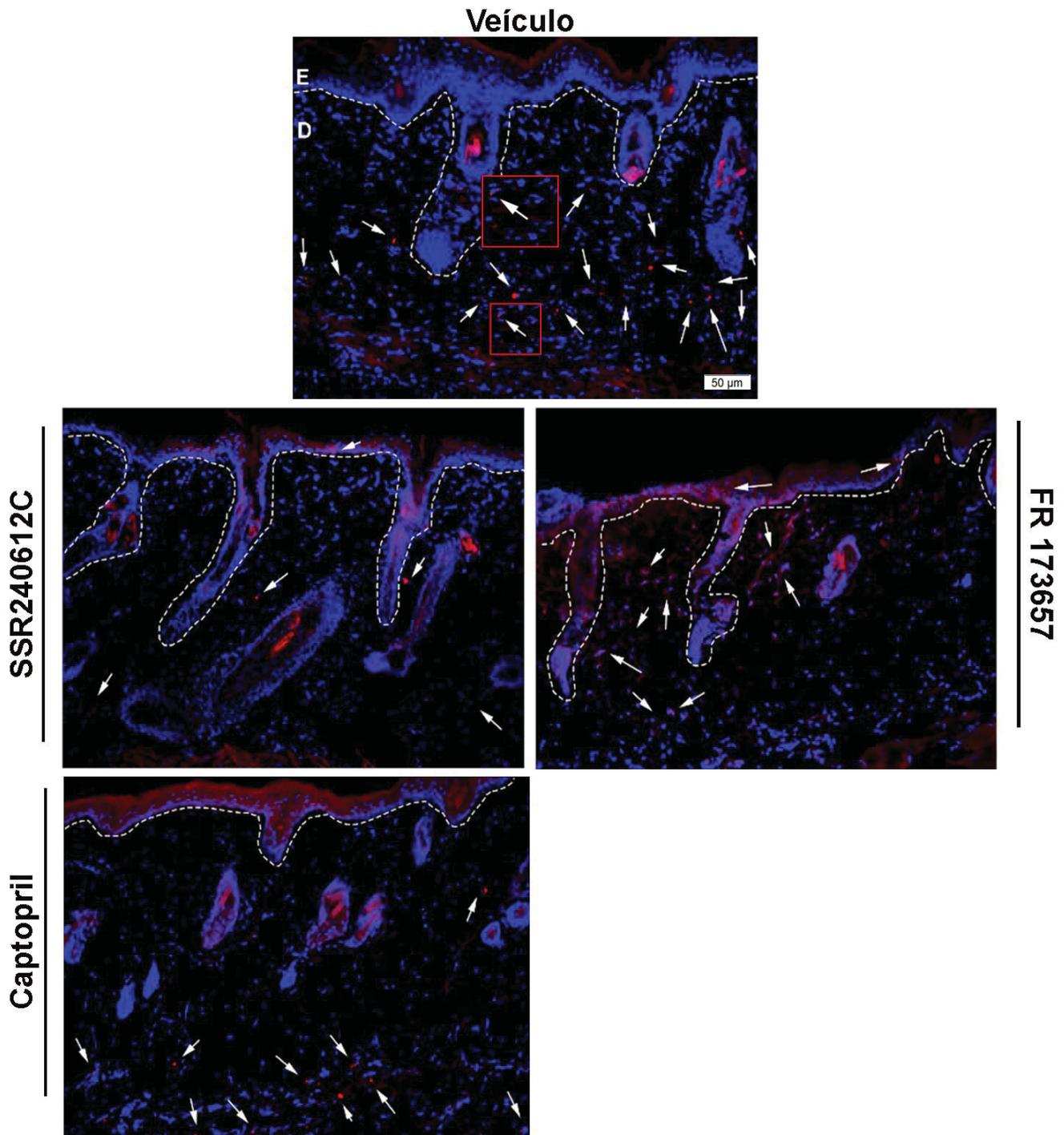


Figura 43. Imagens representas de células CD4⁺ na lesão psoriática de animais tratados com SSR240612C, FR173657 ou Captopril. Amostras teciduais foram coletadas no sétimo dia do protocolo experimental, com o auxílio de um *punch* (6 mm). Posteriormente, foram inseridas em tissue-tek e submetidas à criopreservação. As biópsias foram seccionadas em criostato (resfriado a -35° C), e os cortes (5 µm) submetidos à análise da presença de células CD4⁺ através de imunofluorescência. As flechas brancas indicam regiões de marcações positivas para CD4 (vermelho). As imagens foram adquiridas com microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão). A quantificação do número de células marcadas foi realizada com o auxílio do software ImageJ® (Aumento de 200x, escala de 50µm). E – epiderme e D – derme.

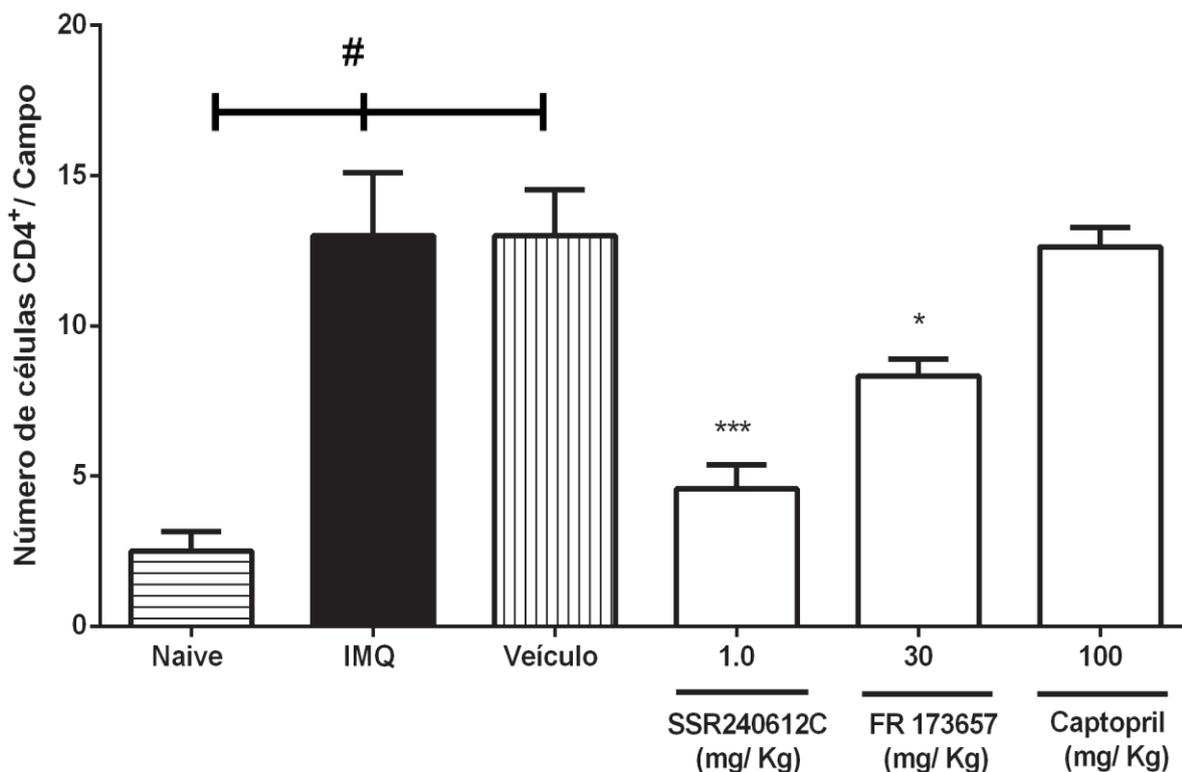


Figura 44. Participação do sistema das cininas na migração de células T CD4⁺ para a pele durante o processo psoriático induzido por IMQ. Objetivando avaliar a participação do sistema das cininas na migração de linfócitos T CD4⁺, biopsias da lesão psoriática de camundongos C57BL/6 tratados com SSR240612C (1,0 mg/Kg), FR 173657 (30 mg/Kg) ou Captopril (100 mg/Kg), ao longo do modelo de psoríase induzida por IMQ, foram analisadas por imunofluorescência. A quantificação de células positivas para CD4⁺ foi realizada com o auxílio do software ImageJ®. As barras verticais representam a média ± E.P.M (n=6-8) de cada grupo. A análise estatística foi verificada através da análise de variância (One-way ANOVA), seguida pelo teste de *Newman-Keuls*. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao grupo Veículo, * p<0,05 e *** p<0,001. # Denota diferença estatística entre o grupo Naive e IMQ (p<0,05), ou Naive e veículo (p<0,05).

Semelhantemente, IMQ também promoveu aumento de $1750 \pm 9,43\%$ no número de células T CD8⁺ presentes na pele de animais WT, quando comparado ao grupo Naive (média de 3 células positivas/ campo) (p<0,001) (Figura 45 e 46). Em contraste, animais nocautes para o receptor B₂ das cininas que receberam administrações de IMQ, exibiram redução de $67,21 \pm 0,31\%$ no número de células imunopositivas para CD8⁺ (Figura 46). Da mesma maneira, animais KOB₁B₂ apresentaram $63,93 \pm 0,63\%$ menos células T CD8⁺ nas lesões psoriáticas induzidas por IMQ, ambos comparado ao grupo WT (média de 7 células positivas/campo) (p<0,001) (Figura 45 e 46). No entanto, não foram

observadas alterações significativas no grupo KOB₁ em relação ao grupo WT ($p>0,05$) (Figura 46).

Corroborando, o bloqueio farmacológico do receptor B₂, com o antagonista FR 173657, reduziu em $46,54 \pm 0,65\%$ o número de células imunomarcadas para CD8⁺ na pele psoriática induzida por IMQ, comparado ao grupo veículo (média de 8 células positivas/ campo) ($p<0,05$) (Figuras 47 e 48). Entretanto, o antagonista do receptor B₁ (SSR240612C) não promoveu alterações significativas no número de células T CD8⁺ ($p> 0,05$) (Figura 48). Como representado na Figura 48, o tratamento com Captopril não promoveu alterações significativas no número de células T CD8⁺, relativo ao grupo Veículo ($p>0,05$).

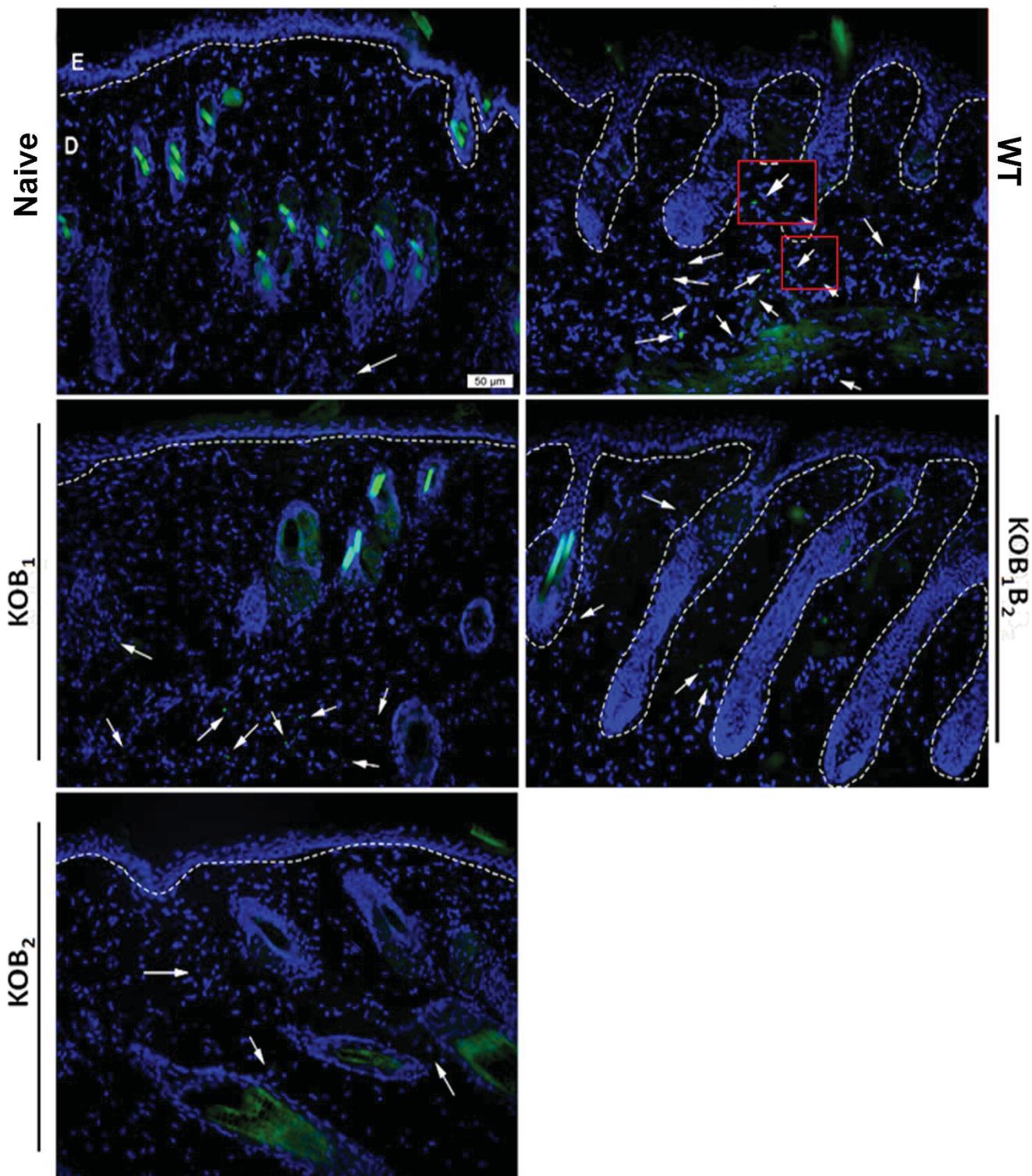


Figura 45. Fotos representativas de células CD8⁺ presentes na lesão psoriática de animais WT e KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂. Amostras teciduais foram coletadas no sétimo dia do protocolo experimental, com o auxílio de um punch (6 mm). Posteriormente, foram inseridas em tissuetek e submetidas à criopreservação. As biópsias foram seccionadas em criostato (resfriado a -35° C), e os cortes (5 µm) submetidos à análise da presença de células CD8⁺ através de imunofluorescência. As flechas brancas indicam regiões de marcações positivas para CD8 (verde). As imagens foram adquiridas com microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão). A quantificação do número de células marcadas foi realizada com o auxílio do software ImageJ® (Aumento de 200x, escala de 50µm). E – epiderme e D – derme.

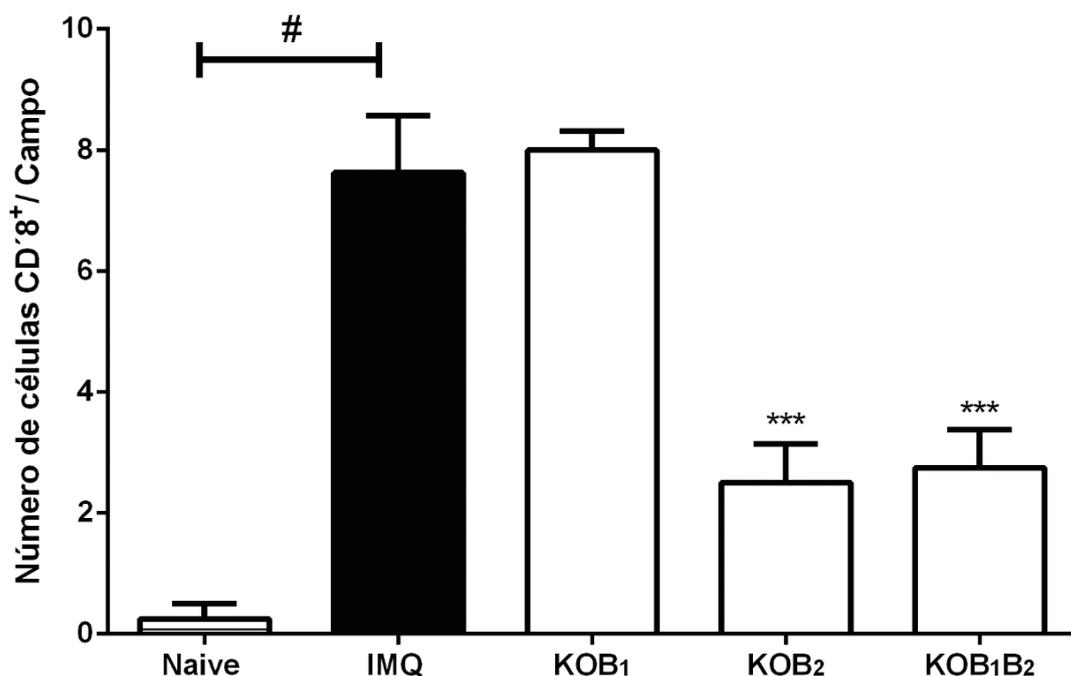


Figura 46. Participação do receptor B₂ das cininas na migração de células CD8⁺ durante o processo psoriático induzido por IMQ. Objetivando avaliar a participação dos receptores cininérgicos na migração de linfócitos T CD8⁺ para a lesão psoriática induzida por IMQ, amostras teciduais de camundongos nocautes para os receptores das cininas (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂) e WT, foram analisadas por imunofluorescência. A quantificação de células CD8⁺ foi realizada com o auxílio do *software ImageJ*®. As barras verticais representam a média ± E.P.M (n=6-8) de cada grupo. A análise estatística foi verificada através da análise de variância (ANOVA de uma via), seguida pelo teste de *Newman-Keuls*. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao grupo WT, *** p<0,001. # Denota diferença estatística entre o grupo Naive e IMQ (p<0,05).

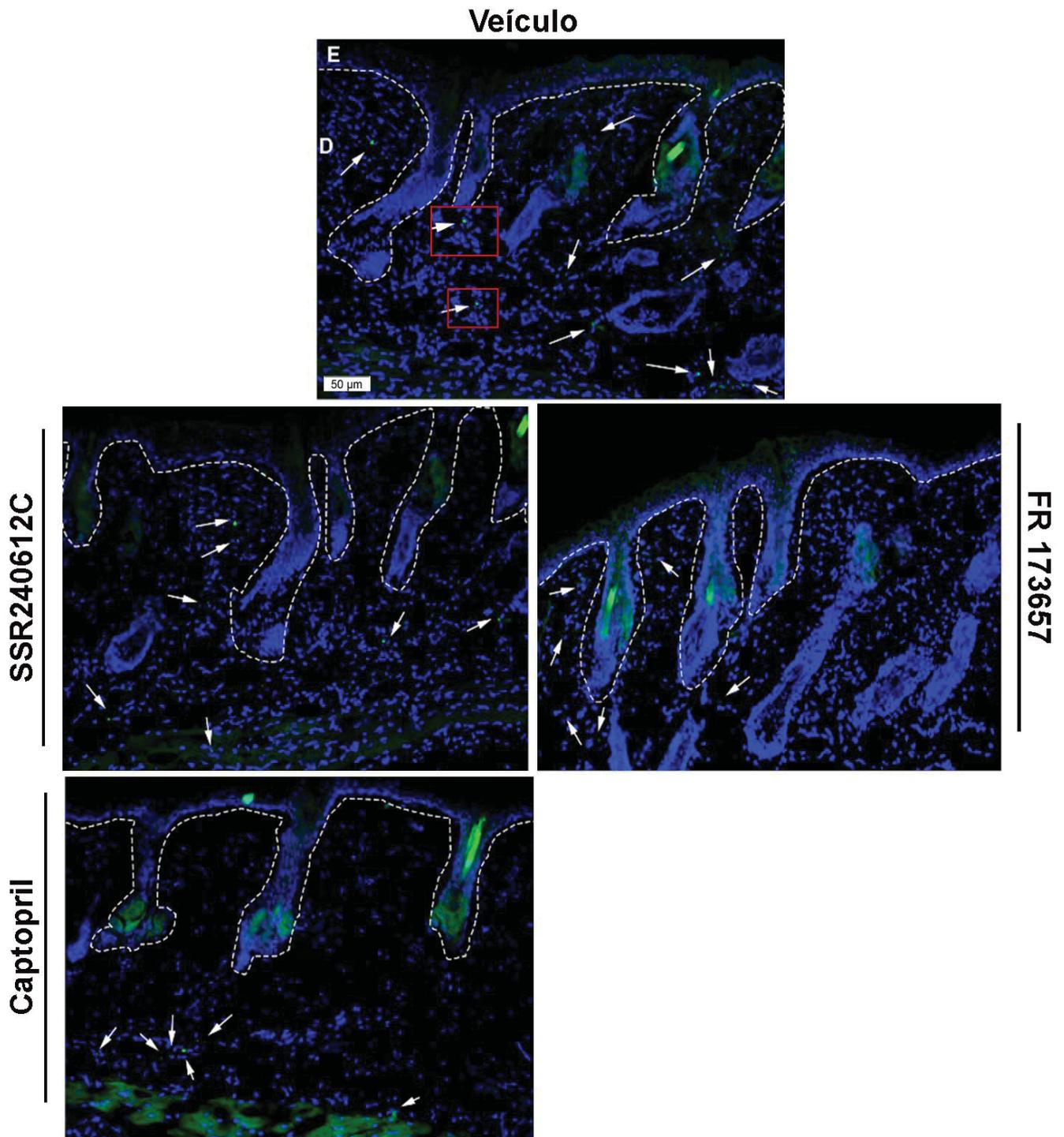


Figura 47. Imagens representas de células CD8⁺ na lesão psoriática de animais tratados com SSR240612C, FR173657 ou Captopril. Amostras teciduais foram coletadas no sétimo dia do protocolo experimental, inseridas em tissue-tek e submetidas à criopreservação. As biópsias foram seccionadas em criostato (resfriado a -35° C), e os cortes (5 µm) submetidos à análise da presença de células CD8⁺ através de imunofluorescência. As flechas brancas indicam regiões de marcações positivas para CD8 (verde). As imagens foram adquiridas com microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão). A quantificação do número de células marcadas foi realizada com o auxílio do software ImageJ® (Aumento de 200x, escala de 50µm). E – epiderme e D – derme.

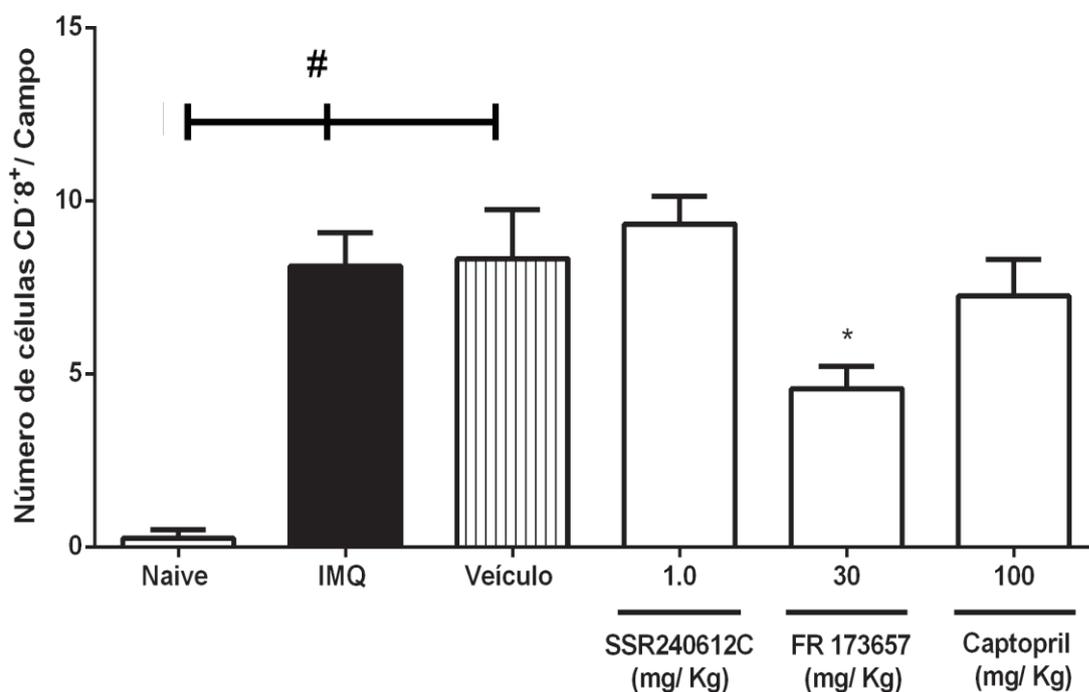


Figura 48. Efeito dos tratamentos com antagonistas e captopril na migração de células T CD8⁺ induzida por IMQ. Objetivando avaliar a participação do sistema das cininas na migração de linfócitos T CD8⁺ para a lesão psoriática, amostras teciduais de camundongos C57BL/6 tratados com SSR240612C (1,0 mg/Kg), FR 173657 (30 mg/Kg) ou Captopril (100 mg/Kg) ao longo do modelo de psoríase induzida por IMQ, foram analisadas por imunofluorescência. A quantificação de células CD8⁺ foi realizada com o auxílio do software ImageJ®. As barras verticais representam a média ± E.P.M (n=6-8) de cada grupo. A análise estatística foi verificada através da análise de variância (ANOVA de uma via), seguida pelo teste de *Newman-Keuls*. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao grupo Veículo, * p<0,05. # Denota diferença estatística entre o grupo Naive e IMQ (p<0,05), ou Naive e veículo (p<0,05).

Conforme representado na Figura 49, foi observado que a administração tópica repetida de IMQ promove acúmulo de IL-17 na lesão psoriática de animais WT, causando aumento de $224,49 \pm 31,37\%$ nas imunomarcações positivas para esta citocina, quando comparado ao grupo Naive (média de 5 marcações positivas/campo) (p<0,001). Entretanto, nas amostras de pele de animais nocautes para os receptores das cininas submetidos ao modelo de psoríase induzida por IMQ, foi observada supressão significativa do acúmulo de IL-17, reduzindo em $44,65 \pm 1,38\%$ (KOB₁), $52,43 \pm 1,32\%$ (KOB₂) e $66,79 \pm 1,21\%$ (KOB_{1B2}) o número de marcações imunopositivas, quando comparado ao grupo WT (média de 22 marcações positivas/campo) (p<0,001) (Figura 49 e 50).

Sustentando a relação entre o sistema das cininas e IL-17 no processo psoriático, o bloqueio farmacológico dos receptores cininérgicos B₁ (SSR240612C) e B₂ (FR 173657) resultou em reduções de $51,96 \pm 1,39\%$ e $38,49 \pm 0,89\%$, respectivamente, na detecção desta citocina pró-inflamatória, ambos comparado ao grupo Veículo (média de 21 marcações positivas/ campo) ($p < 0,05$) (Figura 51 e 52). Além disso, conforme representado na Figura 52, o tratamento com Captopril (100 mg/Kg) foi capaz de ampliar o número de marcações positivas para IL-17 induzidas por IMQ, sendo este aumento igual a $39,32 \pm 1,24\%$, quando comparado ao grupo Veículo ($p < 0,05$). Estes resultados sugerem que os receptores de cininas podem estar envolvidos na modulação ativação de linfócitos.

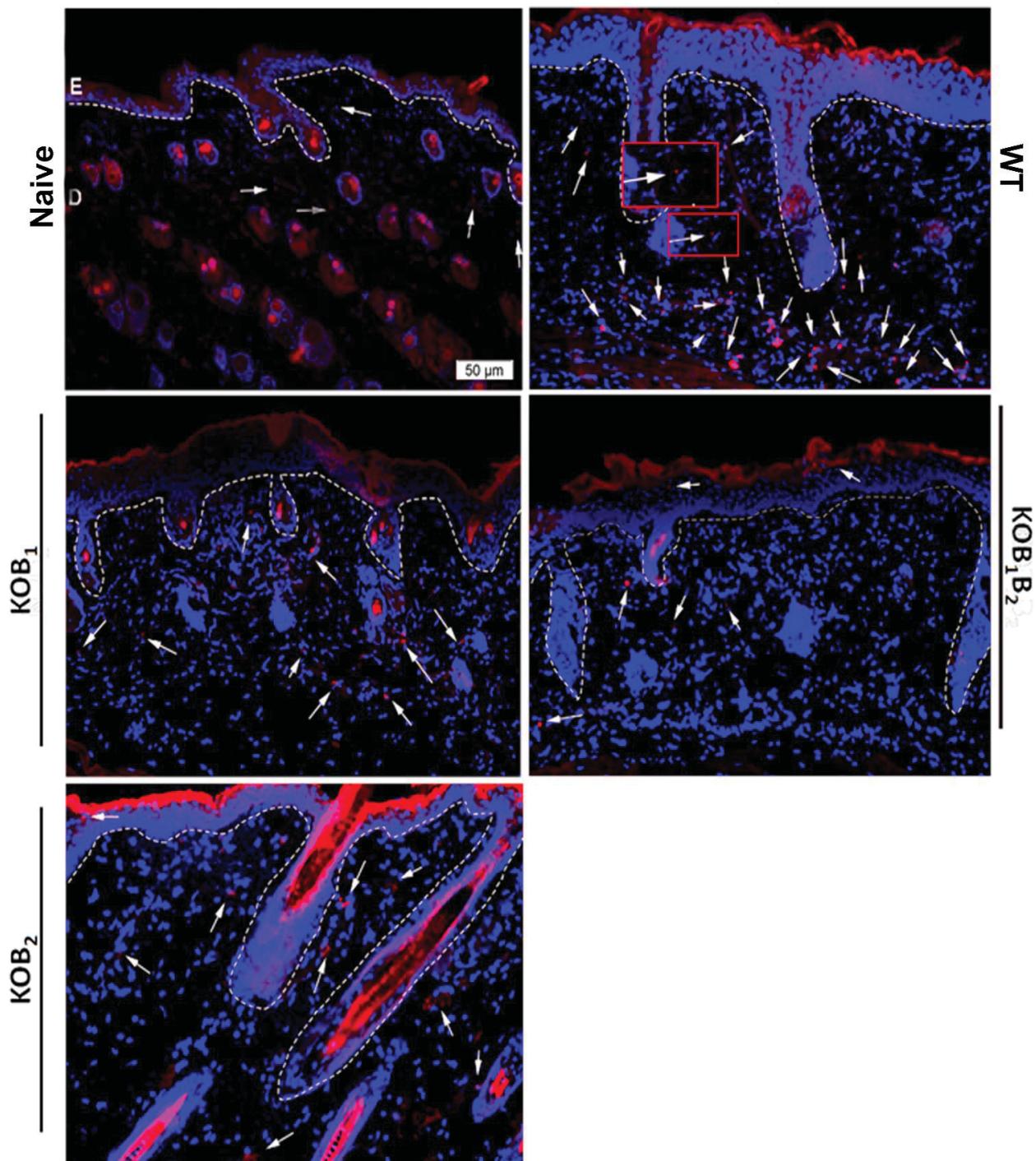


Figura 49. Imagens representativas da detecção de IL-17 na pele psoriática de animais WT e nocautes para os receptores das cininas. Amostras teciduais foram coletadas no sétimo dia do protocolo experimental. Posteriormente, foram inseridas em tissue-tek e submetidas à criopreservação. As biópsias foram seccionadas em criostato (resfriado a -35°C), e os cortes ($5\ \mu\text{m}$) submetidos à análise da presença de IL-17 através de imunofluorescência. As flechas brancas indicam regiões de marcações positivas para a citocina IL-17 (vermelho). As imagens foram adquiridas com microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão). A quantificação das marcações positivas foram realizadas com o auxílio do software ImageJ® (Aumento de 200x, escala de $50\ \mu\text{m}$). E – epiderme e D – derme.

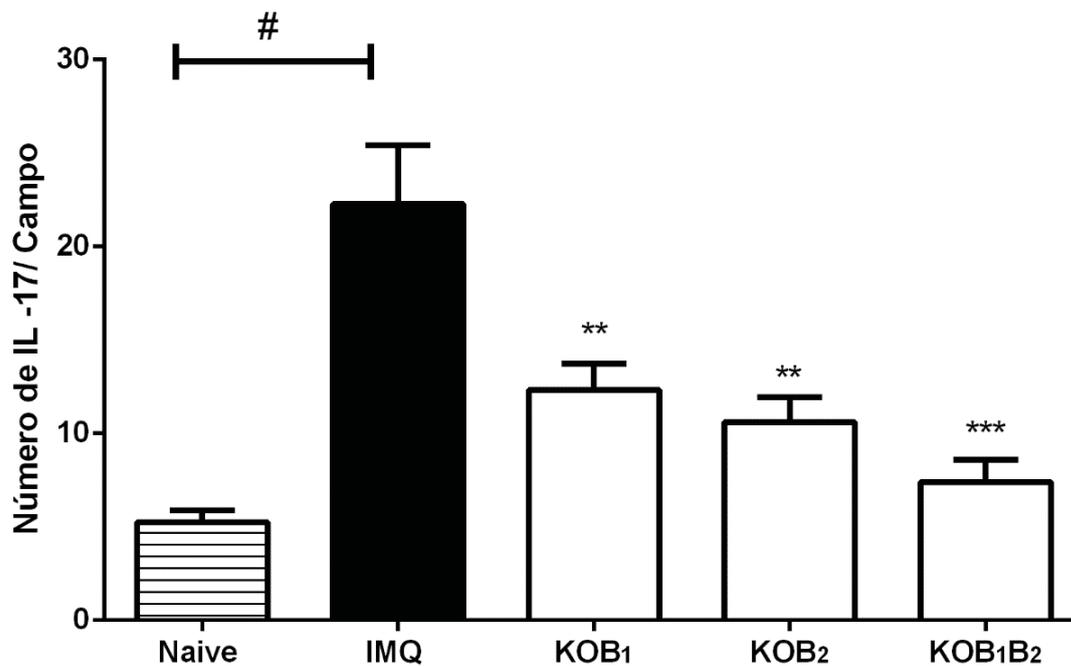


Figura 50. Influência dos receptores B₁ e B₂ das cininas no acúmulo de IL-17 na pele de animais submetidos ao modelo de psoríase induzida por IMQ. Objetivando avaliar a participação dos receptores cininérgicos no acúmulo de IL-17 nas lesões psoriáticas, amostras teciduais de camundongos, nocautes para os receptores das cininas (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂) e WT, submetidos ao modelo de psoríase induzida por IMQ, foram analisadas por imunofluorescência. A quantificação de marcações positivas para IL-17 foi realizada com o auxílio do *software ImageJ*®. As barras verticais representam a média ± E.P.M (n=6-8) de cada grupo. A análise estatística foi verificada através da análise de variância (*One-way ANOVA*), seguida pelo teste de *Newman-Keuls*. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao grupo WT, ** p<0,01 e *** p<0,001. # Denota diferença estatística entre o grupo Naive e IMQ (p<0,05).

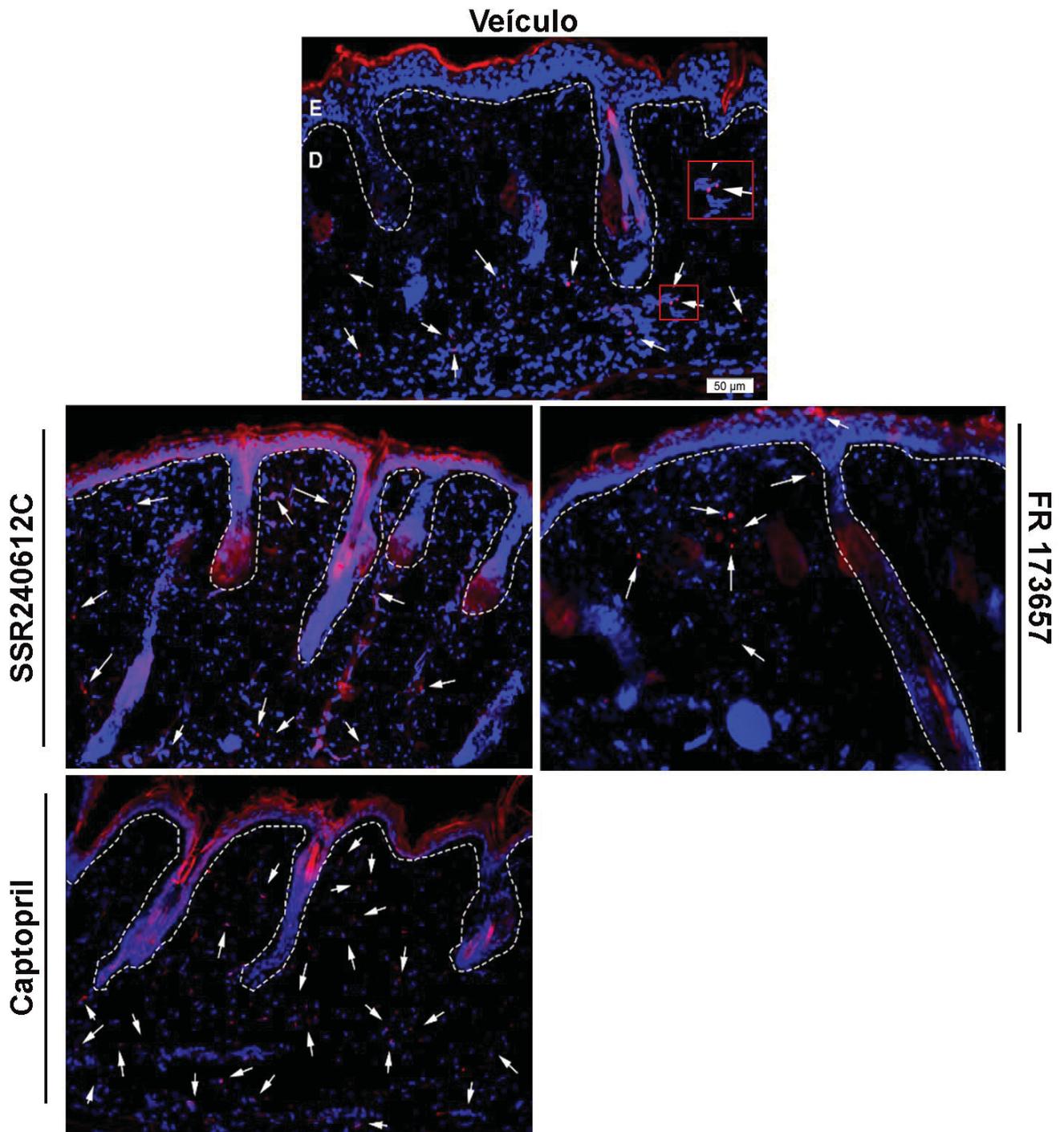


Figura 51. Imagens representativas de marcações positivas para IL-17 na lesão psoriática de animais tratados com SSR240612C, FR173657 ou Captopril. Amostras teciduais foram coletadas no sétimo dia do protocolo experimental. Posteriormente, foram inseridas em tissuetek e submetidas à criopreservação. As biópsias foram seccionadas em criostato (resfriado a -35°C), e os cortes ($5\ \mu\text{m}$) submetidos à análise da presença de IL-17 através de imunofluorescência. As flechas brancas indicam regiões de marcações positivas para a citocina IL-17 (vermelho). As imagens foram adquiridas com microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão). A quantificação das marcações positivas foram realizadas com o auxílio do software ImageJ® (Aumento de 200x, escala de $50\ \mu\text{m}$). E – epiderme e D – derme.

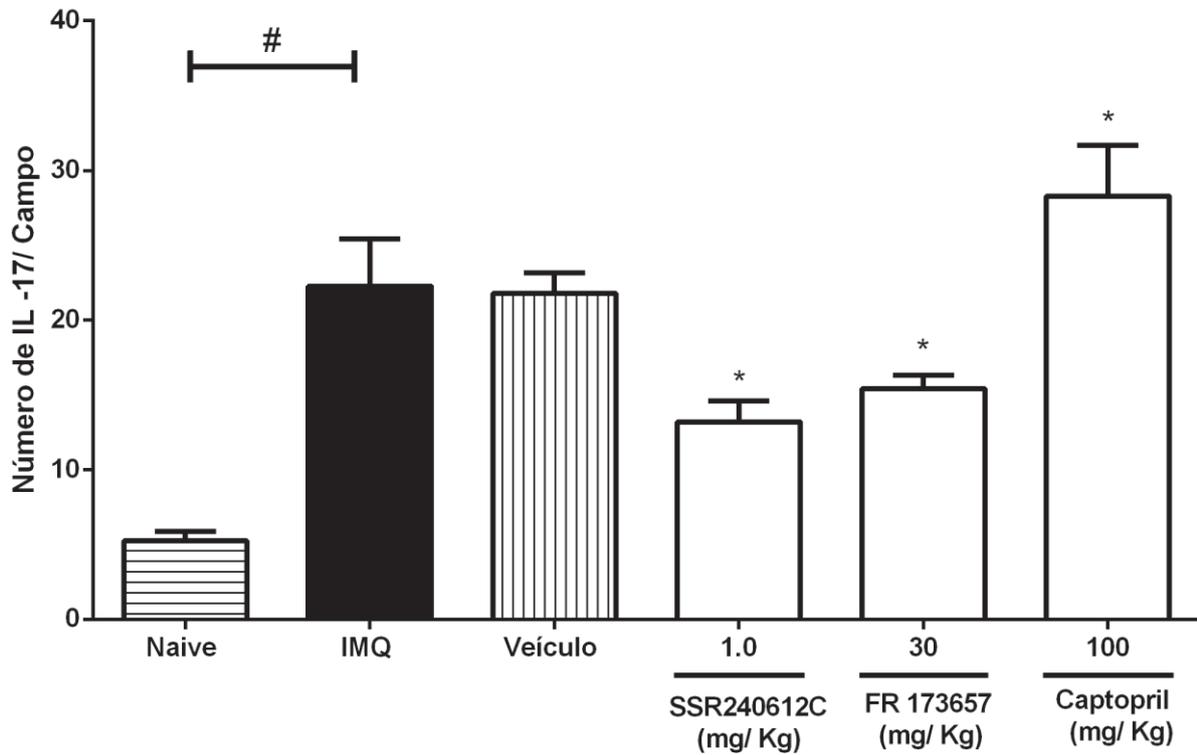


Figura 52. Influência do tratamento com antagonistas ou Captopril no acúmulo de IL-17 na lesão psoriática induzida por IMQ. Objetivando avaliar a participação do sistema das cininas no acúmulo de IL-17 nas lesões psoriáticas, amostras teciduais de camundongos tratados com SSR240612C (1,0 mg/Kg), FR 173657 (30 mg/Kg) ou Captopril (100 mg/Kg) ao longo do modelo de psoríase induzida por IMQ, foram analisadas por imunofluorescência. A quantificação de marcações positivas para IL-17 foi realizada com o auxílio do software ImageJ®. As barras verticais representam a média ± E.P.M (n=6-8) de cada grupo. A análise estatística foi verificada através da análise de variância (*One-way ANOVA*), seguida pelo teste de *Newman-Keuls*. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao grupo Veículo, * $p < 0,05$. # Denota diferença estatística entre o grupo Naive e IMQ ($p < 0,05$).

5.6 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA DAS CININAS NAS ALTERAÇÕES DO PESO DE ÓRGÃOS LINFÓIDES INDUZIDA POR IMQ

IMQ é um potente ativador do sistema imunológico, sendo observado que seus efeitos não estão restritos à pele (Fits *et al.*, 2009; Hawkes, Gudjonsson e Ward, 2017). Desta forma, com o intuito de avaliar efeitos sistêmicos induzidos pelas repetidas administrações tópicas de IMQ, órgãos linfóides (baço, linfonodo inguinal e axilar) foram coletados (Dia 7) e submetidos à pesagem (Figura 53 e 54). Os resultados obtidos mostraram que ao longo do protocolo experimental, as repetidas administrações tópicas de IMQ foram capazes de promover alterações significativas no peso de todos os órgãos linfóides avaliados de animais pertencentes ao grupo WT, quando comparado ao grupo Naive ($p < 0,001$) (Figura 53). As pesagens constataram aumento de $43,48 \pm 4,46\%$, $67,56 \pm 6,61\%$ e $114,55 \pm 6,27\%$, na média do peso do linfonodo inguinal, linfonodo axilar e do baço, respectivamente (Figura 53). Em contraste, a ausência dos receptores das cininas foi capaz de inibir a hiperplasia dos órgãos linfóides induzida por IMQ. Conforme observado na Figura 53A, a ausência de B₂R atenuou a esplenomegalia induzida por IMQ, atenuando o aumento do peso do baço nos KOB₂ ($25,81 \pm 6,48\%$) e nos KOB₁B₂ ($33,51 \pm 3,77\%$), comparado ao grupo WT (peso médio de 0,0087 mg/Kg) ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas entre o peso médio do baço dos animais KOB₁ e WT tratados com IMQ ($p > 0,05$) (Figura 53A).

Resultados semelhantes foram observados quando avaliado o peso do linfonodo axilar, onde a ausência do receptor B₂ das cininas resultou em redução no peso médio do linfonodo axilar, sendo esta redução igual a $69,76 \pm 2,71\%$ (KOB₂). Em adição, no grupo duplo nocaute (KOB₁B₂) houve redução de $63,62 \pm 4,51\%$ no peso médio do linfonodo axilar, em comparação ao grupo WT ($p < 0,05$) (peso médio de 0,00049 mg/Kg) (Figura 53B). Diferenças estatísticas não foram observadas no peso dos linfonodos axilares de camundongos KOB₁ ($p > 0,05$) (Figura 53B). Como representado na Figura 53C, ausência de receptores de cininas também preveniu o ganho de peso no linfonodo inguinal, havendo reduções de $25,98 \pm 4,18\%$ (KOB₁), $71,63 \pm 2,95\%$ (KOB₂) e $41,62$

$\pm 4,35\%$ (KOB₁B₂) na média do peso do linfonodo inguinal, comparado ao grupo WT ($p < 0,001$) (peso médio de 0,00074 mg/Kg).

Os resultados apresentados na Figura 54 demonstram que os antagonistas seletivos dos receptores B₁R ou B₂R protegeram parcialmente as alterações induzidas por IMQ nos órgãos linfóides, quando comparado com o grupo veículo. O tratamento com o antagonista FR173657 promoveu reduções de $47,56 \pm 3,88\%$ no peso médio do baço ($p < 0,01$), enquanto SSR240612C não promoveu alterações significativas, quando comparados ao grupo veículo ($p > 0,05$) (peso médio de 0,0098 mg/Kg) (Figura 54A). Semelhantemente, um efeito protetor foi observado nos grupos tratamentos com SSR240612C ($p < 0,01$) e FR173657 ($p < 0,001$), sendo observado reversão do aumento do peso do linfonodo axilar em $25,31 \pm 1,31\%$ e $36,69 \pm 1,36\%$, respectivamente, comparado com o grupo Veículo (peso médio de 0,0004 mg/Kg) (Figura 54B). Em adição, os tratamentos com SSR240612C ($42,29 \pm 4,90\%$) e FR173657 ($27,80 \pm 2,47\%$) inibiram o aumento do peso médio do linfonodo inguinal, relativo ao grupo veículo ($p < 0,05$) (peso médio de 0,00046mg/Kg) (Figura 54C).

O tratamento com Captopril não promoveu alterações significativas no peso do baço e linfonodo inguinal, contudo elevou o peso médio do linfonodo axilar em $38,41 \pm 2,04\%$, relativo ao grupo veículo ($p < 0,01$) (Figura 54). Resultados estes que reforçam a relevância do sistema de cininas em processos que modulam a resposta imune durante processos inflamatórios crônicos.

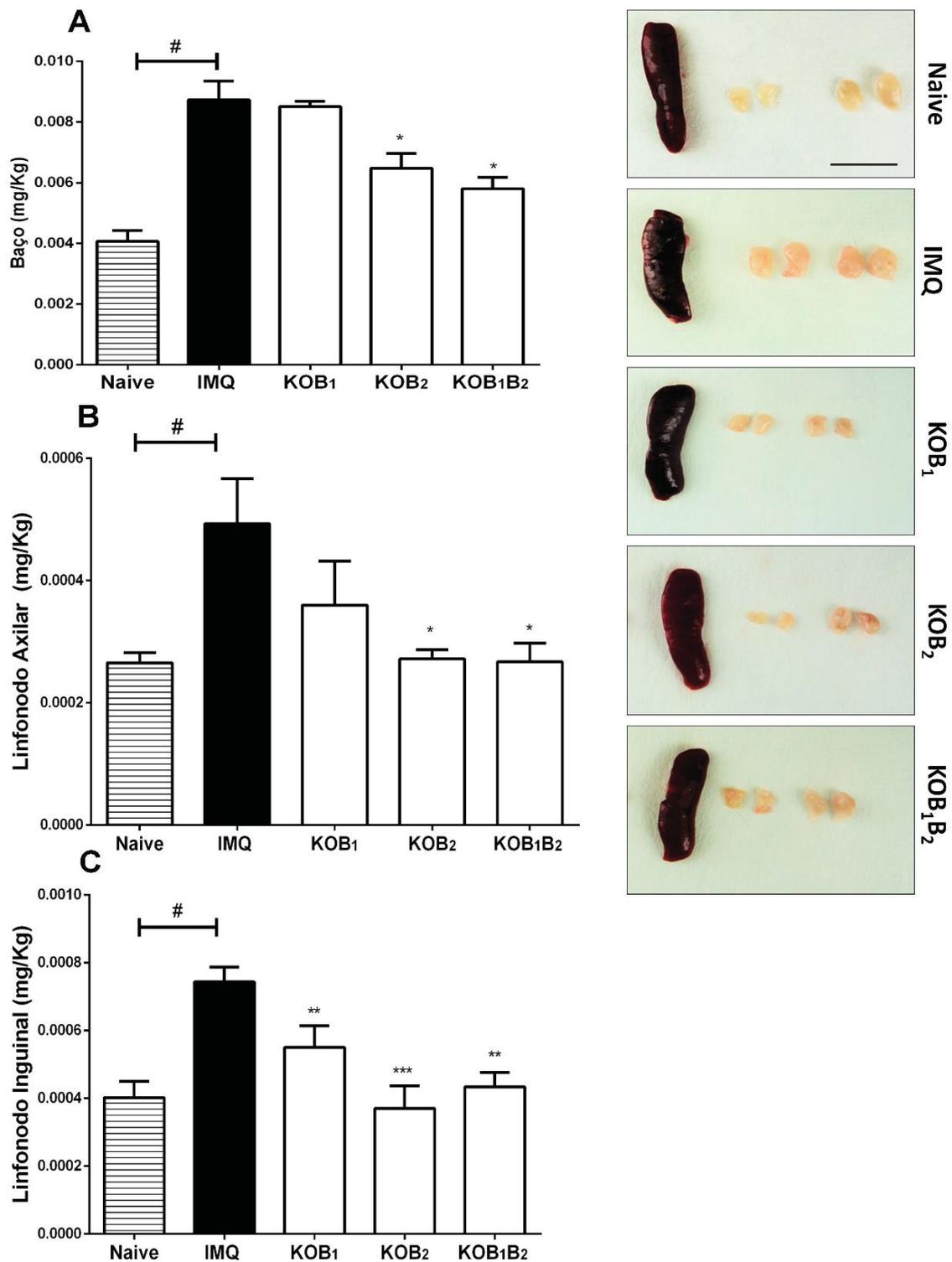


Figura 53. Avaliação do peso de órgãos linfóides de animais WT e nocautes para os receptores das cininas (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂) submetidos ao modelo de psoríase induzida por IMQ. No último dia do protocolo experimental, foi realizada a eutanásia dos animais e a coleta e pesagem do (A) baço, (B) linfonodos axilares e (C) linfonodos inguinais de animais WT e nocautes para os receptores das cininas, submetidos ao modelo de inflamação crônica tipo psoriática induzida por IMQ. As barras verticais representam a média \pm E.P.M (n=6-8) de cada grupo. A análise estatística foi verificada através da análise de variância (ANOVA de uma via), seguida pelo teste de *Newman-Keuls*. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao grupo WT, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. # Denota diferença estatística entre o grupo Naive e IMQ ($p < 0,05$) (Escala de 1cm).

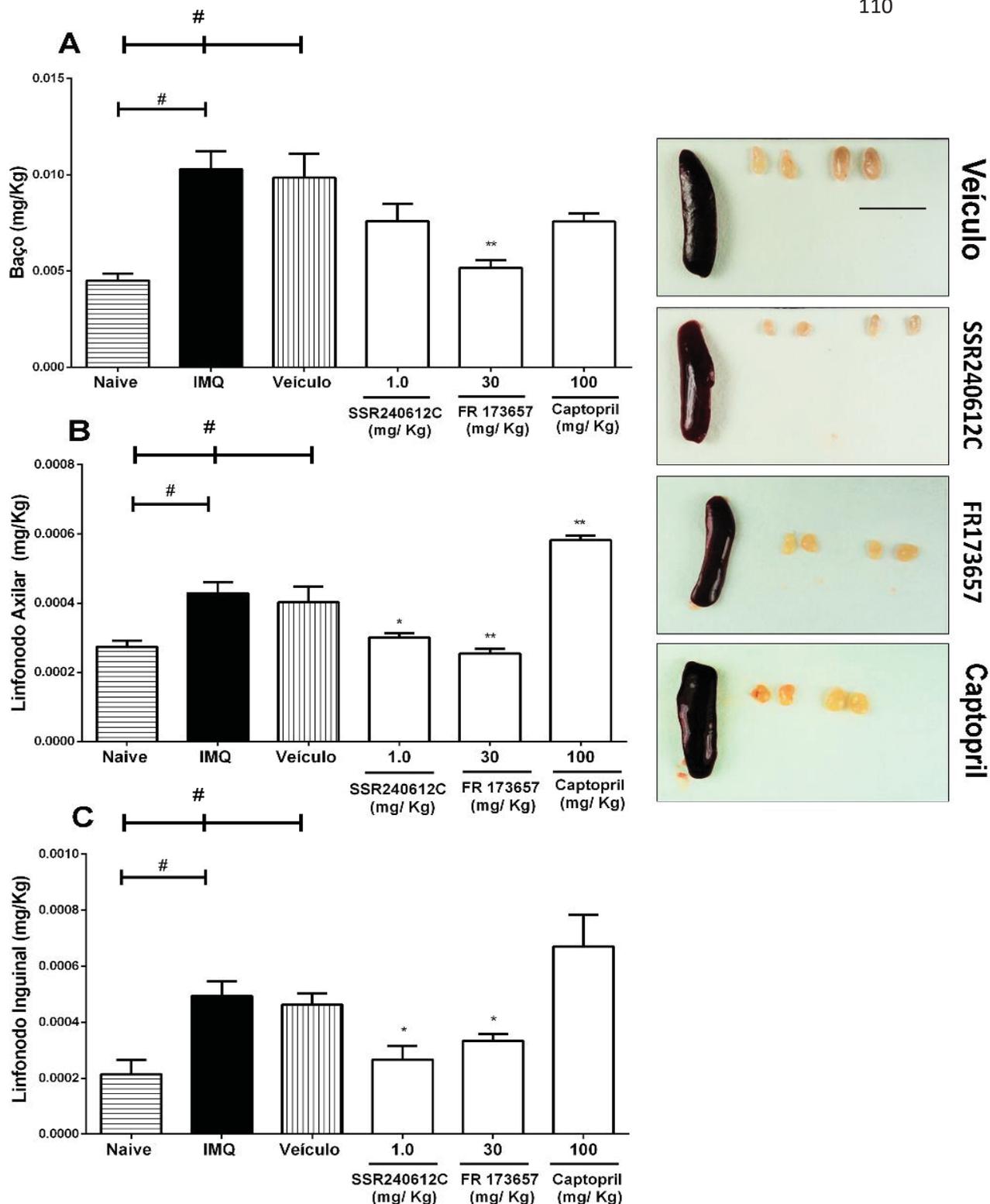


Figura 54. Influência do tratamento com antagonistas dos receptores de cininas e com Captopril no peso de órgãos linfóides de animais submetidos ao modelo de inflamação crônica tipo psoriática induzida por IMQ. No último dia do protocolo experimental, foi realizada a eutanásia dos animais, coleta e pesagem do (A) baço, (B) linfonodos axilares e (C) linfonodos inguinais de animais tratados com SSR240612C (1,0 mg/Kg), FR173657 (30 mg/Kg) ou Captopril (100 mg/Kg), ao longo do modelo experimental de psoríase induzida por IMQ. As barras verticais representam a média \pm E.P.M (n=6-8) de cada grupo. A análise estatística foi verificada através da análise de variância (ANOVA de uma via), seguida pelo teste de *Newman-Keuls*. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao grupo Veículo, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. # Denota diferença estatística entre o grupo Naive e IMQ ($p < 0,05$), ou Naive e veículo ($p < 0,05$) (Escala de 1 cm).

5.7 AVALIAÇÃO DO BEM-ESTAR DE ANIMAIS SUBMETIDOS AO MODELO DE PSORÍASE INDUZIDO DO IMQ

Para avaliar o bem-estar de animais submetidos ao modelo de psoríase induzida por IMQ, foi realizada a análise da construção do ninho (*Nest building*) (Figura 55 e 56). Conforme observado na Figura 55A, animais WT tratados repetidamente com IMQ não construíram ninhos ou construíram ninhos menos elaborados, em comparação com o grupo Naive (pontuação média igual a 3,9). Ou seja, os resultados evidenciaram redução do escore médio de construção do ninho nos animais WT (pontuação média igual a $0,58 \pm 0,15$) que receberam IMQ por 6 dias consecutivos ($p < 0,001$) (Figura 55). Em contraste, foi observada a construção de ninhos mais elaborados por animais nocautes submetidos ao modelo de psoríase induzida por IMQ, havendo consequente aumento dos escores médios de construção de ninho, sendo estes iguais a $1,7 \pm 0,25$ (KOB₁), $2,3 \pm 0,20$ (KOB₂) e $2,8 \pm 0,12$ (KOB₁B₂), comparado ao grupo WT (Figura 55B).

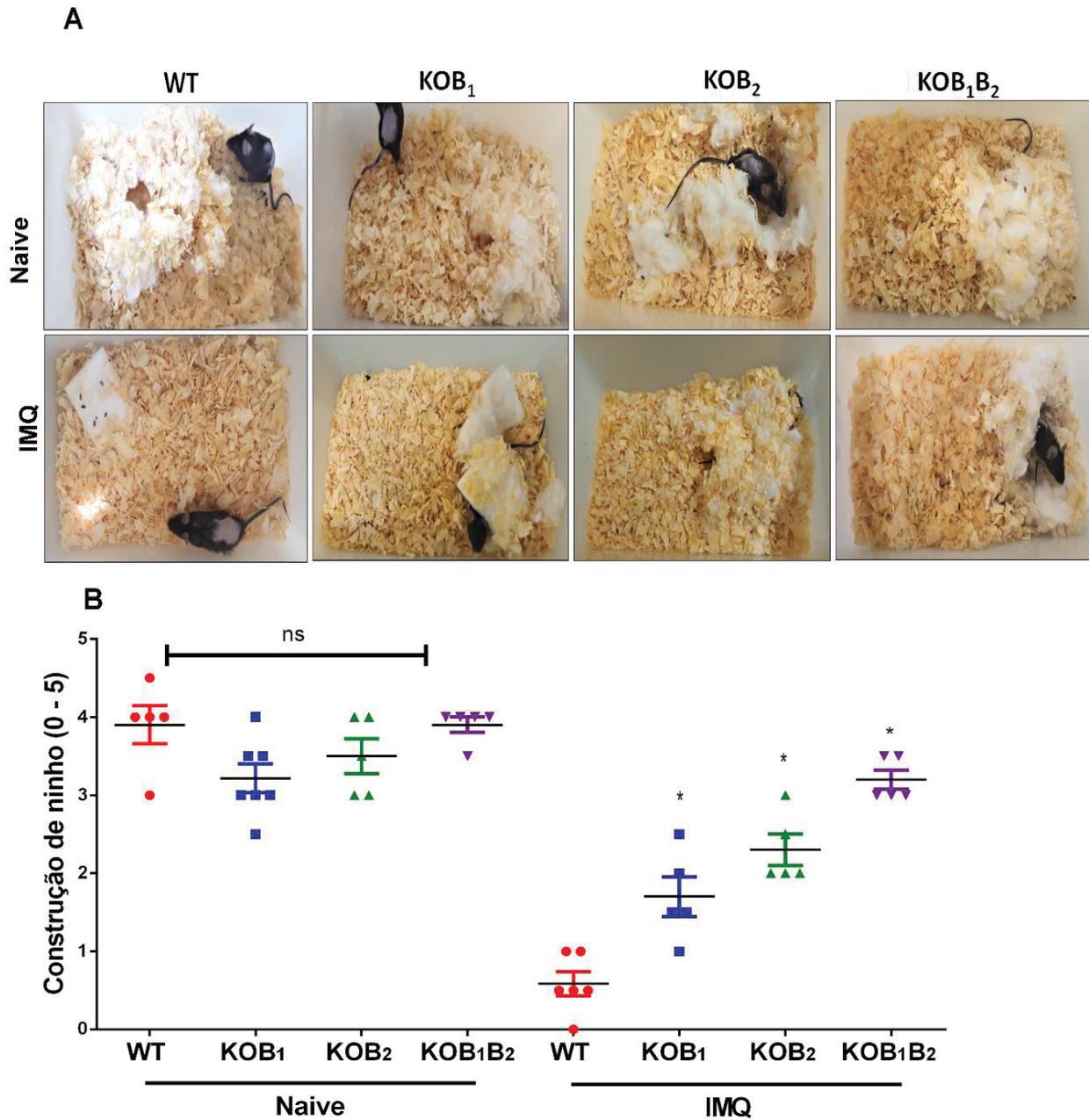


Figura 55. Avaliação do bem-estar de animais WT e nocautes para os receptores das cininas submetidos ao modelo de psoríase induzida por IMQ. O comportamento de construção de ninhos foi utilizado como indicador de bem-estar animal no modelo de psoríase induzida por IMQ. (A) Imagens representativas do ninho construído por animais WT e nocautes (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂) tratados com IMQ, assim como, seus respectivos grupos Naive. (B) escore da construção do ninho de cada grupo experimental. Os pontos representam o escore de cada animal (n=5-7), sendo estes avaliados valores obtidos através de avaliação cega. A análise estatística foi verificada através de ANOVA de uma via (teste não paramétrico, Kruskal-Wallis), seguida pelo teste de múltiplas comparações de Dunn's. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao grupo WT, * p<0,05. # Denota diferença estatística entre o grupo Naive e IMQ (p<0,05).

Resultados semelhantes foram observados nos animais tratados com antagonistas dos receptores cininérgicos, onde os escores dos ninhos foram maiores após tratamento com SSR240612C ($1,8 \pm 0,25$) ou FR173657 ($2,3 \pm 0,18$), comparado com o grupo veículo ($0,58 \pm 0,15$) ($p < 0,05$) (Figura 56). Não foram observadas alterações significativas entre o grupo Veículo (DMSO 0,03%, v/v) e IMQ (pontuação média igual a $0,5 \pm 0,18$) ($p > 0,05$) (Figura 56).

Em adição, os dados obtidos mostraram que além de tornar o processo psoriático induzido por IMQ mais severo, animais tratados com Captopril (100 mg/Kg) obtiveram redução do escore médio de construção de ninho ($0,12 \pm 0,08$), quando comparado ao grupo Veículo ($0,33 \pm 0,08$) ($p < 0,05$) (Figura 57). Não foram observadas alterações significativas entre o grupo Veículo (Salina) e IMQ (pontuação média igual a $0,47 \pm 0,15$) ($p > 0,05$) (Figura 57B).

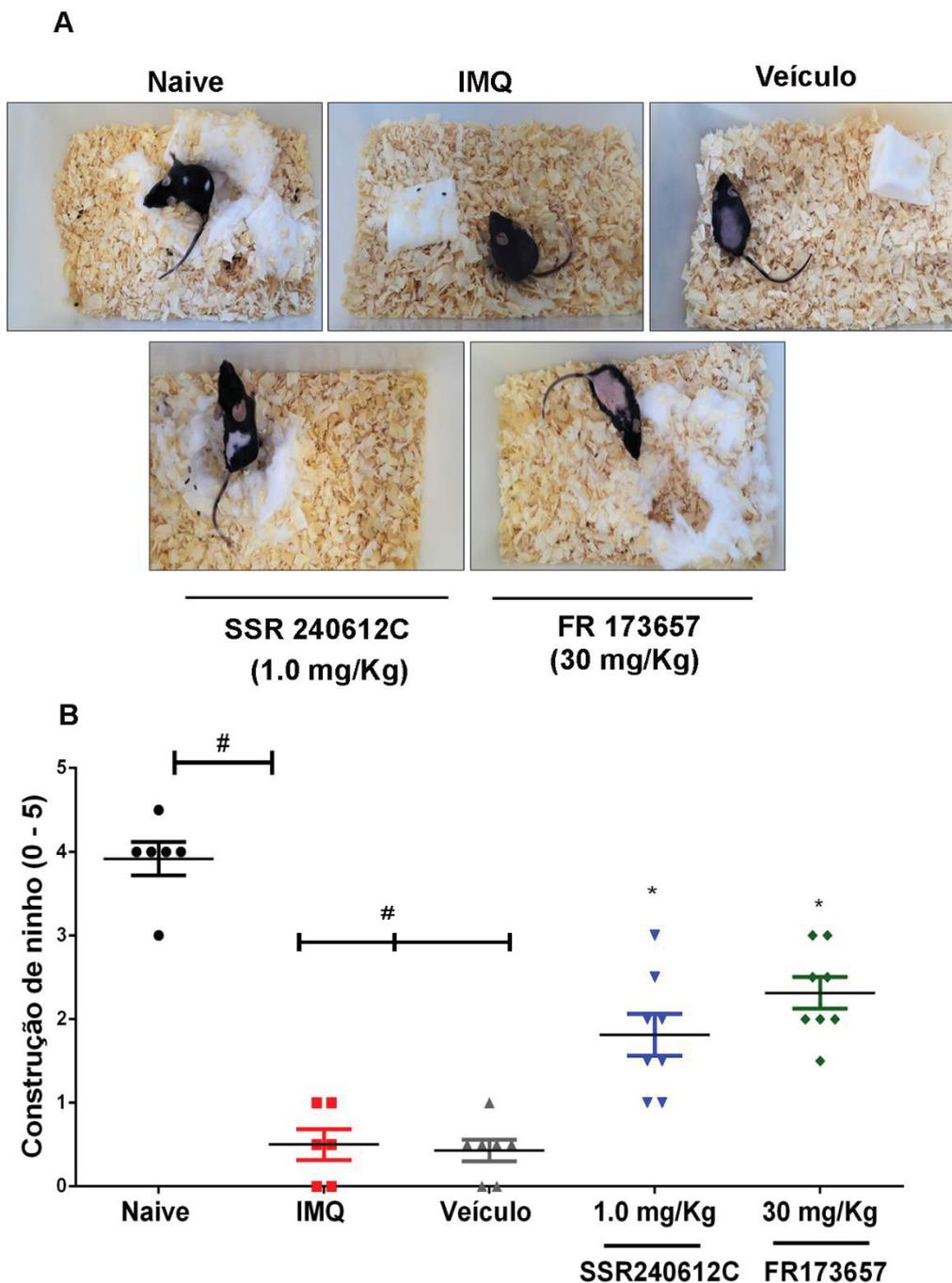


Figura 56. Efeito do tratamento com antagonistas dos receptores B₁ e B₂ das cininas no bem-estar de animais submetidos ao modelo de psoríase induzido por IMQ. O comportamento de construção de ninhos foi utilizado como indicador de bem-estar animal no modelo de psoríase induzida por IMQ. (A) Imagens representativas do ninho construído por camundongos C57BL/6 tratados com SSR240612C (0,1 mg/Kg), FR173657 (30 mg/Kg) ou Veículo (DMSO 0,03%, v / v), ao longo do modelo de psoríase induzida por IMQ. (B) escore da construção do ninho de cada grupo experimental. Os pontos representam o escore de cada animal (n=6-8), sendo estes avaliados valores obtidos através de avaliação cega. A análise estatística foi verificada através de ANOVA de uma via (teste não paramétrico, Kruskal-Wallis), seguida pelo teste de múltiplas comparações de Dunn's. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao grupo Veículo, * p<0,05. # Denota diferença estatística entre o grupo Naive e IMQ (p<0,05), ou Naive e veículo (p<0,05).

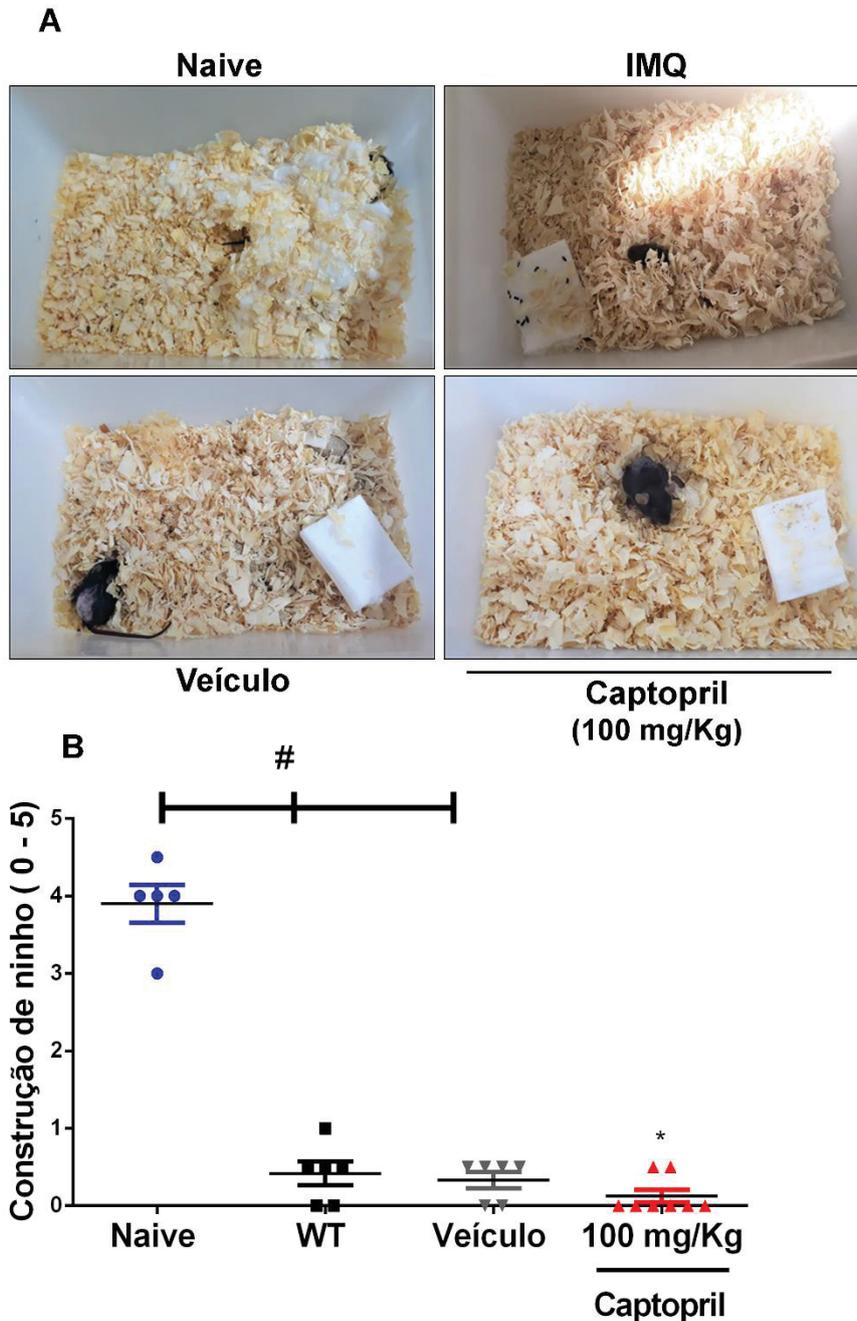


Figura 57. Impacto da tratamento com Captopril no bem-estar de animais submetidos ao modelo de psoríase induzido por IMQ. Com o intuito de avaliar o efeito do tratamento com Captopril (100 mg/Kg) no bem-estar de animais submetidos ao modelo de inflamação crônica induzida por aplicações múltiplas de IMQ, foi realizada a avaliação do comportamento de construção de ninhos. (A) Imagens representativas do ninho construído por camundongos C57BL/6 tratados com Captopril (100 mg/Kg) ou Veículo (Salina), ao longo do modelo de psoríase induzida por IMQ. (B) escore da construção do ninho de cada grupo experimental. Os pontos representam o escore de cada animal (n=5-8), sendo estes avaliados valores obtidos através de avaliação cega. A análise estatística foi verificada através de ANOVA de uma via (teste não paramétrico, Kruskal-Wallis), seguida pelo teste de múltiplas comparações de Dunn's. Os símbolos representam o nível de significância em relação ao grupo Veículo. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao grupo Veículo, * p<0,05. # Denota diferença estatística entre o grupo Naive e IMQ (p<0,05), ou Naive e veículo (p<0,05).

6. DISCUSSÃO

Ressaltando a importância do sistema Calicreína- Cininas (SCC), uma enorme quantidade de dados mostram a participação deste sistema em diversos processos fisiológicos e patológicos (Sharma e Al-Sherif, 2006; Tang, Leung e Lai, 2011). Contudo, o papel das cininas e de seus receptores nesses processos ainda é pouco compreendido. Com o intuito de elucidar o papel das cininas em processos fisiopatológicos, diferentes ferramentas experimentais tem sido utilizadas, dentre estas estão os animais nocautes e os antagonistas seletivos (B₁R e B₂R) (Garbacki *et al.*, 2005; Pesquero e Bader, 2006; Tang, Leung e Lai, 2011). Logo, o silenciamento genético e farmacológico dos receptores de cininas já auxiliaram na elucidação da importância do SCC em diferentes afecções, como, por exemplo, em doenças cardiovasculares (Su, 2006), doença de Alzheimer (Chemistry *et al.*, 2011), rinite alérgica, asma (Proud, 1998) e algumas neoplasias (Costa-Neto, Claudio M. *et al.*, 2008; Howl e Payne, 2003).

Nesse contexto, evidências sugerem a participação do sistema das cininas na progressão da psoríase, um distúrbio cutâneo autoimune da pele, todavia, muitas perguntas ainda não têm resposta (Marshman, Burton e Archer, 1996; Poblete *et al.*, 1991; Schremmer-Danninger *et al.*, 1999). Dados prévios a do nosso grupo mostraram que a ausência dos receptores das cininas é capaz de reduzir migração de leucócitos e a hiperproliferação de queratinócitos induzidos pela administração tópica repetida de TPA em camundongos (Petrovski, Mendes, *et al.*, 2011). Dando continuidade a esta ideia, o presente estudo procurou esclarecer o papel do sistema das cininas na psoríase induzida por IMQ em camundongos.

O IMQ, uma imidazoquinolina, é um agonista de receptores do tipo Toll 7 e 8 (TLR, do inglês, “*toll-like receptors*”) com potente atividade antiviral e antitumoral, sendo aprovado para o tratamento tópico de verrugas genitais, ceratose e carcinoma basocelular superficial em humanos (Sauder, 2002). Além disso, relatos mostram que a aplicação clínica de IMQ pode induzir psoríase em pacientes com predisposição genética, ou exacerbar a doença em pacientes com psoríase leve ou controlada (Kim, 2019; Ueyama *et al.*, 2014). Fits *et al.*

(2009) descreveram que administrações repetidas de IMQ na pele de camundongos é capaz de induzir eventos inflamatórios que espelham a psoríase humana, incluindo características histopatológicas, ativação de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento de infiltrados celulares (Fits *et al.*, 2009; Kim, 2019). Por esses motivos, atualmente, o modelo de inflamação crônica tipo psoriática induzida por IMQ é um dos modelos murinos mais utilizados em estudos não clínicos de psoríase (Hawkes, Gudjonsson e Ward, 2017).

Posto isto, nossos resultados mostraram a expressão constitutiva de ambos os receptores de cininas na pele de camundongos WT sob condições fisiológicas. Além disso, a inflamação cutânea induzida por IMQ promoveu aumento dos receptores de cininas (B₁R e B₂R) nas lesões psoriáticas, em comparação com a expressão na pele de animais Naive (saudáveis). Schremmer-Danninger *et al.* (1999) descreveu a presença constitutiva dos receptores cininérgicos na pele humana, assim como, a regulação positiva de B₂R e B₁R durante distúrbios cutâneos (Schremmer-Danninger *et al.*, 1999). Diversos estudos descreveram que os receptores B₂R são constitutivos e participam de processos fisiológicos e patológicos agudos, enquanto os B₁R teriam sua expressão induzida durante processos inflamatórios ou após lesões teciduais, de maneira semelhante à ciclo-oxigenase 2 (Calixto *et al.*, 2004; Scharfstein, Ramos e Barral-Netto, 2017). De fato, o tratamento com IMQ levou à superexpressão de B₁R (mais de 500%), como descrito em muitas condições inflamatórias. Além disso, dados da literatura mostram correlações entre a regulação positiva dos receptores das cininas e o desenvolvimento de diferentes condições patológicas, como, por exemplo, na inflamação das vias aéreas e hiperreatividade brônquica (Zhang *et al.*, 2013), em doenças inflamatórias intestinais (Marceau e Regoli, 2008) e carcinomas (Zhang *et al.*, 2011). Ainda, dando suporte aos nossos achados, resultados obtidos por Schremmer-Danninger *et al.* (2004) mostraram a superexpressão de componentes do sistema das cininas em pacientes com diferentes tipos de psoríase (Schremmer-Danninger *et al.*, 2004). Portanto, esses resultados indicam que os receptores das cininas estão presentes na pele e de alguma forma sendo influenciados pelo processo inflamatório gerado pelo IMQ, o qual parece ser semelhante à psoríase.

Consistente com os achados de Fits *et al.* (2009), a administração tópica de IMQ na pele de animais WT, durante 6 dias, induziu a formação de lesões do tipo psoriática, incluindo intenso eritema, espessamento e descamação da pele. Entretanto, nossos resultados mostraram que a ausência dos receptores B₁ e B₂ das cininas reduziu o desenvolvimento das lesões cutâneas induzidas por IMQ em camundongos nocautes (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂). Ressaltando o envolvimento do sistema das cininas no desenvolvimento e progressão da psoríase, o bloqueio farmacológico dos receptores B₁ e B₂ das cininas promoveu redução da severidade das lesões psoriáticas induzidas por IMQ e, conseqüente, redução do índice PASI em animais tratados com SSR240612C e FR173657. Em conjunto, os dados indicam que as cininas podem estar participando intensamente do processo psoriático, de modo que o bloqueio da sua atividade reduz significativamente a severidade das lesões macroscópicas diretamente relacionadas à doença.

Sabe-se que a administração repetida de IMQ é capaz de induzir hiperplasia epidérmica, hiperqueratose e intenso infiltrado inflamatório na derme, promovendo alterações histopatológicas semelhante às observadas na psoríase humana (Fits *et al.*, 2009; Kim, 2019; Rendon e Schakel, 2019). Nossos dados mostram, a partir de análise histológica, que animais nocautes para os receptores das cininas, assim como, animais tratados com SSR240612C e FR173657, apresentaram redução expressiva do infiltrado inflamatório após administrações consecutivas de IMQ. Na verdade, vários estudos descrevem a influência das cininas na adesão e migração de leucócitos em humanos e em modelos animais (Bourdet *et al.*, 2010a; Costa *et al.*, 2011; Santos, Dos *et al.*, 2008; Shaw e Harper, 2011). Em primeira instância, sabe-se que as cininas são peptídeos vaso ativos capazes de promover aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação, processos estes que facilitam o recrutamento de células imunes (Costa-Neto *et al.*, 2008; Maurer *et al.*, 2011). Além disso, diversos estudos já atestaram a expressão dos receptores das cininas em diferentes células do sistema imune, incluindo monócitos, neutrófilos, células dendríticas e linfócitos (Bertram *et al.*, 2007a; Bertram *et al.*, 2007; Dutra, 2017a). Sendo que, a ativação dos receptores B₁ e B₂ estaria relacionada com a ativação,

diferenciação, proliferação e, principalmente, migração nesses tipos celulares (Dutra, 2017a).

Estes são dados de relevância, visto que, cada vez mais estudos mostram que o infiltrado contínuo de neutrófilos e macrófagos na pele contribuem para a manutenção da inflamação observada na psoríase (Clark e Kupper, 2006; Katayama, 2018; Shao *et al.*, 2019). Shao *et al.*, (2019) mostraram que um dos mecanismos pelo qual neutrófilos contribuem para a patogênese da psoríase é através da liberação de NETs (do inglês, “*neutrophil extracellular traps*”), as quais interagem diretamente com os queratinócitos levando a ativação da via de via de sinalização MyD88/NF- κ B por um mecanismo dependente do sinergismo de TLR4/ IL-36R (Shao *et al.*, 2019). Por sua vez, a ativação de MyD88/NF- κ B regula positivamente a expressão de múltiplas citocinas e quimiocinas, resultando em acumulação de células inflamatórias e amplificação da cascata inflamatória na psoríase (Shao *et al.*, 2019). Ressaltando o envolvimento e importância de polimorfonucleares, foi demonstrado que a ação terapêutica de anticorpos anti-IL17A está associada à redução significativa no número de neutrófilos infiltrados na pele psoriática (Katayama, 2018).

Em adição, o recrutamento e ativação de macrófagos tem sido considerado um evento patogênico importante no desenvolvimento e manutenção da psoríase (Clark e Kupper, 2006; Wang *et al.*, 2019). Wang *et al.*, (2019) recentemente mostram que macrófagos produzem e liberam TNF e IL-23 na pele psoriática, resultando na estimulação de células T produtoras de IL-17, incluindo Th17 e células T $\gamma\delta$ +, e contribuindo para a cronificação do processo inflamatório observado na pele psoriática (Wang *et al.*, 2019).

Uma das primeiras descrições da capacidade de quimioatração do receptor B₁ das cininas data de 1996, onde foi demonstrado que, após pré-tratamento com IL-1 β , des-arg-BK foi capaz de induzir pronunciada migração de neutrófilos em modelo murino de *air pouch* (Duchene e Ahluwalia, 2009a; Paegelow *et al.*, 2002). Reforçando o envolvimento do receptor B₁, o bloqueio do infiltrado de polimorfonucleares foi alcançado após administração do antagonista des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (Duchene e Ahluwalia, 2009a; Paegelow *et al.*,

2002). Resultados semelhantes foram observados *in vitro*, onde a ativação do receptor B₁ promoveu a quimiotaxia de neutrófilos (Bertram *et al.*, 2007b). Fortalecendo estes achados, estudos com animais nocautes mostram que a inativação do gene responsável pela expressão do receptor B₁ das cininas está associada à deficiência no acúmulo de neutrófilos em tecidos inflamados (Costa *et al.*, 2014; Duchene e Ahluwalia, 2009b; McLean, Ahluwalia e Perretti, 2000). Ainda, foi observado que a ativação dos receptores cininérgicos promove aumento da expressão de moléculas de adesão, como Mac-1, ICAM-1 ou P-selectina (Guevara-Lora *et al.*, 2011, 2014b; McLean, Ahluwalia e Perretti, 2000; Shigematsu *et al.*, 2002) e indução da síntese de CXCL5, quimiocina com importante papel no tráfego de neutrófilos (Duchene *et al.*, 2007; Duchene e Ahluwalia, 2009b).

Desta forma, a participação do receptor B₁ na modulação da migração de polimorfonucleares é incontestável (Kahn *et al.*, 2017). Resultados semelhantes foram obtidos com relação ao receptor B₂, onde BK foi capaz de modular o infiltrado de neutrófilos *in vivo* e *in vitro* (Moran *et al.*, 2016; Santos, Calixto e Souza, 2003). Reforçando o envolvimento do receptor B₂ das cininas, Böckmann e Paegelow, (2000) mostraram que a migração de polimorfonucleares, induzida pela incubação com BK *in vitro*, é revertida significativamente pelo antagonista HOE 140 (Icatibant) (Böckmann e Paegelow, 2000).

Semelhante ao que ocorre com leucócitos polimorfonucleares, cininas presentes no local da inflamação também podem modular a atividade de mononucleares. A expressão dos receptores das cininas (B₁R e B₂R) já foi evidenciada em monócitos e macrófagos (Bertram *et al.*, 2007; Bourdet *et al.*, 2010b). A expressão constitutiva do receptor B₂ foi descrita em células indiferenciadas, enquanto o subtipo B₁ tem uma baixa expressão (Böckmann e Paegelow, 2000; Bourdet *et al.*, 2010b; Guevara-Lora, Florkowska e Kozik, 2009a). Em contrapartida, foi observado que a maturação de células mononucleares promove aumento da expressão de ambos os receptores cininérgicos (Guevara-Lora, Florkowska e Kozik, 2009b).

Shaw e Harper (2011), observaram que os receptores cininérgicos contribuem para o recrutamento de macrófagos em modelo de artrite aguda (Shaw e Harper, 2011). Reforçando a participação do B₂R na migração de monócitos/macrófagos, Bertram *et al.* (2007) mostraram que a estimulação deste subtipo de receptor cininérgico promove a ativação da enzima fosfolipase C e, conseqüente, aumento da concentração intracelular de cálcio (Bertram *et al.*, 2007). Além disso, camundongos KOB₁ submetidos a modelo de nefropatia mostraram uma menor taxa de infiltrado de macrófagos no rim (Estrela *et al.*, 2014). De fato, Guevara-Lora *et al.* (2014) observaram que as cininas também estimulam a expressão de proteínas de adesão em monócitos, reafirmando o envolvimento dos receptores de cininas na migração de mononucleares (Guevara-Lora *et al.*, 2014b). Portanto, as cininas são mediadores que tem importante influência estimulando, direta e/ou indiretamente, a ativação e a migração de leucócitos na inflamação. Nossos resultados mostram novamente que este fato acontece também na inflamação da pele do tipo psoríase.

Ademais, os resultados indicam a participação de ambos os receptores cininérgicos nos processos de proliferação e diferenciação de queratinócitos na pele psoriática. Conforme observado pelas análises histológica e imunohistoquímica, nossos dados mostraram que a deleção dos receptores das cininas (B₁R e B₂R) reduziu o número de queratinócitos indiferenciados e proliferantes nas lesões psoriasiformes induzidas por IMQ, quando comparado aos animais WT. Semelhantemente, o bloqueio farmacológico dos receptores B₁ e B₂ promoveu reduções análogas, reforçando os dados obtidos com os animais nocautes.

Corroborando com nossos achados, Talwar, Fisher e Voorhees (1990) observaram que o tratamento de queratinócitos humanos com BK promove rápido e significativo aumento nos níveis dos segundo mensageiros IP₃ e DAG, sendo a ativação dessas vias diretamente relacionada com o aumento da taxa de crescimento dessas células *in vitro* (Talwar, Fisher e Voorhees, 1990). Além do mais, Rosenbach *et al.*, (1993) mostraram que o acoplamento dos receptores cininérgicos à fosfolipase C é uma via de transdução de sinal altamente conservado em diferentes culturas de queratinócitos humanos, sendo associada a a proliferação e diferenciação de queratinócitos e tendo especial importância

na reparação epidérmica (Rosenbach *et al.*, 1993; Soley *et al.*, 2016). Sustentando a atividade mitogênica dos receptores cininérgicos, estudos descrevem a presença dos receptores B₁ e B₂ em diferentes tipos de câncer, como, por exemplo, câncer de pulmão, carcinoma gástrico humano, tumores astrocíticos e linfoma (Costa-Neto M *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2014; Howl e Payne, 2003). Assim, em condições patológicas, ambos os receptores cininérgicos parecem estar associados ao crescimento e progressão do câncer (Blaukat, 2003; Rodell, Naidoo e Bhoola, 1995), outra doença caracterizada pela proliferação desregulada de células.

A atividade mitogênica dos receptores das cininas foi associada à geração de múltiplos segundos mensageiros que convergem para ativar a MAPK (do inglês, "*Mitogen Activated Protein Kinases*"), uma importante cascata de transdução de sinal envolvida no controle da mitogênese (Golias, C *et al.*, 2007). Após ativação, a MAPK promove a fosforilação e ativação de fatores de transcrição nuclear envolvidos na síntese de DNA e divisão celular (Blaukat, 2003). Corroborando, Cheng *et al.* (2004) mostraram que a ativação do receptor B₂ das cininas promove aumento da síntese de DNA através da ativação da via de sinalização MAPK p42/p44 (Cheng *et al.*, 2004). Da mesma maneira, a estimulação do receptor B₁ das cininas foi associado a hiperproliferação de células de câncer de mama através fosforilação da ERK1/2 (do inglês, "*Extracellular signal-regulated kinases*") (Costa *et al.*, 2014). Induzida por receptores cininérgicos, diferentes vias de ativação da MAPK foram descritas, incluindo participação das subunidades G $\beta\gamma$ dos GPCR, fosfatidilinositol 3-quinases (PI3K- do inglês, "*Phosphoinositide 3-kinases*") e Proteína quinase C (PKC – do inglês, "*Protein Kinase C* ") (Blaukat, 2003).

Além disso, o processo inflamatório na pele é caracterizado pela interferência de muitos outros fatores, incluindo citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-17, que influenciam diretamente na proliferação de queratinócitos. Nesse contexto, sabe-se que as cininas têm a capacidade de sustentar o estado inflamatório através da estimulação da síntese e liberação de IL-1 e TNF- α (Cunha *et al.*, 2007; Tiffany e Burch, 1989). Assim, durante a inflamação, o aumento da expressão dos receptores de cininas na epiderme pode estar relacionado à hiperproliferação de queratinócitos, bem como à liberação de

outros mediadores que contribuem para esse fenômeno. Deste modo, as cininas estariam relacionadas com a uma série de condições clínicas associadas à proliferação celular, incluindo a psoríase, que caracteriza-se pela proliferação excessiva de queratinócitos, resultando em hiperplasia epidérmica e formação de placas descamativas (Sharma e Al-Sherif, 2006). Neste contexto, como observado no presente trabalho, a modulação farmacológica de receptores das cininas, poderia ser uma alternativa no controle da proliferação em doenças hiperproliferativas, como a psoríase.

Adicionalmente, nossos resultados mostraram envolvimento dos receptores B₁ e B₂ das cininas na diferenciação anormal de queratinócitos durante a psoríase. Até o momento, a maioria dos estudos destaca o envolvimento dos receptores das cininas na diferenciação de queratinócitos em condições fisiológicas. Desse modo, Seliga *et al.* (2018) detectaram que a estimulação do B₂R resulta na expressão de c-Fos, translocação nuclear de NF- κ B (Fator nuclear kappa B) e moderada expressão de (pro) filagrina e citoqueratinas, uma via de sinalização envolvida na diferenciação de queratinócitos (Seliga *et al.*, 2018). Do mesmo modo, Matus *et al.* (2008) observou que a estimulação do receptor B₁ das cininas promovia aumento dos níveis de alguns marcadores de diferenciação celular, incluindo citoqueratina 10 (K10), filagrina e involucrina, através de mecanismos que envolvem a ativação do receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR - do inglês, *Epidermal growth factor receptor*) (Matus *et al.*, 2008). No entanto, os dados aqui apresentados demonstram que o bloqueio ou a ausência de receptores das cininas podem melhorar o processo de diferenciação de queratinócitos psoriáticos. Com relação a estes achado, é possível inferir que durante processos inflamatórios, a ativação dos receptores B₁ e B₂ das cininas promoveriam a regulação positiva de marcadores de proliferação epitelial, e conseqüentemente, a regulação negativa de marcadores de diferenciação na pele psoriática, processo este descrito previamente por Jia *et al.* (2018).

Na psoríase, as células T estão envolvidas em diversos processos que levam ao desencadeamento da doença, assim como, são essenciais na manutenção deste distúrbio cutâneo (Kim e Krueger, 2015). Com igualdade, as lesões psoriáticas induzidas por IMQ são caracterizadas por intenso infiltrado

linfocitário (Cai, Fleming e Yan, 2012; Fits *et al.*, 2009; Ueyama *et al.*, 2014). Assim, o próximo objetivo do presente estudo foi investigar o possível envolvimento dos receptores de cininas no perfil de células imunes presentes nas lesões psoriásicas.

Consistente com dados prévios, a administração de IMQ promoveu intenso infiltrado de células inflamatórias na pele de animais WT. Em contraste, camundongos nocautes submetidos ao modelo de psoríase induzida por IMQ mostraram acentuada redução de populações Ly6G⁺, CD11b⁺, CD3⁺. Estes dados reforçam a participação do sistema das cininas na migração de neutrófilos, macrófagos e linfócitos para a lesão psoriática. Analisamos ainda a influência do sistema de cininas nos subconjuntos de células T presentes nas lesões psoriáticas induzidas por IMQ. A partir dos dados obtidos, é possível sugerir que ambos os receptores cininérgicos participam da modulação do infiltrado de células T CD4⁺, enquanto a migração dos linfócitos T CD8⁺ para o tecido inflamado parece ser influenciada pelo receptor B₂ das cininas. Corroborando os dados obtidos com animais nocautes, resultados semelhantes foram obtidos com o bloqueio farmacológico dos receptores B₁ e B₂. Ademais, novamente, o uso de antagonistas seletivos confirma que esses os efeitos atribuídos ao sistema das cininas não são uma adaptação causada pela alteração genômica em animais nocaute.

Consolidando nossos achados, dados da literatura indicam que os receptores das cininas são expressos em linfócitos T, assim com, poderiam estar associados à ativação, migração ou proliferação desses tipos celulares durante processos inflamatórios (Dutra, 2017b; Dutra *et al.*, 2011; Paegelow *et al.*, 2002; Prat *et al.*, 1999; Sharma e Al-Sherif, 2006). De 1984, consta algumas das primeiras observações de que BK exerce potente influência no tráfego de linfócitos (Moore, 1984). Os primeiros dados referentes à capacidade dos receptores B₁ e B₂ das cininas em modular a migração de linfócitos foram obtidos em ensaios *in vitro* (Maurer *et al.*, 2011; Schulze-topphoff *et al.*, 2009). Posteriormente, resultados *in vivo* confirmaram que a ativação de ambos os receptores cininérgicos é capaz de estimular a migração de linfócitos (Böckmann e Paegelow, I, 2000; Dutra *et al.*, 2011; Paegelow *et al.*, 2002; Shigematsu *et al.*, 2002). Ainda, foi observado aumento da expressão dos receptores das cininas

em linfócitos T CD3⁺ de pacientes portadores de esclerose múltipla, onde a ampliação do número de receptores B₁ estaria envolvido com o aumento da taxa de migração nos linfócitos e, conseqüentemente, correlacionado com a severidade clínica da doença (Prat *et al.*, 1999).

Além da resposta local da pele, registros mostram que a aplicação tópica de IMQ promove efeitos sistêmicos, incluindo estimulação da síntese de citocinas pró-inflamatórias e aumento do volume de linfonodos e baço (Grine *et al.*, 2016; Hawkes, Gudjonsson e Ward, 2017; Nerurkar *et al.*, 2017). Desta forma, além de ser utilizado para estudar eventos envolvidos na inflamação cutânea tipo psoriática, o modelo de psoríase induzida por IMQ tem sido utilizado para investigar efeitos sistêmicos decorrentes da inflamação psoriática (Nerurkar *et al.*, 2017). De fato, a repetida aplicação de IMQ na pele de animais WT resultou em esplenomegalia e linfadenopatia, conforme observado através da pesagem dos órgão linfóides ao final do protocolo experimental. Em contraste, a ausência e o bloqueio dos receptores B₁ e B₂ de cininas impediram o aumento dos linfonodos inguinais e axilares, o que pode estar relacionado à menor taxa de proliferação e/ou migração de células imunes. Ademais, apenas camundongos KOB₂ e tratados com FR173657 (30 mg/Kg) mostraram redução da esplenomegalia induzida por IMQ. Por outro lado, o silenciamento do B₁R não alterou o aumento do baço causado pelo IMQ, quando comparado ao grupo WT.

Sabe-se que o aumento anormal dos linfonodos e baço pode ser resultado de alterações no sistema imune (Gaddey *et al.*, 2016; McKenzie *et al.*, 2017). Nesse contexto, além de modular o tráfego, existem evidências de que a atividade mitogênica atribuída aos receptores B₁ e B₂ das cininas é capaz de influenciar a proliferação de linfócitos (Sharma e Al-Sherif, 2006). Corroborando, a avaliação da incorporação de timidina mostrou acentuada redução da taxa de proliferação celular em linfócitos do baço de animais nocautes para os receptores das cininas, sugerindo a participação dos receptores cininérgicos na modulação deste processo (Dutra *et al.*, 2011). Portanto, pode-se concluir, com esses resultados, até o momento, que o sistema das cininas tem importante participação na ativação e/ou migração de células imunes, suportando a importância destes peptídeos vaso ativos nas resposta imune da psoríase, assim

como já descrito anteriormente para doenças autoimunes (Aliberti *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2011; Dutra, 2017b; Seliga *et al.*, 2018).

Embora o mecanismo pelo qual IMQ promova lesões tipo psoriáticas não seja completamente entendido, o envolvimento do eixo IL-23/ IL-17 é inegável (Dunussi-Joannopoulos *et al.*, 2011; Fits *et al.*, 2009; Sauder, 2002). Considera-se que a via IL-23/Th17 tenha um papel importante na psoríase, pois foi evidenciado que o polimorfismos de genes responsáveis pela expressão de IL-23 e seu receptor estejam relacionados com risco aumentado de desenvolver algum tipo de psoríase (Eberle *et al.*, 2016; Yoshiki *et al.*, 2014a). Além disso, foi previamente demonstrado que a inibição da síntese e liberação de IL-23 e/ou IL-17 protege a pele da inflamação induzida por IMQ (Dunussi-Joannopoulos *et al.*, 2011). Nesse caso, a descoberta de que a IL-17 contribui diretamente no desenvolvimento da psoríase possibilitou o desenvolvimento de novas possibilidades de tratamento (Eberle *et al.*, 2016; Iwakura e Ishigame, 2006). Atualmente, um anticorpo monoclonal anti IL-17A (Cosentyx) é aprovado para o tratamento da psoríase (Wasilewska *et al.*, 2016).

A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória produzida por vários tipos celulares, incluindo neutrófilos, células *natural killer*, mastócitos, queratinócitos e linfócitos $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ (Gele, Van *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2015; Moos *et al.*, 2019). A família de IL-17 tem sido cada vez mais reconhecida como um importante contribuinte para as fases iniciais da autoimunidade, uma vez que, estas citocinas têm a capacidade de induzir a liberação de uma ampla gama de citocinas por uma variedade de tipos celulares, incluindo células epiteliais, endoteliais e fibroblastos (Gele, Van *et al.*, 2016; Iwakura e Ishigame, 2006). Assim, nossos resultados sugerem que o sistema de citocinas pode estar contribuindo para o aumento de presença de IL-17 de maneira direta e/ou indireta, ao modular a atividade e/ou o infiltrado de células imunes nas lesões psoriáticas. Além disso, Van *et al.* (2016) trazem que os receptores de IL-17 são constitutivamente expressos nos queratinócitos, e a interação desta citocina com seus respectivos receptores parece estar associada com o aumento de fatores anti-apoptóticos, aumentando a sobrevivência de queratinócitos psoriáticos (Gele, Van *et al.*, 2016). Nesse contexto, a redução de IL-17 pode ser um dos

mecanismos pelos quais a ausência ou bloqueio dos receptores das cininas promovem a melhora das características psoriáticas induzidas por IMQ.

Dando suporte a nossos achados, autores já relataram que a deleção completa de IL-17 reduz a severidade da psoríase induzida por IMQ (Malki, El *et al.*, 2013). Ainda, na dermatologia, o uso de anticorpos que tem como alvo membros da família da IL-17 (ex: *Cosentyx* e *Brodalumab*) mostraram-se eficazes na redução da severidade da psoríase, conforme evidenciado através da análise do índice PASI em ensaios de fase III (Gele, Van *et al.*, 2016).

A relação entre o sistema das cininas e IL-17 já foi observada em outros modelos experimentais como encefalomielite autoimune e infecção sistêmica por *Candida albicans* (Dutra *et al.*, 2011; Ramani *et al.*, 2016). Do mesmo modo como observamos para a psoríase, consta na literatura que as cininas seriam capazes de modular a resposta das células T, uma vez que os antagonistas dos receptores cininérgicos mostraram-se capazes de reduzir a síntese e liberação de citocinas, como, por exemplo IL-17, *in vitro* (Dutra *et al.*, 2011) e em modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE) (Costa *et al.*, 2011; Dutra *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2008).

Uma outra possibilidade para a redução de IL-17 e, conseqüente, melhora das lesões cutâneas psoriformes induzidas por IMQ, é a redução da ativação e/ou migração de DCs em decorrência do nocaute ou bloqueio farmacológico dos receptores das cininas. Isso porque, sabe-se que após administração tópica de IMQ há intensa migração de células de *Langerhans* da pele para os linfonodos (Sauder, 2002). As células de *Langerhans* são DCs derivadas da medula óssea, e representam as principais células apresentadoras de antígenos da pele (Collin e Milne, 2016). Estes tipos celulares são capazes de processar e apresentar antígenos aos linfócitos T, iniciando assim uma resposta imune (Collin e Milne, 2016; Yoshiki *et al.*, 2014). Neste contexto, Aliberti *et al.* (2014) mostraram que a formação das cininas podem servir como sinal de perigo que desencadeia a ativação de DCs, reforçando a participação desses peptídeos vaso ativos na modulação da resposta imune (Aliberti *et al.*, 2003). Semelhantemente, Bertram *et al.* (2007) mostraram que BK promove aumento de Ca^{2+} intracelular e induz a migração de DCs (Bertram *et al.*, 2007).

Além de modular a migração de DCs, o sistema das cininas pode estar envolvido na estimulação da síntese de citocinas, uma vez que, foi observado a ativação do receptor B₂ induz a síntese de IL-12 *in vitro* (Schulze-Topphoff *et al.*, 2008). Além do mais, foi observado que animais nocautes para o receptor B₂ apresentam redução da síntese de IL-12 por DCs desafiadas e, conseqüente, comprometimento da estimulação de células T antígeno-específicas em linfócitos Th1 (Schulze-Topphoff *et al.*, 2008). Coletivamente, estes resultados reforçam o envolvimento do sistema das cininas na modulação da resposta imune desencadeada durante o processo inflamatório tipo psoriático induzido por IMQ.

Objetivando confirmar e obter resultados ainda mais satisfatórios referentes ao envolvimento das cininas na patogênese da psoríase, houve o interesse de avaliar o efeito da inibição da degradação das cininas na patogênese da psoríase. Para isso, animais WT foram tratados com Captopril ao longo do protocolo experimental do modelo murino de psoríase induzida por IMQ. O Captopril é um dos mais potentes inibidores da ECA, sendo amplamente utilizado no tratamento da hipertensão e da insuficiência cardíaca (Wysocki *et al.*, 2006). Todavia, reações cutâneas adversas são frequentemente notadas enquanto os pacientes estão sendo tratados com Captopril, incluindo indução ou exacerbação do processo psoriático, independentemente de os pacientes terem histórico de psoríase (Hammond, Kirkendall e Wilkin, 1980; Konigsberg e Albahrani, 2013).

A ECA é uma carboxipeptidase que possui um papel crucial na manutenção da pressão arterial, uma vez que, é responsável pela catalisação e conversão de angiotensina I à angiotensina II (Konigsberg e Albahrani, 2013). Além disso, a ECA também afeta o sistema das cininas, sendo responsável por realizar a degradação desses peptídeos vasoativos (Huskić e Alendar, 2007). ACE já foi identificada em diversas células que compõem a pele humana, incluindo fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos (Ozkur *et al.*, 2004). Aliás, há maiores quantidades de ECA no soro de pacientes portadores das diferentes formas de psoríase, sugerindo a participação desta enzima nesta doença (Huskić e Alendar, 2007; Su, 2006). Também foi observado aumento da atividade da ECA na pele psoriática, com redução da atividade desta enzima

após tratamento da doença (Huskić e Alendar, 2007). Uma vez que estas alterações na atividade da ECA foram observadas apenas na pele psoriática, é possível que a ECA possa estar envolvida direta ou indiretamente com o desenvolvimento de lesões psoriáticas.

Contudo, o mecanismo responsável pelo aumento da atividade da ECA em pacientes com psoríase não é claro. Uma vez que o sistema renina-angiotensina não possui um papel fisiológico conhecido na pele, acredita-se que o aumento da atividade proteolítica da ECA estaria associado à clivagem de mediadores inflamatórios (Huskić e Alendar, 2007). Ou seja, apesar de diversas evidências, pouco se sabe sobre a associação entre iECA e doenças inflamatórias da pele (Fry e Baker, 2007; Wu *et al.*, 2014). Desta forma, acredita-se que a inibição da degradação da bradicinina, por inibidores da ECA, promovem alterações no sistema calicreína-cinina, resultando em aumento na concentração das cininas e mediadores inflamatórios relacionados na pele, o que pode contribuir para a exacerbação do processo inflamatório cutâneo (Ozkur *et al.*, 2004).

Por conseguinte, os resultados obtidos no presente estudo mostraram que a inibição da cininase II, por Captopril, promoveu a exacerbação do processo psoriático induzido por IMQ. Sendo observado que a administração de Captopril intensificou a hiperproliferação e reduziu a diferenciação dos queratinócitos na pele psoriática. Em adição, foi observado intenso infiltrado de neutrófilos e macrófagos nas lesões psoriáticas induzidas por IMQ. Além disso, houve aumento do acúmulo de IL-17 e hiperplasia do linfonodo axilar. Da mesma forma, Scholzen *et al.* (2003) mostraram que a inibição da ECA intensificou a inflamação cutânea induzida por capsaicina e BK (Scholzen *et al.*, 2003). O Captopril e o Enalapril foram capazes de potencializar as respostas cutâneas da bradicinina intradérmica (Andersson e Persson, 1994; Wu *et al.*, 2014). Portanto, ao inibir o catabolismo e elevar o níveis de cininas, inibidores da ECA estariam promovendo piora do quadro psoriático. Conforme constatado a partir dos resultados obtidos neste trabalho, a regulação positiva de componentes do sistema das cininas mostrou-se um dos mecanismo para a piora da psoríase. Consolidando esta afirmação, o polimorfismo do gene para a enzima conversora de angiotensina (ACE) já foi relacionado à suscetibilidade para psoríase (Liu, Han e Lu, 2013).

Isso porque, o polimorfismo existente no gene da ECA afeta a atividade desta enzima, onde indivíduos homocigotos para o alelo ECA I apresentam menor atividade enzimática em comparação a portadores do genótipo ECA DD. Recentemente, a homocigose para o alelo I da ECA foi observado como prevalente em portadores de psoríase, sendo esta susceptibilidade associada a alterações no sistema das cininas (Weger *et al.*, 2007). Com isso, estes resultados reforçam o envolvimento do sistema das cininas na patogênese da psoríase.

Ademais, as erupções cutâneas características da psoríase estão associadas a um comprometimento substancial da qualidade de vida, ou seja, os pacientes vivenciam mudanças em suas vidas, principalmente, relacionadas a impactos negativos nas relações sociais e do bem-estar psicológico (Azevedo-Pinto *et al.*, 2016; Gulliver *et al.*, 2015; Schmitt e Ford, 2007).

Para entender esse impacto negativo, é importante considerar que as lesões psoriáticas, dependendo da visibilidade, aparência e localização, podem ser estigmatizantes para os pacientes, causando constrangimento, baixa autoestima e insatisfação com a imagem corporal (Pujol *et al.*, 2013; Sibin e Ossama, 2018). Vários estudos mostram que os sintomas de ansiedade e depressão são comuns em pacientes com psoríase, havendo estudos que correlacionam a gravidade das lesões psoriáticas com a gravidade do transtorno psiquiátrico (Pujol *et al.*, 2013; Sibin e Ossama, 2018). Corroborando, Tohid, Aleem e Jackson, (2016) trazem que a redução de sinais da depressão está associada à redução da gravidade da psoríase, e vice-versa (Kelly e Ryan, 2018; Koo *et al.*, 2017). Nesse contexto, observou-se que muitos marcadores inflamatórios e citocinas liberadas durante a psoríase também estão presentes na depressão (Gulliver *et al.*, 2015; Koo *et al.*, 2017; Tohid, Aleem e Jackson, 2016). Um exemplo, é o TNF- α , uma citocina pró-inflamatória que tem sido implicada como via comum na patogênese da psoríase e depressão (Gulliver *et al.*, 2015). Nesse contexto, a revisão bibliográfica realizada por Koo *et al.* (2017) sugere que a psoríase e depressão podem ter sobreposição de vias biológicas, onde a inflamação parece estar envolvida na progressão de ambas as doenças (Koo *et al.*, 2017).

Além disso, dados sugerem que as comorbidades psiquiátricas podem afetar negativamente a resposta a certos tratamentos da psoríase (por exemplo, a fototerapia) (Koo *et al.*, 2017; Schmitt e Ford, 2007), enquanto outros estudos sugerem que o controle da psoríase está diretamente associado a melhorias nos sintomas psicológicos (Azevedo-pinto *et al.*, 2016; Koo *et al.*, 2017; Schmitt e Ford, 2007; Tohid, Aleem e Jackson, 2016).

Apesar do grande impacto negativo causado pela psoríase na qualidade de vida dos pacientes, o bem-estar ainda é um parâmetro pouco explorado durante a triagem de novas terapias alternativas para o tratamento da psoríase em ensaios não clínicos. No presente estudo, o ensaio de *Nest Building* foi utilizado com o intuito de avaliar o bem-estar de animais, WT e nocautes, assim como, tratados com SSR240612C, FR173657 ou Captopril, e submetidos ao modelo de psoríase induzida por IMQ.

A construção de ninho é um comportamento comum em roedores, que permanece conservado em linhagens amplamente utilizadas de camundongos de laboratório. Em adição, diferentes estudos mostram que as atividades de escavação e construção de ninhos são diretamente afetadas por fatores como dor e febre, assim como, durante infecções e inflamação crônica (Gjendal *et al.*, 2019; Jirkof, 2012; Otabi *et al.*, 2016). A capacidade de organizar, planejar e executar comportamentos básicos e complexos, observadas no desempenho da nidificação, compara-se à capacidade funcional para atividades de vida diária (AVD) (Deacon, 2006; Jirkof, 2014; Otabi *et al.*, 2016). Em humanos, este termo inclui atividades diárias básicas, como, por exemplo, comer sem assistência e as Atividades Instrumentais de Vida Diária (AIVD), como a manutenção das tarefas domésticas e da casa (Jirkof, 2012, 2014). Nesse contexto, a avaliação da construção de ninho mostra-se uma ferramenta favorável para monitorar disfunções, deficiências e, em particular, possíveis impactos na qualidade de vida e bem-estar animal (Gaskill e Pritchett-Corning, 2016; Gjendal *et al.*, 2019; Jirkof, 2012).

Assim, nossos dados mostram que camundongos WT tratados por 6 dias com IMQ apresentaram, juntamente com o desenvolvimento de lesões psoriáticas, sintomas tipo depressivos e, conseqüente, impacto negativo no bem-estar e qualidade de vida, conforme observado por redução significativa no

desempenho de nidificação. McColl *et al.* (2016) mostraram resultados semelhantes, onde os efeitos negativos no bem-estar animal, induzido pela administração tópica de IMQ, foram atribuídos à regulação positiva de diversos genes no SNC, incluindo citocinas inflamatórias e seus receptores (McColl *et al.*, 2016). Outro estudo mostrou que a administração sistêmica de citocinas pró-inflamatórias é capaz de induzir comportamentos tipo depressivos em animais, promovendo latência para o início da construção do ninho (Tohid, Aleem e Jackson, 2016). Havendo descrições semelhantes em portadores de doenças inflamatórias crônicas (por exemplo, Esclerose múltipla e artrite reumatoide), onde o aumento de citocinas pró-inflamatórias no plasma de pacientes foi correlacionado com a propensão ao desenvolvimento de sintomas depressivos (Aubert, 1999; Azevedo-pinto *et al.*, 2016; Gooderham *et al.*, 2017). Estudos mostram ainda que alguns medicamentos biológicos empregados no tratamento da psoríase também melhoram sintomas da depressão, principalmente, através da modulação da resposta imune (Azevedo-pinto *et al.*, 2016; Schmitt e Ford, 2007).

Ainda, nossos dados mostraram que foi a melhora das características psoriáticas, induzidas por IMQ, foram acompanhadas por maiores índices de bem-estar em camundongos nocautes para o receptor das cininas. Confirmando estes achados, animais pré-tratados com SSR240612C e FR173657 apresentaram redução da severidade das lesões psoriáticas e melhora na qualidade de vida, quando comparado aos índices do grupo Veículo. Em contrapartida, Captopril promoveu exacerbação do processo inflamatório e piora do bem-estar animal. Este fato é mais um indicativo da influência das cininas na inflamação crônica tipo psoriática induzida por IMQ, sendo de extrema importância por reforçar a possibilidade de adição dos receptores cininérgicos como alvo no tratamento da psoríase.

Em conjunto, nossos achados indicam que o sistema de cininas desempenha um papel importante na modulação da resposta imune, bem como na desregulação da proliferação e diferenciação de queratinócitos induzida por IMQ. Desta forma, os resultados sugerem que os receptores B₁ e B₂ das cininas podem constituir alvos terapêuticos potencialmente relevantes para o tratamento da psoríase. Nesse contexto, demonstramos que os antagonistas não

peptídicos dos receptores das cininas, SSR240612C e FR173657, correspondem a interessantes alternativas terapêuticas a serem incluídas no tratamento da psoríase, embora sejam necessários mais estudos em humanos.

7. CONCLUSÃO

❖ Os dados obtidos no presente trabalho reforçam a ocorrência constitutiva dos receptores B₁ e B₂ das cininas na pele, assim como, o aumento destes receptores durante processos inflamatórios cutâneos;

❖ A inativação gênica e o bloqueio farmacológico dos receptores B₁ e B₂ das cininas promoveram reduções significativas na severidade de lesões psoriáticas, indicando participação do sistema das cininas em processos envolvidos no desenvolvimento e sustentação da Psoríase;

❖ Análises enzimáticas e histológicas demonstram participação de ambos os receptores cininérgicos (B₁ e B₂) na modulação do infiltrado de polimorfonucleares e mononucleares para a lesão psoriática;

❖ Imunomarcações apontam participação dos receptores B₁ e B₂ das cininas em processos de proliferação e diferenciação de queratinócitos psoriáticos;

❖ Resultados sugerem que ambos os receptores das cininas participam da modulação da migração de linfócitos para a lesão psoriática, uma vez que, a ausência e o bloqueio dos receptores B₁ e B₂ promoveram reduções significativas no número de células CD3⁺;

❖ Dados indicam participação dos receptores B₁ e B₂ das cininas na modulação do influxo de células T CD4⁺ para a pele psoriática;

❖ O silenciamento genético e o bloqueio farmacológico sugerem a participação do receptor B₂ na modulação do tráfego de linfócitos T CD8⁺ para a pele psoriática;

❖ Resultados apontam envolvimento do sistema das cininas no acúmulo de IL-17 nas lesões psoriáticas;

❖ A avaliação do peso de órgãos linfóides, indica a participação de ambos os receptores das cininas na hiperplasia do Baço e Linfonodos (Inguinal e Axillar), induzida por IMQ;

❖ Análises apontaram que além de reduzir a severidade do quadro psoriático, a inativação e o bloqueio farmacológico dos receptores B₁ e B₂ das cininas está envolvido na redução de comportamentos tipo depressivos e melhora do bem-estar e qualidade de vida de animais submetidos ao modelo de psoríase induzida por IMQ;

❖ O pré-tratamento de camundongos com Captopril promoveu exacerbação do processo inflamatório crônico tipo psoriático induzido por IMQ, reforçando a participação do sistema das cininas na psoríase.

❖ A partir dos resultados obtidos, o uso de antagonistas seletivos para um ou ambos os receptores de cininas pode ser sugerido como uma nova estratégia adjuvante no tratamento da psoríase.

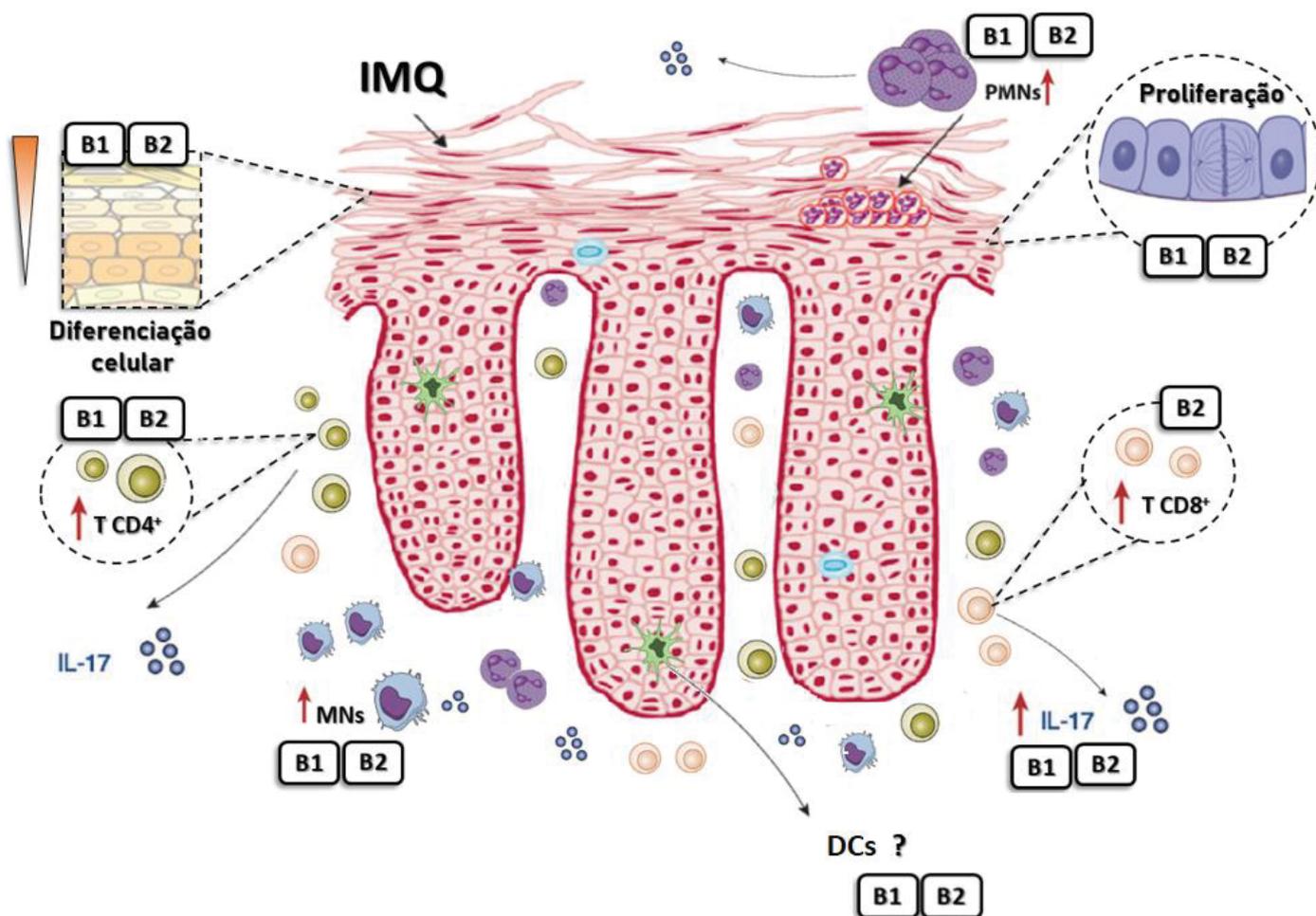


Figura 58. Desenho esquemático descrevendo o envolvimento dos receptores das cininas em diferentes processos que compõem a psoríase induzida por IMQ. Com base nos resultados obtidos no presente estudo, ambos os receptores das cininas (B₁ e B₂) participam direta e/ou indiretamente de eventos envolvidos na patogênese da psoríase, incluindo influxo de células inflamatórias para o tecido inflamado (neutrófilos, macrófagos e linfócitos), hiperproliferação e diferenciação anormal de queratinócitos e acúmulo de IL-17 nas lesões psoriáticas. Os receptores B₂ estão também relacionados com o tráfego de células CD8⁺. Portanto, a ausência ou bloqueio farmacológico dos receptores cininérgicos, é capaz de reduzir a severidade da inflamação crônica tipo psoriática induzida por IMQ.

REFERÊNCIAS

- ALBANESI, C. Immunology of psoriasis. **Clinical Immunology: Principles and Practice: Fourth Edition**, p. 775–781, 2012.
- ALIBERTI, J. *et al.* Cutting Edge: Bradykinin Induces IL-12 Production by Dendritic Cells: A Danger Signal That Drives Th1 Polarization. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 11, p. 5349–5353, 2003.
- ANDERSSON, R. G.; PERSSON, K. ACE inhibitors and their influence on inflammation, bronchial reactivity and cough. **Eur Heart J**, v. 15 Suppl C, p. 52–56, 1994.
- ARCOLEO, F. *et al.* The complex alteration in the network of IL-17-type cytokines in patients with hereditary angioedema. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 18, n. 3, p. 355–361, 2018.
- AUBERT, A. Sickness and behaviour in animals: a motivational perspective. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 4, n. 99, p. 1029–1036, 1999.
- AZEVEDO-PINTO, S. *et al.* The inflammatory perspective of depression in the context of chronic medical conditions. **International Journal of Clinical Neurosciences and Mental Health**, n. 3, 2016.
- BERTRAM, C. *et al.* Comparison of kinin B1 and B2 receptor expression in neutrophils of asthmatic and non-asthmatic subjects. **International Immunopharmacology**, v. 7, n. 14, p. 1862–1868, 2007a.
- BERTRAM, C. M. *et al.* Expression of kinin B1 and B2 receptors in immature, monocyte-derived dendritic cells and bradykinin-mediated increase in intracellular Ca²⁺ and cell migration. **Journal of leukocyte biology**, v. 81, n. 6, p. 1445–54, 2007b.
- BLAUKAT, A. Structure and signalling pathways of kinin receptors. **Andrologia**, v. 35, n. 1, p. 17–23, 2003.
- BÖCKMANN, S.; PAEGELOW, I. Kinins and kinin receptors: importance for the activation of leukocytes. **Journal of leukocyte biology**, v. 68, n. 5, p. 587–592, 2000.
- BORKOWSKI, J. A. *et al.* Targeted disruption of a B2bradykinin receptor gene in mice eliminates bradykinin action in smooth muscle and neurons. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 23, p. 13706–13710, 1995.

- BOURDET, B. *et al.* Distribution and expression of B2-kinin receptor on human leukocyte subsets in young adults and elderly using flow cytometry. **Neuropeptides**, v. 44, n. 2, p. 155–161, 2010.
- BOWCOCK, A. M.; KRUEGER, J. G. Getting under the skin: The immunogenetics of psoriasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 9, p. 699–711, 2005.
- CAI, Y.; FLEMING, C.; YAN, J. **New insights of T cells in the pathogenesis of psoriasis** **Cellular and Molecular Immunology** Nature Publishing Group, , 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/cmi.2012.15>>
- CALIXTO, J. B. *et al.* **Kinins in pain and inflammation** **Pain**, 2000.
- _____. Kinin B 1 receptors: Key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. **British Journal of Pharmacology**, v. 143, n. 7, p. 803–818, 2004.
- CAMPBELL, D. J. Towards understanding the kallikrein-kinin system: Insights from measurement of kinin peptides. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 6, p. 665–677, 2000.
- CAMPBELL, D. J. The kallikrein-kinin system in humans. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 28, n. 12, p. 1060–1065, 2001.
- CAMPBELL, D. J. Bradykinin Peptides. *In*: **Handbook of Biologically Active Peptides**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. p. 1386–1393.
- CAYLA, C. ÉCILE *et al.* Structure of the mammalian kinin receptor gene locus. **International Immunopharmacology**, v. 2, n. 13–14, p. 1721–1727, 2002.
- CHEMISTRY, B. *et al.* Differential effect of intranasally administrated kinin B 1 and B 2 receptor antagonists in Alzheimer ' s disease mice. **Biological Chemistry**, v. 2015, 2011.
- CHENG, C. Y. *et al.* Bradykinin-stimulated p42/p44 MAPK activation associated with cell proliferation in corneal keratocytes. **Cellular Signalling**, v. 16, n. 5, p. 535–549, 2004.
- CHRISTIANNE, B.-M. *et al.* Suppressive effect of distinct bradykinin B2 receptor antagonist on allergen-evoked exudation and leukocyte infiltration in sensitized rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 127, p. 315–320, 1999.
- CLARK, R. A.; KUPPER, T. S. Misbehaving macrophages in the pathogenesis of psoriasis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 8, p. 2084–2087, 2006.

- COLLIN, M.; MILNE, P. Langerhans cell origin and regulation. **Current Opinion in Hematology**, v. 23, n. 1, p. 28–35, 2016.
- CONRAD, C.; GILLIET, M. Psoriasis: from Pathogenesis to Targeted Therapies. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 54, n. 1, p. 102–113, 2018.
- COSTA-NETO, CLAUDIO M. *et al.* Participation of kallikrein-kinin system in different pathologies. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 2, p. 135–142, 2008.
- COSTA, P. L. N. DA *et al.* The role of kinin receptors in cancer and therapeutic opportunities. **Cancer Letters**, v. 345, n. 1, p. 27–38, 2014.
- COSTA, R. *et al.* Anti-nociceptive effect of kinin B 1 and B 2 receptor antagonists on peripheral neuropathy induced by paclitaxel in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 2 B, p. 681–693, 2011.
- COUTURE, R. *et al.* Kinin receptors in pain and inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 429, n. 1–3, p. 161–176, 2001.
- CUNHA, T. M. *et al.* TNF- α and IL-1 β mediate inflammatory hypernociception in mice triggered by B 1 but not B 2 kinin receptor. **European journal of pharmacology**, v. 573, p. 221–229, 2007.
- DEACON, R. M. J. Assessing nest building in mice. **Nature protocols**, v. 1, n. 3, p. 1117–1119, 2006.
- DUCHENE, J. *et al.* A Novel Inflammatory Pathway Involved in Leukocyte Recruitment: Role for the Kinin B1 Receptor and the Chemokine CXCL5. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 7, p. 4849–4856, 2007.
- DUCHENE, J.; AHLUWALIA, A. The kinin B1receptor and inflammation: new therapeutic target for cardiovascular disease **Current Opinion in Pharmacology**, 2009a.
- _____. The kinin B1 receptor and inflammation: new therapeutic target for cardiovascular disease. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, n. 2, p. 125–131, 2009b.
- DUNUSSI-JOANNOPOULOS, K. *et al.* IL-22 Is Required for Imiquimod-Induced Psoriasiform Skin Inflammation in Mice. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 1, p. 462–469, 2011.
- DUTRA, R. C. *et al.* The role of kinin receptors in preventing neuroinflammation and its clinical severity during experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, 2011.

- DUTRA, R. C. Kinin receptors: Key regulators of autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, v. 16, n. 2, p. 192–207, 2017.
- EBERLE, F. C. *et al.* Recent advances in understanding psoriasis. **F1000Research**, v. 5, n. 0, p. 770, 2016.
- ESTRELA, G. R. *et al.* Kinin B1 receptor deficiency attenuates cisplatin-induced acute kidney injury by modulating immune cell migration. **Journal of Molecular Medicine**, v. 92, n. 4, p. 399–409, 2014.
- FITCH, E. *et al.* Pathophysiology of Psoriasis: Recent Advances on IL-23 and Th17 Cytokines. **Current Rheumatology Reports**, v. 9, n. 6, p. 461–467, 2010.
- FITS, L. VAN DER *et al.* Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice Is Mediated via the IL-23/IL-17 Axis. **The Journal of Immunology**, v. 182, p. 5836–5845, 2009.
- FOSTER, C. S. Long-term side effects of glucocorticoids. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 0338, n. January, 2016.
- FRY, L.; BAKER, B. S. Triggering psoriasis: the role of infections and medications. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 6, p. 606–615, 2007.
- GADDEY, H. L. *et al.* Evaluation of Unexplained Lymphadenopathy. **American Family Physician**, v. 94, p. 896–903, 2016.
- GANAPATHY, S. *et al.* Autoimmune Disorders—Immunopathogenesis and Potential Therapies. **Journal of Young Pharmacists**, v. 9, n. 3, p. S1–S4, 2017.
- GARBACKI, N. *et al.* The Kallikrein-Kinin System: Current and Future Pharmacological Targets. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 99, n. 1, p. 6–38, 2005.
- GASKILL, B. N.; PRITCHETT-CORNING, K. R. Nest building as an indicator of illness in laboratory mice. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 180, p. 140–146, 2016.
- GELE, M. VAN *et al.* The many faces of interleukin-17 in inflammatory skin diseases. **British Journal of Dermatology**, v. 175, n. 5, p. 892–901, 2016.
- GJENDAL, K. *et al.* Burrowing and nest building activity in mice after exposure to grid floor, isoflurane or ip injections. **Physiology & Behavior**, 2019.
- GOLIAS, C. *et al.* The kinin system-bradykinin: biological effects and clinical implications. **Multiple role of the kinin systembradykinin Hippokratia**, v. 11, n. 3, p. 124–128, 2007.
- GOLIAS, CH; CHARALABOPOULOS, A.; STAGIKAS, D.; *et al.* The kinin system-

bradykinin: Biological effects and clinical implications. Multiple role of the kinin system-bradykinin. **Hippokratia**, v. 11, n. 3, p. 124–128, 2007.

GOODERHAM, M. *et al.* Depressive symptoms, depression, and the effect of biologic therapy among patients in Psoriasis Longitudinal Assessment and Registry (PSOLAR). **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 78, n. 1, p. 70–80, 2017.

GOUGAT, J. *et al.* SSR240612 [(2R)-2-(((3R)-3-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-3-(((6-methoxy-2-naphthyl)sulfonyl)amino)propanoyl)amino)-3-(4-([2R,6S)-2,6-dimethylpiperidinyl]methyl)phenyl)-N-isopropyl-Nmethylpropanamide Hydrochloride], a New Nonpeptide Antagonist of the Bradykinin. **The journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 309, n. 2, p. 661–669, 2004.

GRINE, L. *et al.* Topical imiquimod yields systemic effects due to unintended oral uptake. **Scientific Reports**, v. 6, n. December 2015, p. 1–6, 2016.

GROZDEV, I. S. *et al.* Psoriasis in the elderly: From the Medical Board of the National Psoriasis Foundation. **Journal of American Dermatology**, v. 65, n. 3, p. 537–545, 2011.

GUEVARA-LORA, I. *et al.* Bradykinin and des-Arg10-kallidin enhance the adhesion of polymorphonuclear leukocytes to extracellular matrix proteins and endothelial cells. **Cell communication & adhesion**, v. 18, n. 4, p. 67–71, 2011.

_____. Influence of Kinin Peptides on Monocyte-Endothelial Cell Adhesion. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 115, n. 11, p. 1985–1995, 2014a.

GUEVARA-LORA, I.; FLORKOWSKA, M.; KOZIK, A. Bradykinin-related peptides up-regulate the expression of kinin B1 and B2 receptor genes in human promonocytic cell line U937. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, n. 3, p. 515–522, 2009a.

_____. Bradykinin-related peptides up-regulate the expression of kinin B1 and B2 receptor genes in human promonocytic cell line U937. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, n. 3, p. 515–522, 2009b.

GULLIVER, W. *et al.* Depression Over Psoriasis: Assessment of associated Relief by addition of ADalimumab for the treatment of Psoriasis: Observational study (DORADO - Ps). **Journal of Dermatology & Dermatologic Surgery**, v. 19, n. 1, p. 15–20, 2015.

- HAMMOND, J. J.; KIRKENDALL, W. M.; WILKIN, J. K. Captopril-Induced Eruption. **Archives of Dermatology**, v. 116, p. 10–13, 1980.
- HAWKES, J. E.; GUDJONSSON, J. E.; WARD, N. L. The Snowballing Literature on Imiquimod-Induced Skin Inflammation in Mice: A Critical Appraisal. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 137, n. 3, p. 546–549, 2017.
- HONG, J.; BERNSTEIN, D. A Review of Drugs that Induce or Exacerbate Psoriasis. **Psoriasis Forum**, v. 18a, n. 1, p. 2–11, 2018.
- HOWL, J.; PAYNE, S. J. Bradykinin receptors as a therapeutic target. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 7, n. 2, p. 277–285, 2003.
- HUSKIĆ, J.; ALENDAR, F. Tissue Angiotensin-Converting Enzyme in Patients with various clinical forms of psoriasis. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 7, n. 2, p. 105–108, 2007.
- IWAKURA, Y.; ISHIGAME, H. The IL-23 / IL-17 axis in inflammation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 5, p. 1218–1222, 2006.
- JIA, J. *et al.* Yes-associated protein promotes the abnormal proliferation of psoriatic keratinocytes via an amphiregulin dependent pathway. **Scientific Reports**, n. August, p. 1–11, 2018.
- JIRKOF, P. Monitoring Burrowing and Nest Building Behavior as Species-specific Indicators of Animal Wellbeing. **Proceedings of Measuring Behavior 2012**, v. 2012, p. 236–237, 2012.
- _____. Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 234, p. 139–146, 2014.
- KAHN, R. *et al.* Microvesicle transfer of kinin B1-receptors is a novel inflammatory mechanism in vasculitis. **Kidney International**, v. 91, n. 1, p. 96–105, 2017.
- KAMBARA, A. *et al.* Combined effects of low-dose oral spironolactone and captopril therapy in a rat model of spontaneous hypertension and heart failure. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 41, n. 6, p. 830–837, 2003.
- KASHUBA, E. *et al.* The kinin–kallikrein system: physiological roles, pathophysiology and its relationship to cancer biomarkers. **Biomarkers**, v. 5804, p. 1–18, 2013.
- KATAYAMA, H. Development of psoriasis by continuous neutrophil infiltration into the epidermis. **Experimental Dermatology**, v. 27, n. 10, p. 1084–1091, 2018.

- KELLY, A.; RYAN, C. Psoriasis : Beyond the Skin. **European Medical Journal**, n. March, p. 90–95, 2018.
- KILKENNY, C. *et al.* Animal research: Reporting in vivo experiments-The ARRIVE Guidelines. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 31, n. 4, p. 991–993, 2011.
- KIM, J. C. The Imiquimod Induced Psoriatic Animal “Model: Scientific Implications. **Biomedical Journal of Scientific & Technical Research**, v. 13, n. 1, p. 2018–2020, 2019.
- KIM, J. E. *et al.* Expression and Modulation of LL-37 in Normal Human Keratinocytes , HaCaT cells , and Inflammatory Skin Diseases. **Journal of Korean Medical Science**, p. 649–654, 2005.
- KIM, J.; KRUEGER, J. G. The Immunopathogenesis of Psoriasis. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 1, p. 13–23, 2015.
- KINDGEN-MILLES, D.; KLEMENT, W. Pain and inflammation evoked in human skin by bradykinin receptor antagonists. **European Journal of Pharmacology**, v. 218, p. 183–185, 1992.
- KOLOSOVSKY, E. D. Evaluation of different treatment methods in patients with psoriasis and content of kallikrein and kallikreinogen in blood plasma. **Dermatology**, v. 188, n. 2, p. 140–141, 1994.
- KOMATSU, N. *et al.* Expression and localization of tissue kallikrein mRNAs in human epidermis and appendages. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 121, n. 3, p. 542–549, 2003.
- KONIGSBERG, M.; ALBAHRANI, Y. Antihypertensive Drugs and Psoriasis. **Psoriasis Forum**, v. 19a, n. 3, p. 110–113, 2013.
- KOO, J. *et al.* Depression and suicidality in psoriasis: review of the literature including the cytokine theory of depression. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 31, n. 12, p. 1999–2009, 2017.
- LAMBERT, C.; GENIN, C. CD3 bright lymphocyte population reveal $\gamma\delta$ T cells. **Cytometry Part B - Clinical Cytometry**, v. 61, n. 1, p. 45–53, 2004.
- LEE, P. Y. *et al.* Ly6 family proteins in neutrophil biology. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 94, n. 4, p. 585–594, 2013.
- LEOR, J. *et al.* Failure of Captopril to Attenuate Myocardial Damage, Neutrophil Accumulation, and Mortality Following Coronary Artery Occlusion and Reperfusion in Rat. **Angiology**, v. 45, n. 8, p. 717–724, 1994.

- LIN, Y. K. *et al.* Using imiquimod-induced psoriasis-like skin as a model to measure the skin penetration of anti-psoriatic drugs. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–19, 2015.
- LIU, T.; HAN, Y.; LU, L. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphisms and the risk of psoriasis: A meta-analysis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 38, n. 4, p. 352–359, 2013.
- MAGERL, M. *et al.* Bradykinin in health and disease: Proceedings of the Bradykinin Symposium 2012, Berlin 23-24 August 2012. **Inflammation Research**, v. 63, n. 3, p. 173–178, 2014.
- MALKI, K. EL *et al.* An alternative pathway of imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in the absence of interleukin-17 receptor a signaling. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 2, p. 441–451, 2013.
- MARCEAU, F.; REGOLI, D. Therapeutic options in inflammatory bowel disease: Experimental evidence of a beneficial effect of kinin B 1 receptor blockade. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, n. 6, p. 1163–1165, 2008.
- MARSHMAN, G.; BURTON, J. L.; ARCHER, C. B. Comparison of the actions of kallidin and bradykinin in the skin of normal and psoriatic subjects. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 21, n. 2, p. 112–115, 1996.
- MATUS, C. E. *et al.* Activation of kinin B1 receptor triggers differentiation of cultured human keratinocytes. **British Journal of Dermatology**, v. 159, n. 4, p. 792–803, 2008.
- MATUS, C. E.; BHOOLA, K. D.; FIGUEROA, C. D. **Kallikreins and kinin receptors: Modulators of skin homeostasis.**
- MAURER, M. *et al.* New topics in bradykinin research. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 66, p. 1397–1406, 2011.
- MCCOLL, A. *et al.* TLR7-mediated skin inflammation remotely triggers chemokine expression and leukocyte accumulation in the brain. **Journal of Neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 1–16, 2016.
- MCKENZIE, C. V *et al.* Splenomegaly: Pathophysiological bases and therapeutic options. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 94, p. 40–43, 2017.

- MCLEAN, P. G.; AHLUWALIA, A.; PERRETTI, M. Association between kinin B(1) receptor expression and leukocyte trafficking across mouse mesenteric postcapillary venules. **The Journal of experimental medicine**, v. 192, n. 3, p. 367–80, 2000.
- MEGLIO, P. DI *et al.* Targeting CD8+T cells prevents psoriasis development. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 138, n. 1, p. 274- 276.e6, 2016.
- MEGLIO, P. DI; DUARTE, J. H. **CD8 T cells and IFN- γ emerge as critical players for psoriasis in a novel model of mouse psoriasiform skin inflammation****Journal of Investigative Dermatology**, 2013.
- MICHALEK, I. M.; LORING, B.; JOHN, S. M. A systematic review of worldwide epidemiology of psoriasis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 31, n. 2, p. 205–212, 2017.
- MOOS, S. *et al.* Imiquimod-Induced Psoriasis in Mice Depends on the IL-17 Signaling of Keratinocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 139, n. 5, p. 1110–1117, 2019.
- MORAN, C. S. *et al.* Modulation of Kinin B2 Receptor Signaling Controls Aortic Dilatation and Rupture in the Angiotensin II – Infused Apolipoprotein E – Deficient Mouse. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, p. 898–907, 2016.
- NERURKAR, L. *et al.* The Systemic Response to Topical Aldara Treatment is Mediated Through Direct TLR7 Stimulation as Imiquimod Enters the Circulation. **Scientific Reports**, n. November, p. 1–11, 2017.
- OTABI, H. *et al.* The acute social defeat stress and nest-building test paradigm: A potential new method to screen drugs for depressive-like symptoms. **Behavioural Processes**, 2016.
- OZKUR, M. *et al.* Association of insertion/deletion polymorphism of the angiotensin- converting enzyme gene with psoriasis. **British Journal of Dermatology**, v. 151, n. 4, p. 792–795, 2004.
- PAEGELOW, I. *et al.* Migratory responses of polymorphonuclear leukocytes to kinin peptides. **Pharmacology**, v. 66, n. 3, p. 153–61, 2002.
- PESQUERO, J. B. *et al.* Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 14, p. 8140–8145, 2000.
- PESQUERO, J. B.; BADER, M. Genetically altered animal models in the

- kallikrein-kinin system. **Biological Chemistry**, v. 387, n. 2, p. 119–126, 2006.
- PHAN, C. *et al.* Psoriasis in the elderly: epidemiological and clinical aspects, and evaluation of patients with very late onset psoriasis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 30, n. 1, p. 78–82, 2016.
- PIETROVSKI, E. F.; MENDES, D. A. G. B.; *et al.* B1 and B2 kinin receptor participation in hyperproliferative and inflammatory skin processes in mice. **Journal of Dermatological Science**, v. 64, n. 1, p. 23–30, 2011.
- POBLETE, M. T. *et al.* Tissue kallikrein and kininogen in human sweat glands and psoriatic skin. **British Journal of Dermatology**, v. 124, n. 3, p. 236–241, 1991.
- POLOSA, R. *et al.* Skin responses to bradykinin, kallidin, and [desArg9]-bradykinin in nonatopic and atopic volunteers. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 92, n. 5, p. 683–689, 1993.
- PRAT, A. *et al.* Bradykinin B1 receptor expression and function on T lymphocytes in active multiple sclerosis. **Neurology**, v. 53, n. 9, p. 2064–2064, 1999.
- PROUD, D. The Kinin System in Rhinitis and Asthma. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 16, p. 351–364, 1998.
- PUJOL, R. M. *et al.* Mental Health Self-Assessment in Patients With Moderate to Severe Psoriasis : An Observational , Multicenter Study of 1164 Patients in Spain (The VACAP Study). **Actas dermosifiliográficas**, n. xx, p. 1–7, 2013.
- QADRI, F.; BADER, M. **Kinin B1 receptors as a therapeutic target for inflammation** *Expert Opinion on Therapeutic Targets* Taylor & Francis, , 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/14728222.2018.1409724>>
- QUEIRO, R. *et al.* **Age at disease onset: A key factor for understanding psoriatic disease** *Rheumatology (United Kingdom)*, 2014.
- RAMANI, K. *et al.* The Kallikrein-Kinin System : A Novel Mediator of IL-17-Driven Anti- Candida Immunity in the Kidney. **PLOS Pathogens**, v. 12, p. 1–25, 2016.
- REGOLI, D.; BARABE, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. **Pharmacological Reviews**, v. 32, n. 1, p. 1–46, 1980.
- RENDON, A.; SCHAKEL, K. Psoriasis Pathogenesis and Treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 1–28, 2019.
- RODELL, T. C.; NAIDOO, Y.; BHOOLA, K. D. Role of Kinins in Inflammatory Responses: Prospects for Drug Therapy. **Clinical Immunotherapeutics**, v. 3, n. 5, p. 352–361, 1995.

- ROMANELLI, P. *et al.* **Scanning the Immunopathogenesis of Psoriasis**. [s.l.: s.n.]. v. 19
- ROMITI, R. *et al.* Assessment of psoriasis severity in Brazilian patients with chronic plaque psoriasis attending outpatient clinics: a multicenter, population-based cross-sectional study (APPISOT). **Journal of Dermatological Treatment**, p. 1471–1753, 2018.
- ROSENBAACH, T. *et al.* Inositol phosphate formation and release of intracellular free calcium by bradykinin in HaCaT keratinocytes. **Archives of Dermatological Research**, v. 285, n. 7, p. 393–396, 1993.
- RYDER, K. W. *et al.* Serum angiotensin converting enzyme activity in patients with psoriasis. **Clinica Chimica Acta**, v. 153, n. 2, p. 143–146, 1985.
- SANTOS, A. C. DOS *et al.* Kinin B2 receptor regulates chemokines CCL2 and CCL5 expression and modulates leukocyte recruitment and pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice. **Journal of Neuroinflammation**, v. 5, n. i, p. 1–10, 2008.
- SANTOS, D. R.; CALIXTO, J. B.; SOUZA, G. E. P. Effect of a kinin B2 receptor antagonist on LPS- and cytokine-induced neutrophil migration in rats. **British journal of pharmacology**, v. 139, n. 2, p. 271–278, 2003.
- SAUDER, D. N. Immunomodulatory and pharmacologic properties of imiquimod. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 43, n. 1, p. S6–S11, 2002.
- SCHARFSTEIN, J.; RAMOS, P. I. P.; BARRAL-NETTO, M. G Protein-Coupled Kinin Receptors and Immunity Against Pathogens. *In*: **Advances in Immunology**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. v. 136p. 29–84.
- SCHMITT, J. M.; FORD, D. E. Role of depression in quality of life for patients with psoriasis. **Dermatology**, v. 215, n. 1, p. 17–27, 2007.
- SCHOLZEN, T. E. *et al.* Modulation of cutaneous inflammation by angiotensin-converting enzyme. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 170, n. 7, p. 3866–73, 2003.
- SCHREMMER-DANNINGER, E. *et al.* **Identification and occurrence of mRNAs for components of the kallikrein-kinin system in human skin and in skin diseases**, Immunopharmacology.1999
- ____. Visualisation of tissue kallikrein, kininogen and kinin receptors in human skin following trauma and in dermal diseases. **Biological Chemistry**, v. 385, n. 11, p.

1069–1076, 2004.

SCHULZE-TOPPHOFF, U. *et al.* Roles of the kallikrein/kinin system in the adaptive immune system. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 2, p. 155–160, 2008.

SCHULZE-TOPPHOFF, U. *et al.* Activation of kinin receptor B1 limits encephalitogenic T lymphocyte recruitment to the central nervous system. **Nature Medicine**, v. 15, n. 7, p. 788–793, 2009.

SEGAWA, I. *et al.* Modulation of Plasma and Tissue Kallikreins in Psoriasis vulgaris and Psoriasis pustulosa. **Dermatology**, v. 179, n. 1, p. 116–117, 2009.

SELIGA, A. *et al.* Kallikrein-Kinin System suppresses type I interferon responses: A novel pathway of interferon regulation. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. FEB, p. 1–13, 2018.

SHAO, S. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Promote Inflammatory Responses in Psoriasis via Activating Epidermal TLR4/IL-36R Crosstalk. **Frontiers in immunology**, v. 10, n. April, p. 746, 2019.

SHARMA, J. N.; AL-SHERIF, G. J. Pharmacologic targets and prototype therapeutics in the kallikrein-kinin system: Bradykinin receptor agonists or antagonists. **TheScientificWorldJournal**, v. 6, p. 1247–1261, 2006.

SHAW, O. M.; HARPER, J. L. Bradykinin receptor 2 extends inflammatory cell recruitment in a model of acute gouty arthritis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 416, n. 3–4, p. 266–269, 2011.

SHIGEMATSU, S. *et al.* Bradykinin-induced proinflammatory signaling mechanisms. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 283, n. 6, p. H2676-86, 2002.

SIBIN, N.; OSSAMA, R. Psoriasis and Its Correlation with Depression and Body Image: Case Report. **Clinics in Oncology**, v. 3, p. 4–6, 2018.

SOLEY, B. DA S. *et al.* Kinin receptors in skin wound healing. **Journal of Dermatological Science**, v. 82, n. 2, p. 95–105, 2016.

SU, J. B. Kinins and Cardiovascular Diseases. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, p. 3423–3435, 2006.

TALWAR, H. S.; FISHER, G. J.; VOORHEES, J. J. Bradykinin induces phosphoinositide turnover, 1,2-diglyceride formation, and growth in cultured adult human keratinocytes. **J.Invest.Dermatol.**, v. 95, n. 6, p. 705–710, 1990.

TANG, S. C. W.; LEUNG, J. C. K.; LAI, K. N. The kallikrein-kinin system. **Diabetes and the Kidney**, v. 170, p. 145–155, 2011.

TC MOORE. The modulation by prostaglandins of increases in lymphocyte traffic induced by bradykinin. **Immunology**, v. 51, p. 455–460, 1984.

TIFFANY, C. W.; BURCH, M. Bradykinin stimulates tumor necrosis factor and interleukin-1 release from macrophages. **FEBS Letters**, v. 247, n. 2, p. 189–192, 1989.

TOHID, H.; ALEEM, D.; JACKSON, C. **Major Depression and Psoriasis: A Psychodermatological Phenomenon** **Skin Pharmacology and Physiology**, 2016.

TONEL, G.; CONRAD, C. Interplay between keratinocytes and immune cells- Recent insights into psoriasis pathogenesis. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 41, n. 5, p. 963–968, 2009.

UEYAMA, A. *et al.* Mechanism of pathogenesis of imiquimod-induced skin inflammation in the mouse: A role for interferon- α in dendritic cell activation by imiquimod. **Journal of Dermatology**, v. 41, n. 2, p. 135–143, 2014.

WALKER, K.; PERKINS, M.; DRAY, A. KININS AND KININ RECEPTORS IN THE NERVOUS SYSTEM. **Neurochemistry International**, v. 26, p. 1–16, 1995.

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

WANG, Y. *et al.* Monocytes/Macrophages play a pathogenic role in IL-23 mediated psoriasis-like skin inflammation. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 5310, 2019.

WASILEWSKA, A. *et al.* Interleukin-17 inhibitors. A new era in treatment of psoriasis and other skin diseases. **Advances in Dermatology and Allergology**, p. 247–252, 2016.

WEGER, W. *et al.* The angiotensin-converting enzyme insertion/deletion and the endothelin -134 3A/4A gene polymorphisms in patients with chronic plaque psoriasis. **Experimental Dermatology**, v. 16, n. 12, p. 993–998, 2007.

WILHELM, D. L. Kinins in Human Disease. **Annual Review of Medicine**, v. 22, n. 1, p. 63–84, 2003.

WISEMAN, A. C. Immunosuppressive Medications. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, p. 1–12, 2015.

WONG, J. W.; KOO, J. Y. M. The safety of systemic treatments that can be used for geriatric psoriasis patients: A review. **Dermatology Research and Practice**, v. 2012, 2012.

WU, S. *et al.* Hypertension, Anti-Hypertensive Medication Use, and Risk of Psoriasis Shaowei. **JAMA Dermatology**, v. 150, n. 9, p. 957–963, 2014.

WYSOCKI, P. J. *et al.* Captopril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, promotes growth of immunogenic tumors in mice. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 13, p. 4095–4102, 2006.

YAROVAYA, G. A.; NESHKOVA, A. E. Past and present research on the kallikrein-kinin system (on the 90th anniversary of the discovery of the system). **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 41, n. 3, p. 245–259, 2015.

YOSHIKI, R. *et al.* IL-23 from langerhans cells is required for the development of imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis by induction of IL-17A-producing $\gamma\delta$ T cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 7, p. 1912–1921, 2014a.

ZHANG, W. *et al.* Kinin B2 Receptor Mediates Induction of Cyclooxygenase-2 and Is Over-Expressed In Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. **Molecular Cancer Research**, v. 32, n. 4, p. 580–591, 2011.

ZHANG, Y. *et al.* MAPK/NF- κ B-dependent upregulation of kinin receptors mediates airway hyperreactivity: A new perspective for the treatment. **Pharmacological Research**, v. 71, p. 9–18, 2013.