

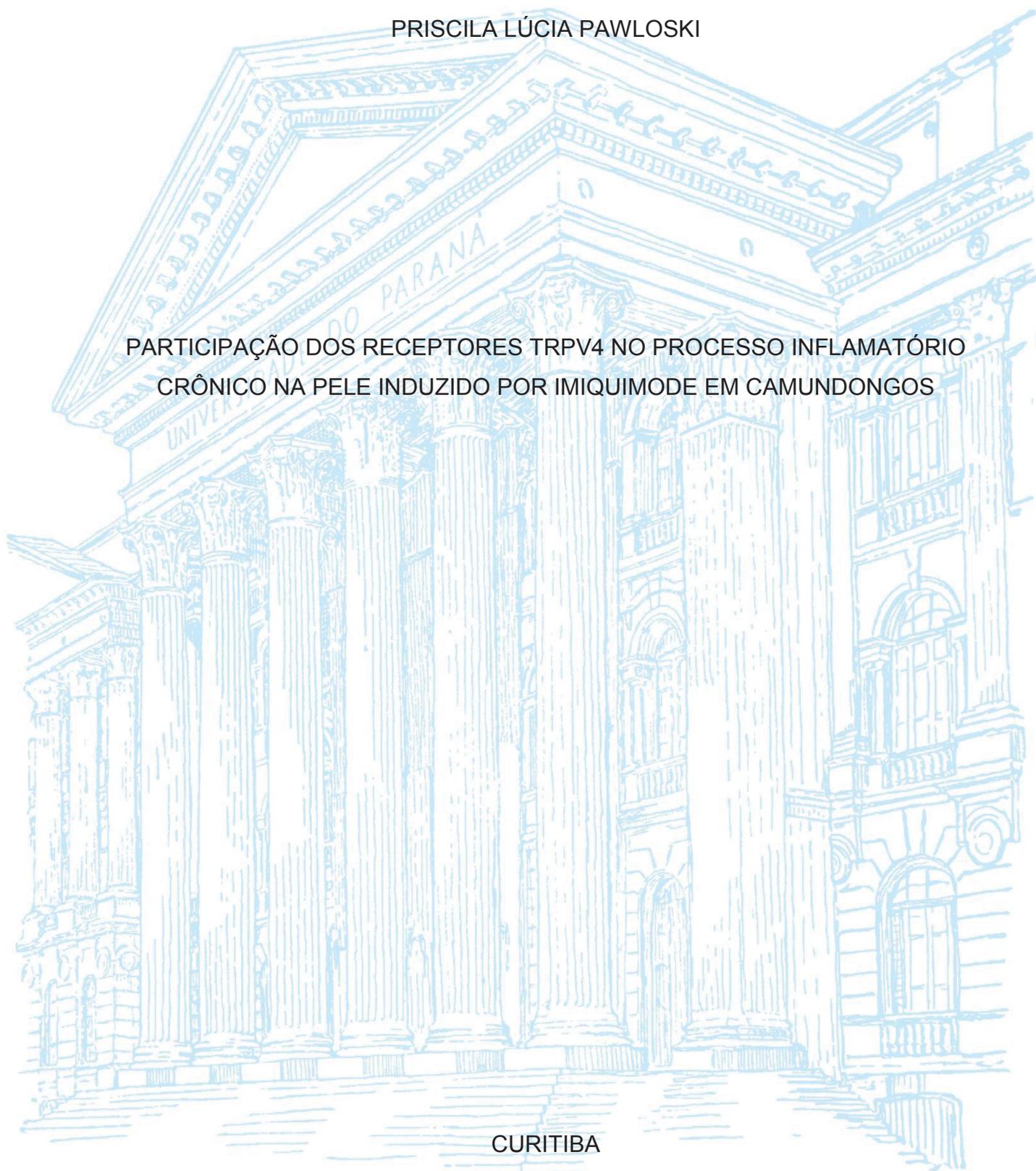
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PRISCILA LÚCIA PAWLOSKI

PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES TRPV4 NO PROCESSO INFLAMATÓRIO
CRÔNICO NA PELE INDUZIDO POR IMIQUIMODE EM CAMUNDONGOS

CURITIBA

2020



PRISCILA LÚCIA PAWLOSKI

PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES TRPV4 NO PROCESSO INFLAMATÓRIO
CRÔNICO NA PELE INDUZIDO POR IMIQUIMODE EM CAMUNDONGOS

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 em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Michel Otuki

Coorientadora: Prof^a. Dra. Eunice André

CURITIBA

2020

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

Pawloski, Priscila Lúcia

Participação dos receptores TRPV4 no processo inflamatório crônico na pele induzido por imiquimode em camundongos. / Priscila Lúcia Pawloski. – Curitiba, 2020.

94 p.: il.

Orientador: Michel Otuki

Coorientadora: Eunice André

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

1. Psoríase. 2. Imiquimode. 3. Prurido. I. Título. II. Otuki, Michel Fleith. III. André, Eunice, 1972-. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (22. ed.) 616.526

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DOUTORADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM FARMACOLOGIA

No dia trinta e um de março de dois mil e vinte às 09:00 horas, na sala virtual, Google Hangouts, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de tese da doutoranda **PRISCILA LUCIA PAWLOSKI**, intitulada: **PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES TRPV4 NO PROCESSO INFLAMATÓRIO CRÔNICO NA PELE INDUZIDO POR IMIQUIMODE EM CAMUNDONGOS**, sob orientação do Prof. Dr. MICHEL FLEITH OTUKI. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: MICHEL FLEITH OTUKI (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), JOICE MARIA DA CUNHA (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), DANIEL FERNANDES (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA), CINTIA DELAI DA SILVA HORINOUCI (INSTITUTO CARLOS CHAGAS). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de doutor está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, MICHEL FLEITH OTUKI, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 31 de Março de 2020.

Assinatura Eletrônica
16/04/2020 17:17:16.0
MICHEL FLEITH OTUKI
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
17/04/2020 11:21:18.0
JOICE MARIA DA CUNHA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
17/04/2020 18:20:05.0
DANIEL FERNANDES
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)

Assinatura Eletrônica
16/04/2020 18:19:06.0
CINTIA DELAI DA SILVA HORINOUCI
Avaliador Externo (INSTITUTO CARLOS CHAGAS)



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 **PRISCILA LUCIA PAWLOSKI** intitulada: **PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES TRPV4 NO PROCESSO INFLAMATÓRIO CRÔNICO NA PELE INDUZIDO POR IMIQUIMODE EM CAMUNDONGOS**, sob orientação do Prof. Dr. MICHEL FLEITH OTUKI, que após terem inquirido a aluna e realizada 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, 31 de Março de 2020.

Assinatura Eletrônica
16/04/2020 17:17:16.0
MICHEL FLEITH OTUKI
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
17/04/2020 11:21:18.0
JOICE MARIA DA CUNHA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
17/04/2020 18:20:05.0
DANIEL FERNANDES
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)

Assinatura Eletrônica
16/04/2020 18:19:06.0
CINTIA DELAI DA SILVA HORINOCHI
Avaliador Externo (INSTITUTO CARLOS CHAGAS)

Dedico este trabalho aos meus noninhos Maria Paladini Bratti e Irineu Bratti
(*in memoriam*) que são verdadeiros exemplos de bondade, coragem e força na
minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me permitido viver todos esses anos com saúde e rodeada de anjos da guarda disfarçados de seres humanos.

Aos meus pais, por terem me mostrado desde criança o caminho do conhecimento e a sede do saber, dedicando-me o maior amor possível. Às minhas irmãs Thaís e Lígia por me acompanharem e me apoiarem durante essa jornada. À minha irmã Patrícia e meu cunhado Rogério pelo incentivo constante e pelo carinho.

À família de Irati, sogros Silvio e Reni, compadres Janine e Davaus, aos sobrinhos Caio, Renan, André e Gabriel por toda alegria e pelo carinho.

Ao meu amor Silvio, para sempre meu “princeso”, por ter me incentivado do início ao fim desse doutorado, por ter sido meu colo e aconchego durante essa fase de tantas mudanças em nossas vidas.

Ao meu orientador Michel Otuki e à professora Daniela Cabrini, pela oportunidade de fazer parte do grupo de pesquisa PELLE, pela orientação e por todos esses anos que passei no laboratório. E claro, pela doce Margot, um presente que encheu nossa casa de pelos e de alegria.

À minha coorientadora Eunice Andre, por todo o incentivo, apoio, compreensão e orientação. Você foi essencial para que eu conseguisse desenvolver esse trabalho. Minha eterna gratidão por encontrá-la nesse caminho.

Aos meus colegas de laboratório aos quais dividi ao longo de todos esses anos a bancada, as alegrias e frustrações: Margareth, Fernanda, Fernando, Andressa, Ana Clara, Caroline, Bruna, Angélica, Thalita, Juliana, Kauê e Kelly. De modo especial à “Meg” e à “Grilla, pela amizade sem igual. Vocês foram luz e alegria nos meus dias.

À Naomie Destrempe, minha ‘irmã canadense’, um ser de muita luz que passou apenas uma temporada no laboratório, mas estará pra sempre na minha vida.

Aos funcionários da Farmaco, em especial à Eli, Sílvia, Gabriela e Fernando por serem sempre tão prestativos e por todo carinho com que sempre me trataram.

Em especial aos meus amigos Margareth Brandenburg e Maycon Mathias, não só pela amizade na sua forma mais pura e sincera, mas por todo o apoio, ajuda e força que me deram durante essa trajetória. Vocês não mediram esforços para estar ao meu lado e tornar esse sonho possível.

Às amigas Camila Guimarães e à Cintia Horinouchi que me ensinaram muito sobre pesquisa e que continuaram a me acompanhar mesmo de longe. Obrigada por toda ajuda e incentivo.

À minha família de Araraquara-SP que tanto amo: Tia Ju, Giu, Lis, Vini, Bia, Luciano, Carol e Mariano. Obrigada por emanarem amor e tornarem a vida mais simples e feliz.

Aos amigos que souberam compreender minha ausência durante muitos momentos ao longo desses anos e nem por isso deixaram de me encher de carinho e incentivo: Michele Dietrich, Sérgio, Sofia, Verlaine Maturana, os compadres Karem e Darci, juntamente com a pequena Isadora, afilhada amada.

Às minhas irmãs de farda, presentes que a Aeronáutica me deu: Andhrea Wathanabe, Carolina Weiss, Karen Wilcock e Thaiane Rebello.

À Universidade de Florença e ao grupo de pesquisa do professor Pierangelo Geppetti.

À Universidade Federal do Paraná, aos funcionários do Biotério/BL e às agências de fomento e aos que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho.

“Você nunca sabe que resultados virão da sua ação.
Mas se você não fizer nada, não existirão resultados”

Mahatma Gandhi

RESUMO

A psoríase é uma doença inflamatória crônica de pele, com fisiopatologia complexa. Com apresentação clínica variável, apresenta-se desde formas leves e facilmente tratáveis, até manifestações exacerbadas que apresentam coceira, dor e levam inclusive à incapacidade física. Sabe-se que os receptores de potencial transitório (TRPs), como o do tipo vaniloide 4 (TRPV4), parecem estar envolvidos em doenças de pele. Nesse trabalho, buscou-se investigar a importância do TRPV4 na psoríase induzida por imiquimode (IMQ) em camundongos, através da avaliação do grau de severidade do processo psoriático (PASI), hiperalgesia mecânica, prurido e bem-estar do animal. O modelo de psoríase foi desenvolvido pela aplicação de IMQ no dorso de animais com (TRPV4^{+/+}), com deleção gênica para o receptor TRPV4 (TRPV4^{-/-}) e em animais selvagens da linhagem C57BL/6 que receberam o antagonista de TRPV4, HC-067047 (10 mg/kg, via oral). Os dados demonstram que, no 4º dia, não houve diferença significativa no PASI (escore do PASI: 4,4 ± 0,75 para TRPV4^{+/+} e 5,8 ± 0,37 para TRPV4^{-/-}, ambos tratados com IMQ) quando comparado com animais controles tratados com o veículo (creme não iônico; PASI= 0). No 7º dia, também não houve melhora das lesões psoriáticas nos animais TRPV4^{+/+} e TRPV4^{-/-} tratados com IMQ (escore do PASI: 2,33 ± 0,8 e 3,33 ± 0,42, respectivamente) quando comparado com os animais controle (0,5 ± 0,5). Resultados semelhantes foram obtidos com o grupo de animais selvagens tratados com HC-067047. Nas análises histológicas não foi observado uma redução do processo inflamatório induzido pelo IMQ em nenhum dos grupos, assim como na imunomarcagem do indicador de proliferação PCNA realizada com os animais selvagens em que não foi verificada redução na hiperproliferação epidérmica. Na avaliação da hiperalgesia mecânica, não verificamos diferenças entre os grupos com deleção gênica e nem entre os grupos de animais selvagens. Os dados também demonstram que o tratamento com IMQ causou prurido no dorso dos animais: tanto TRPV4^{+/+} quanto TRPV4^{-/-} quando avaliados no 4º dia (tempo em segundos: 72,63 ± 24,25s; 66,43 ± 15,18s, respectivamente) e comparados com o grupo TRPV4^{+/+} veículo (1,00 ± 0,41s). No entanto, no 7º dia, observou-se uma redução significativa do prurido em animais TRPV4^{-/-} (% inibição: 64,8 ± 11,27%) quando comparado com o grupo TRPV4^{+/+} tratado com IMQ. Já nos animais selvagens, no sétimo dia, o grupo HC-067047 promoveu uma redução significativa do prurido induzido pelo IMQ (43,9 ± 11,96%) quando comparado com o grupo que recebeu o veículo do antagonista. Os dados relacionados ao bem-estar demonstraram, que no 4º dia, o tratamento com IMQ promoveu uma diminuição no escore de bem-estar tanto em animais TRPV4^{+/+} quanto em TRPV4^{-/-} (2,38 ± 0,74 e 2,71 ± 0,57, respectivamente) quando comparado com o escore dos animais TRPV4^{+/+} tratados com o veículo (4,4 ± 0,4). No 7º dia, se observou uma completa melhora no escore de bem-estar dos animais no grupo TRPV4^{-/-} (4,00 ± 0,31) quando comparado com o grupo TRPV4^{+/+} tratados com IMQ (2,6 ± 0,26). Além disso, o tratamento dos animais selvagens com HC-067047 também parece melhorar o bem estar dos animais. Os resultados obtidos sugerem que o TRPV4 pode estar envolvido no sintoma do prurido e no bem-estar do animal no modelo de psoríase induzido pelo IMQ, no entanto, são necessários estudos adicionais. Convém ressaltar que o prurido é um dos sintomas que mais prejudica a qualidade de vida do paciente e que poderia ser amenizado, utilizando um antagonista do receptor TRPV4.

Palavras-chave: Psoríase, Imiquimode, Prurido, TRP, TRPV4.

ABSTRACT

Psoriasis is a chronic inflammatory skin disease with a complex pathophysiology. With different clinical presentations, it appears as both mild and easily treatable forms, up to exacerbated manifestations with itch and pain which might lead to physical disability. Transient potential receptors (TRPs), such as the vanilloid type 4 (TRPV4), seem to be involved in skin diseases. In this manuscript we sought to investigate the importance of TRPV4 in imiquimod-induced psoriasis (IMQ) in mice by assessing the degree of severity of the psoriatic process (using the PASI score), mechanical hyperalgesia, itch, and animal welfare. Psoriasis-like injuries were induced by applying IMQ to the skin of the back of animals with TRPV4^{+/+}, with gene deletion for the TRPV4 receptor (TRPV4^{-/-}) and in wild-type animals of the C57BL/6 strain that received the TRPV4 antagonist, HC-067047 (10 mg/kg, orally). The data demonstrates that, on the fourth day, there was no significant difference in PASI (PASI score: 4.4 ± 0.75 for TRPV4^{+/+} and 5.8 ± 0.37 for TRPV4^{-/-}, both treated with IMQ) when compared to vehicle-treated control animals (non-ionic cream; PASI = 0). On the 7th day, there was also no improvement in psoriatic lesions in animals TRPV4^{+/+} and TRPV4^{-/-} treated with IMQ (PASI score: 2.33 ± 0.8 and 3.33 ± 0.42 , respectively) when compared to control animals (0.5 ± 0.5). Similar results were obtained with the group of wild animals treated with HC-067047. In the histological analyzes, there was no reduction in the inflammatory process induced by the IMQ in any of the groups, as well as in the immunostaining of the PCNA (proliferation indicator) performed with wild animals in which there was no reduction in epidermal hyperproliferation. In the assessment of mechanical hyperalgesia, we found no differences between groups either with gene deletion or between groups of wild animals. The data also demonstrates that treatment with IMQ caused itching: both TRPV4^{+/+} and TRPV4^{-/-} when evaluated on the fourth day (time in seconds: $72.63 \pm 24.25s$; $66.43 \pm 15.18s$, respectively) and compared with the TRPV4^{+/+} vehicle group ($1.00 \pm 0.41s$). However, on the seventh day, a significant reduction in itching behavior was observed in TRPV4^{-/-} animals (% inhibition: $64.8 \pm 11.27\%$) when compared to the TRPV4^{+/+} group treated with IMQ. As for wild animals, on the seventh day, the HC-067047 group promoted a significant reduction in the itching induced by the IMQ ($43.9 \pm 11.96\%$) when compared to the group that received the only vehicle. The data related to welfare demonstrated that, on the fourth day, treatment with IMQ decreased the welfare score in both TRPV4^{+/+} and TRPV4^{-/-} animals (2.38 ± 0.74 and $2, 71 \pm 0.57$, respectively) when compared to the score of TRPV4^{+/+} animals treated with vehicle (4.4 ± 0.4). On the seventh day, we observed an improvement in animal welfare score as observed in the TRPV4^{-/-} group (4.00 ± 0.31) when compared to the TRPV4^{+/+} group treated with IMQ ($2.6 \pm 0, 26$). In addition, treatment of wild animals with HC-067047 also appears to improve animal welfare. The results obtained suggest that TRPV4 may be involved in the pruritus symptom and in the animal well-being in the IMQ-induced psoriasis model, however, further studies are needed. It is worth mentioning that pruritus is one of the symptoms that most impairs the patient's quality of life and that could be alleviated by using a TRPV4 receptor antagonist.

Keywords: Psoriasis, Imiquimod, Pruritus, TRP, TRPV4.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Psoríase e suas manifestações clínicas	21
Figura 2 – Mecanismos inflamatório e imunológico de desenvolvimento e manutenção da psoríase.....	23
Figura 3 – Exemplo de ficha para cálculo de PASI	24
Figura 4 – Canais TRP na pele	29
Figura 5 – Estrutura dos canais TRPV	30
Figura 6 - Estrutura molecular dos receptores TRPV4.....	32
Figura 7 – Via de sinalização dos canais TRPV4 após estresse hipotônico	33
Figura 8 – Demonstração da quantificação do escore do bem-estar do animal (<i>Nest Building</i>).....	44
Figura 9 – Fotos representativas das lesões psoriáticas induzidas pelo IMQ, no 4º dia de tratamento, em animais TRPV4 ^{+/+} e TRPV4 ^{-/-}	47
Figura 10 – Efeito da deleção gênica do receptor TRPV4 na severidade das lesões psoriáticas induzidas pela aplicação de IMQ no 4º dia	48
Figura 11 – Fotos representativas das lesões psoriáticas induzidas pelo IMQ, no 7º dia de tratamento, em animais TRPV4 ^{+/+} e TRPV4 ^{-/-}	49
Figura 12 – Efeito da deleção gênica do receptor TRPV4 na severidade das lesões induzidas pela aplicação de IMQ no 7º dia	50
Figura 13 – Fotos representativas e análise das alterações histológicas dos cortes de amostras dos dorsos dos animais TRPV4 ^{+/+} e TRPV4 ^{-/-} submetidos ao protocolo de indução de psoríase através da aplicação de IMQ.....	52
Figura 14 – Avaliação da hiperalgesia mecânica em animais selvagens (TRPV4 ^{+/+}) e nocautes (TRPV4 ^{-/-}) submetidos ao protocolo de indução de psoríase através da aplicação de IMQ no dia 4 (A) e no dia 7 (B).....	53
Figura 15 – Efeito da deleção gênica de TRPV4 no prurido em animais submetidos ao protocolo de indução de psoríase através da aplicação de IMQ	55
Figura 16 – Avaliação do bem-estar dos animais selvagens (TRPV4 ^{+/+}) e nocautes (TRPV4 ^{-/-}) submetidos ao protocolo de indução de psoríase através da aplicação de IMQ	57
Figura 17 – Fotos representativas das lesões psoriáticas induzidas pelo IMQ, no 4º dia de tratamento, em animais C57BL/6.	59

Figura 18 – Efeito da administração de HC-067047 (10 mg/kg) na severidade das lesões psoriáticas induzidas pelo IMQ em animais C57BL/6 no 4º dia do protocolo experimental.....	60
Figura 19 – Fotos representativas das lesões psoriáticas induzidas pelo IMQ, no 7º dia de tratamento, em animais C57BL/6.	61
Figura 20 – Efeito da administração de HC-067047 (10 mg/kg) na severidade das lesões psoriáticas induzidas pelo IMQ em animais C57BL/6 no 7º dia do protocolo experimental	62
Figura 21 – Fotos representativas de cortes histológicos de amostras dos dorsos dos animais C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de psoríase através da aplicação de IMQ	63
Figura 22 – Efeito da administração de HC-067047 (10 mg/kg) na migração celular e na espessura da epiderme da pele de animais C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de psoríase através da aplicação de IMQ.	64
Figura 23 – Fotos representativas da análise imunohistoquímica de PCNA dos cortes histológicos do dorso de animais C57BL/6, contra corados com HE (200x, escala de 200 µm), submetidos ao protocolo de psoríase através da aplicação de IMQ	65
Figura 24 – Efeito da administração de HC-067047 (10 mg/kg) sobre a expressão epidérmica de PCNA na pele do dorso de animais C57BL/6 submetidos ao protocolo de psoríase induzida pela aplicação de IMQ.	66
Figura 25 – Efeito da administração de HC-067047 (10 mg/kg) no hiperalgesia mecânica em animais C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de psoríase através da aplicação de IMQ no dia 4 (A) e no dia 7 (B).	67
Figura 26 – Efeito da administração de HC-067047 (10 mg/kg) no tempo de prurido em animais C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de psoríase através da aplicação de IMQ	69
Figura 27 – Efeito da administração de HC-067047 (10 mg/kg) no bem-estar dos animais C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de psoríase através da aplicação de IMQ.	71
Figura 28 – Fotos representativas da pele do dorso dos animais e do resultado final do teste de <i>Nest Building</i> submetidos ao protocolo de psoríase através da aplicação de IMQ.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Protocolo utilizado nos camundongos com ou sem deleção gênica para o receptor TRPV4.....	40
Tabela 2 -	Grupos de tratamento do protocolo utilizado nos camundongos com ou sem deleção gênica para o receptor TRPV4.....	40
Tabela 3 -	Protocolo utilizado nos camundongos C57BL/6 tratados com o antagonista do receptor TRPV4.....	41
Tabela 4 -	Grupos de tratamento do protocolo utilizado nos camundongos C57BL/6 tratados com o antagonista do receptor TRPV4.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AA	- Ácido araquidônico
ALFAC	- Solução de Álcool, Formalina e Ácido Acético
ANOVA	- Análise de variância
ANK	- Anquirina
ASC	- Área de superfície corporal
ARRIVE	- Animal Research: Reporting In Vivo Experiments
ATP	- Trifosfato de Adenosina
BSA	- Albumina sérica bovina
CaM	- Calmodulina
CD	- Células dendríticas
CGRP	- Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
DAB	- Diaminobenzidina
DLQI	- Índice de Qualidade de Vida em Dermatologia
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DRG	- Gânglio da Raiz Dorsal
EPM	- Erro Padrão da Média
HPV	- Papiloma vírus humano
IFN- γ	- Interferon-gama
IL	- Interleucina
IMQ	- Imiquimode
IP3	- 1, 4, 5 fosfatidilinositol trifosfato
K	- Queratina
KV	- Canais de potássio dependente de voltagem
LTh1	- Linfócitos TCD4 tipo 1
LTh17	- Linfócitos TCD4 tipo 17
LTc1	- Linfócitos TCD8+ tipo 1
NGF	- Fator de Crescimento Nervoso
NPY	- Neuropeptídeo Y
PAR-2	- Receptores ativados por protease
PASI	- <i>Psoriasis Area Severity Index</i>
PBS	- Tampão fosfato
PCNA	- Antígeno Nuclear de Células em Proliferação

pDC	- Células dendríticas plasmocitoides
PGE2	- Prostaglandina E2
PGP 9.5	- Produto do gene da proteína 9.5
PIP2	- Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PLA2	- Fosfolipase A2
PKA	- Proteína Quinase A
PLC	- Fosfolipase C
SNC	- Sistema Nervoso Central
SUS	- Sistema Único de Saúde
TLR7	- Receptor do tipo Toll 7
TM	- Domínios transmembranas
TNF- α	- Fator de necrose tumoral alfa
TRPs	- Receptores de potencial transitório
TRPV4	- Receptores de Potencial Transitório Vanilóide Tipo 4

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	16
1.1 DOENÇAS DE PELE.....	16
1.2 PSORÍASE.....	19
1.3 RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSITÓRIO.....	28
1.4 RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSITÓRIO VANILÓIDE TIPO 4.....	31
2 HIPÓTESE.....	38
3 OBJETIVOS.....	39
3.1 OBJETIVO GERAL.....	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	40
4.2 ANIMAIS.....	41
4.3 DROGAS E REAGENTES.....	42
4.4 MODELO ANIMAL DE PSORÍASE.....	42
4.5 AVALIAÇÃO DA SEVERIDADE DA INFLAMAÇÃO CUTÂNEA.....	43
4.6 AVALIAÇÃO DA HIPERALGESIA MECÂNICA.....	43
4.7 AVALIAÇÃO DO PRURIDO.....	44
4.8 MODELO DE BEM ESTAR DO ANIMAL (NEST BUILDING).....	44
4.9 ANÁLISE DE ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS.....	45
4.10 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PCNA ATRAVÉS DE IMUNOHISTOQUÍMICA.....	45
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
5 RESULTADOS.....	47
5.1 EFEITO DA DELEÇÃO GÊNICA DO RECEPTOR TRPV4 NAS LESÕES PSORIÁTICAS INDUZIDAS POR IMQ.....	47
5.2 EFEITO DA DELEÇÃO GÊNICA DE TRPV4 NA ESTRUTURA DA PELE DOS ANIMAIS AVALIADO ATRAVÉS DA ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	50
5.3 EFEITO DA DELEÇÃO GÊNICA DE TRPV4 NA HIPERALGESIA MECÂNICA NO MODELO DE PSORÍASE INDUZIDA POR IMQ.....	53
5.4 EFEITO DA DELEÇÃO GÊNICA DE TRPV4 NO PRURIDO INDUZIDO PELA APLICAÇÃO TÓPICA DE IMQ.....	54

5.5 EFEITO DA DELEÇÃO GÊNICA DE TRPV4 NO BEM-ESTAR DOS ANIMAIS SUBMETIDOS AO MODELO DE PSORÍASE INDUZIDA POR IMQ	56
5.6 EFEITO DO ANTAGONISTA SELETIVO DE TRPV4 (HC-067047) NA SEVERIDADE DA LESÃO PSORIÁTICA INDUZIDA POR IMQ EM ANIMAIS C57BL/6	58
5.7 EFEITO DO ANTAGONISTA SELETIVO DE TRPV4 (HC-067047) NA PELE DE ANIMAIS C57BL/6 SUBMETIDOS A APLICAÇÃO DE IMQ.....	62
5.8 EFEITO DO ANTAGONISTA SELETIVO DE TRPV4 (HC-067047) NA EXPRESSÃO DE PCNA NA PELE DE ANIMAIS SUBMETIDOS AO MODELO DE PSORÍASE INDUZIDA POR IMQ.....	65
5.9 EFEITO DO ANTAGONISTA SELETIVO DE TRPV4 (HC-067047) NA AVALIAÇÃO DA HIPERALGESIA MECÂNICA.....	66
5.10 EFEITO DO ANTAGONISTA SELETIVO DE TRPV4 (HC-067047) NO PRURIDO NO MODELO DE PSORÍASE INDUZIDA POR IMQ.....	67
5.11 EFEITO DO ANTAGONISTA SELETIVO DE TRPV4 (HC-067047) NA AVALIAÇÃO DO BEM-ESTAR ANIMAL ATRAVÉS DO TESTE DE <i>NEST BUILDING</i>	69
6 DISCUSSÃO	73
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
REFERÊNCIAS.....	83

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 DOENÇAS DE PELE

A pele é uma estrutura extraordinária, pois além de representar um elemento essencial para a proteção primária do organismo, impedindo que agressores externos prejudiquem a homeostasia corporal através da barreira física e imunológica que representa, interfere também com a estrutura da personalidade, afetando de maneira direta a atitude em relação ao meio ambiente e a saúde mental do indivíduo (KOLARSICK *et al.*, 2011; RICHMOND; HARRIS, 2016; SANCLEMENTE *et al.*, 2017).

Por representar a primeira barreira em contato com o meio externo, doenças de pele possuem uma frequência muito elevada, atingindo cerca de 21 a 87% da população mundial e constituindo cerca de 25% das consultas na atenção primária à saúde. Apesar da frequência elevada, são comumente subestimadas, devido à natureza crônica e baixa mortalidade (SANCLEMENTE *et al.*, 2017; MIOT, 2018). De acordo com estudo envolvendo dados de doenças da pele extraídos de mais de 4000 fontes, incluindo revisões sistemáticas, pesquisas, registros de doenças de base populacional, dados de pacientes internados em hospitais, dados de pacientes ambulatoriais, estudos de coorte e dados de autópsia, as doenças de pele são consideradas a quarta principal causa de incapacidade avaliada em diferentes países do mundo (KARIMKHANI *et al.*, 2017).

Existem mais de 3000 doenças de pele conhecidas que variam em gravidade e sintomas, de infecções autolimitadas e tumores benignos, a doenças inflamatórias crônicas e neoplasias malignas que causam morbidade significativa e afetam gravemente a qualidade de vida. Estima-se que cada indivíduo desenvolva uma doença de pele pelo menos uma vez durante a vida (TIZEK *et al.*, 2019).

Toda doença acompanha uma carga de sofrimento, seja por mortalidade direta ou medo ou, especialmente em doenças crônicas, por sensações desagradáveis (como a dor), incapacidade (por exemplo, perda de movimento ou função do órgão) ou desfiguração da pele em regiões visíveis. Qualidade de vida (CALMAN, 1984) é um dos parâmetros essenciais para a dermatologia e pode ser prejudicada por várias razões, principalmente devido aos sintomas da doença. Na dermatologia, o sintoma mais proeminente é o prurido, embora existam doenças de pele muito dolorosas, como dermatite atópica (VAKHARIA *et al.*, 2017) e epidermólise bolhosa (SCHRADER

et al., 2018). As doenças de pele inevitavelmente acompanham o estresse psicológico e a consequente desfiguração da aparência, fenômeno central que influencia a percepção do paciente por si e por outras pessoas ao seu redor. A desfiguração também leva a vários graus de isolamento quando se trata de atividades sociais, como esportes ou lazer. Também pode-se dizer que a vida sexual pode ser seriamente afetada ou destruída por uma doença de pele (RING, 2017).

Muitas doenças de pele podem causar incapacidade e redução da qualidade de vida do indivíduo e, devido a isso, a avaliação da qualidade de vida em pacientes dermatológicos está em constante evolução. Em dermatologia, a Academia Americana de Dermatologia e as Medidas Internacionais de Resultado em Dermatologia colaboraram para melhorar a qualidade dos cuidados prestados e avançar na avaliação da qualidade de vida (PEREZ-CHADA *et al.*, 2019).

A relevância da qualidade de vida na dermatologia é demonstrada pelo aumento do número de estudos sobre o assunto, inclusive em ensaios clínicos terapêuticos. Existem várias ferramentas de medição da qualidade de vida, como o Índice de Qualidade de Vida em Dermatologia (DLQI) e o Skindex, um questionário dermatológico genérico que pode ser usado para avaliar a qualidade de vida em pacientes com qualquer condição de pele. Essas ferramentas ajudam a estimar o impacto das condições médicas nesses determinantes da saúde e podem ser adaptadas a diferentes configurações, a fim de auxiliar os médicos em suas práticas clínicas. Atualmente, vem sendo muito utilizadas em ensaios clínicos de um grande número de doenças de pele, especialmente condições crônicas e recorrentes, como acne, psoríase, dermatite atópica e dermatite de contato (SANCLEMENTE *et al.*, 2017; SETH *et al.*, 2017; CARCANO *et al.*, 2018).

A própria aparência da pele é preditiva da satisfação geral e conseqüentemente da qualidade de vida do ser humano. O comprometimento da própria imagem é tão importante que um estudo mostrou que até 50% dos pacientes com eczema grave e 49% dos pacientes com psoríase estariam dispostos a dedicar mais horas do dia no tratamento, caso isso fosse condicionado a recuperar a pele normal (FINLAY; COLES, 1995).

O impacto econômico dos distúrbios da pele também é enorme. Somente nos EUA, os gastos diretos e indiretos com doenças de pele em 2013 foram de US\$ 75 bilhões e US\$ 11 bilhões, respectivamente. O conhecimento desses dados em países em desenvolvimento é ainda bastante escasso. A prevalência de doenças de pele na

Índia foi de 45,3%, de 28,2% na área rural de Sumatra e na África variou de 10 a 50% (MAHE *et al.*, 1997; SAW *et al.*, 2001; GRILLS *et al.*, 2012). Estudos que investigam os custos associados a doenças de pele nesses países são raros. Na Índia o valor médio do custo dos cuidados com a saúde da pele foi de 73% da renda mensal per capita (SETH *et al.*, 2017). No Brasil, não existem estudos avaliando o impacto econômico das doenças de pele de modo generalizado, e sim de formas específicas, como por exemplo de pacientes com determinada doença de pele, tal como psoríase (SARKAR *et al.*, 2016).

Com a crescente incidência e consequente prevalência de doenças de pele na população mundial, já existem ferramentas que permitem fornecer um atendimento dermatológico e um diagnóstico mais rápido a regiões de atendimento mais precárias de maneira econômica. A tele dermatologia, por exemplo, é um exame dermatológico realizado à distância a partir de fotografias digitais do paciente, enviadas para avaliação de teleconsultores dermatologistas (SETH *et al.*, 2017).

Existem terapias que buscam a melhoria da sintomatologia, mas nem sempre são completamente eficazes. Isso se deve principalmente a alta complexidade dos mecanismos ainda não elucidados que podem estar envolvidos na patogênese dessas doenças. Por essa razão é que a busca por novas opções terapêuticas é essencial, visto que além da não responsividade ao tratamento, os efeitos adversos muitas vezes são consideráveis, como por exemplo dos corticosteroides utilizados a longo prazo que podem provocar alterações na pele (atrofia cutânea e diminuição do processo de cicatrização), osteoporose, atrofia muscular/miopatia, glaucoma, alterações do eixo hipófise-pituitária-adrenal, indução do diabetes e hipertensão (MASON *et al.*, 2013). Existe também o desconhecimento sobre os efeitos a longo prazo e o impacto do alto custo das terapias mais atuais (ZHANG *et al.*, 2015; BRANDON *et al.*, 2019; GORELICK *et al.*, 2019).

Atualmente existem inúmeros grupos de pesquisa pelo mundo tentando investigar e elucidar as vias envolvidas na fisiopatologia das doenças cutâneas. Esses estudos são fundamentais para o desenvolvimento de novas terapias e os receptores de canal TRP vêm ganhando atenção nas doenças inflamatórias da pele (GRACE *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2017).

1.2 PSORÍASE

A psoríase é uma doença inflamatória crônica, mediada pelo sistema imune, que se manifesta principalmente por lesões cutâneas, podendo apresentar comprometimento das articulações (NESTLE, F. O. *et al.*, 2009). É uma doença cutânea bastante comum, com prevalência entre 1-12% na população mundial (GUPTA *et al.*, 2014; MICHALEK *et al.*, 2017) e está associada a significativa carga de sintomas secundários, incluindo redução da qualidade de vida, aumento da incapacidade, estigmatização, alteração emocional e redução do bem-estar físico (GORELICK *et al.*, 2019).

A prevalência e incidência da doença parecem estar associadas a fatores climáticos e étnicos, embora a compreensão dessas relações seja ainda bastante complexa (JACOBSON *et al.*, 2011). Em uma revisão sistemática de estudos populacionais publicados em 2013, em que foram pesquisadas três bases de dados eletrônicas desde as datas de criação até julho de 2011, a prevalência da psoríase em crianças variou de 0% (Taiwan) a 2,1% (Itália) e, em adultos, de 0,91% nos Estados Unidos a 8,5% na Noruega. A estimativa de incidência relatada variou de 78,9 a cada 100.000 pessoas por ano nos Estados Unidos a 230 a cada 100.000 pessoas por ano na Itália. Os dados indicaram que a ocorrência de psoríase é variável de acordo com a idade e região geográfica, sendo mais frequente em países mais distantes da linha do Equador (PARISI *et al.*, 2013). Como existem poucos estudos avaliando a prevalência de pacientes com psoríase na América do Sul, há divergência sobre a equiparação em relação a outros países (DIBONAVENTURA *et al.*, 2018).

A etiologia da psoríase ainda não é totalmente elucidada e, embora a transmissão genética esteja claramente envolvida, parece atuar como um predisponente, sendo necessária a interação com estímulos ambientais para o desenvolvimento da doença (ORTONNE, 1996). O índice de massa corporal elevado, tabagismo e consumo de álcool também se incluem em fatores desencadeantes para o desenvolvimento das lesões psoriáticas (PARISI *et al.*, 2013; JENSEN; SKOV, 2016; NALDI, 2016).

Como outras doenças inflamatórias crônicas, a psoríase também está associada a uma longa lista de comorbidades. Doenças cardiovasculares, hipertensão arterial, diabetes tipo 2 e dislipidemia são as mais prevalentes nesses pacientes em comparação com a população em geral (BARBARROJA *et al.*, 2019;

SULTANA *et al.*, 2019). Doenças envolvendo o intestino, como a doença de Crohn, parecem ter maior incidência em pacientes com psoríase, sugerindo a existência de um elo entre os fatores inflamatórios que sustentam a psoríase e os distúrbios metabólicos intestinais (FU *et al.*, 2018).

As lesões psoriáticas manifestam-se classicamente como placas bem demarcadas, elevadas, eritematosas e cobertas com escamas prateadas sobrepostas. As lesões normalmente apresentam uma coloração acinzentada, sendo bastante comum o desenvolvimento de hiperpigmentação cutânea pós-inflamatória após a remissão das lesões (COHEN *et al.*, 2012). O prurido também é um importante indicador da psoríase, mas os mecanismos subjacentes a este sintoma são em grande parte desconhecidos (SAKAI *et al.*, 2016).

O termo psoríase deriva da palavra grega “psora”, que significa “condição de prurido”. Aproximadamente 60-90% dos pacientes com psoríase relatam prurido e um dos fatores agravantes da coceira psoriática é o contato com a roupa. Esse fenômeno, resultante da sensibilização das vias de sinalização da coceira, é um aspecto importante visto que a coceira crônica é extremamente difícil de tratar e não há tratamento universal para a coceira psoriática (REICH; SZEPIETOWSKI, 2014; SAKAI *et al.*, 2016).

A psoríase crônica em placas (psoríase vulgar) é a forma mais comum da doença (Figura 1A), responsável por 90% dos casos e se manifesta com lesões nos cotovelos, joelhos, couro cabeludo, umbigo e região lombar (Figura 1B-C). Os outros tipos são: gutata, pustular, invertida e eritrodérmica (BOEHNCKE; SCHON, 2015). A psoríase gutata se apresenta como lesões em forma de lágrima ou gota e é frequentemente precedida por dor de garganta associada com infecção estreptocócica do grupo B e consiste em múltiplas lesões psoriáticas pequenas (2–10 mm), mais frequentemente no tronco (BRANDON *et al.*, 2019). A psoríase inversa é vista nas dobras do corpo e é caracterizada por lesões vermelhas brilhantes, nas áreas inframamária, perianal e axilar. A psoríase eritrodérmica, na qual 90% ou mais do corpo é acometido, é a forma mais grave da doença e pode estar associada com sintomas graves como insuficiência cardíaca, representando risco de morte ao paciente (Figura 1D) (BOEHNCKE; SCHON, 2015; BRANDON *et al.*, 2019). As lesões também podem acometer as unhas (psoríase ungueal) e as articulações (artrite psoriática). A artrite psoriática atinge cerca de 30% dos pacientes com psoríase, caracterizada por inflamação das articulações que geram lesões articulares dolorosas

e muitas vezes debilitantes, além das manifestações cutâneas (BOEHNCKE; SCHON, 2015; RITCHLIN *et al.*, 2017).



Figura 1: Psoríase e suas manifestações clínicas. Psoríase vulgar com as placas eritematosas típicas com escamas prateadas que podem ser localizadas (A); ou podem se espalhar (B), chegando a cobrir grandes áreas corporais (C). Em (D) a forma mais grave da doença, a psoríase eritrodérmica, que chega a afetar toda a superfície corporal.

Fonte: Adaptado de (BOEHNCKE; SCHON, 2015).

As placas psoriáticas típicas surgem de alterações patológicas em praticamente todas as células da pele, sendo a principal característica histopatológica, a hiperproliferação dos queratinócitos da epiderme com hiperqueratose. A taxa mitótica dos queratinócitos é drasticamente aumentada enquanto a maturação é reduzida. Por essas alterações, a epiderme psoriática apresenta muito mais camadas de células, a camada granulosa é ausente, e observa-se queratinócitos ainda nucleados na camada córnea. Essas mudanças estão associadas com a expressão alterada de diversos marcadores celulares (ECKERT, 1989).

Na pele em condições normais, as células basais expressam as queratinas K5 e K14, enquanto as células suprabasais expressam queratinas relacionadas a diferenciação, K1 e K10. Na psoríase, a mudança da expressão de queratinas inclui a redução de K1 e K10 e a indução de queratinas associadas a hiperproliferação, K6, K16 e K17. Entre as queratinas expressas anormalmente, destaca-se a K17, pois ela não é expressa normalmente na epiderme saudável, entretanto é altamente expressa em lesões psoriáticas (FU; WANG, 2012).

Outra característica bastante comum na placa é um aumento significativo dos vasos sanguíneos na derme, que causa eritema visível. O acúmulo de neutrófilos e um denso infiltrado inflamatório composto por aglomerados de células TCD4+ e células dendríticas (CD) apresentadoras de antígeno na derme, e células TCD8+ na epiderme (NAKAJIMA; SANO, 2018).

As alterações histopatológicas observadas na psoríase são resultado da atividade anormal do sistema imune, na qual o processo inflamatório instalado é resultado de uma estimulação persistente das células T por antígenos epidérmicos, com a participação tanto da imunidade inata quanto da adquirida. O sistema imune inato pode ser ativado por diversos fatores ambientais, os quais inicialmente irão estimular células residentes como queratinócitos e CD. Uma vez estimulados, os queratinócitos secretam citocinas como IL-1 e TNF- α , as quais vão ativar as CD, como as células de Langerhans. Essas células por sua vez migram até o linfonodo mais próximo, ativam linfócitos T, iniciando assim a ativação do sistema imune secundário. Na psoríase observa-se principalmente a ativação de linfócitos TCD4+ tipo 1 (LTh1) que secretam Interferon- γ (IFN- γ), TNF- α e Interleucina-2 (IL-2); linfócitos tipo 17 (LTh17) secretores de IL-17, TNF- α , IL-6 e IL-22; e linfócitos TCD8+ tipo 1 (LTc1). Uma vez ativados, os linfócitos migram dos linfonodos para a pele onde, os LTc1 concentram-se na epiderme enquanto os LTh na derme, ativando CD e macrófagos e assim sustentando a ativação do sistema imune inato. As CD e macrófagos ativados secretam IL-12 e IL-23 que estimulam a proliferação de LTh1 e LTh17, respectivamente, estabelecendo assim, um ciclo vicioso de ativação do sistema imune, como representado na Figura 2 (SABAT *et al.*, 2007).

e hidratantes emolientes. A introdução de fototerapia com UVB ou UVA com psoraleno é geralmente considerada quando pelo menos 10% da área corporal estiver envolvida ou em pacientes que não responderam a terapias tópicas. Os tratamentos sistêmicos convencionais geralmente são iniciados quando 10% ou mais da área corporal é afetada, quando a psoríase tem um efeito debilitante na qualidade de vida do paciente (por exemplo, envolvimento das palmas das mãos ou das solas dos pés) ou quando a resposta aos tratamentos tópicos e à fototerapia foram insuficientes (BOEHNCKE; SCHON, 2015). Os agentes sistêmicos mais comumente usados incluem metotrexato, ciclosporina, acitretina e sulfassalazina. Durante a última década, vários produtos biológicos foram licenciados como tratamentos seguros e eficazes para a psoríase em placas grave, tais como os agentes anti-IL-17, inibidores de IL-23 e inibidores de IL-12-23. Os agentes anti-TNF foram os primeiros no mercado e ainda podem ser usados na artrite psoriática, embora hoje existam agentes mais recentes que podem substituí-los (BRANDON *et al.*, 2019). No Brasil, a lista de imunobiológicos do Sistema Único de Saúde conta com agentes anti-TNF (adalimumabe e etanercept), anti-IL17 (secuquinumabe), inibidor de IL-12 e IL-23 (ustequinumabe) para alguns pacientes com psoríase (Sistema Único de Saúde, ANVISA, 2019).

A escolha de produtos biológicos é muitas vezes difícil para o profissional e para o paciente. A terapia biológica para a psoríase moderada a grave pode ser altamente eficaz, porém tem um custo elevadíssimo (KLIJN; VAN DEN REEK, 2018; KROMER *et al.*, 2018). Além do que, existem várias considerações em relação a segurança associadas a agentes biológicos e todos os pacientes que iniciam esse tratamento participam de registros de segurança a longo prazo (BRANDON *et al.*, 2019).

Embora existam tratamentos dermatológicos eficazes, uma proporção significativa de indivíduos também experimenta sofrimento psicológico normalmente não abordado por esses tratamentos (SIJERCIC *et al.*, 2019). Em trabalhos recentemente publicados envolvendo pacientes com psoríase de 31 países diferentes, 84% de todos os entrevistados relataram terem sofrido discriminação ou humilhação devido à psoríase, e muitos relataram efeitos negativos no trabalho, relacionamentos íntimos, sono e saúde mental (ARMSTRONG *et al.*, 2018; KAAZ *et al.*, 2019).

Para que o desenvolvimento de novas terapias, efetivas e seguras, ocorra de maneira satisfatória e vantajosa, se faz necessário o uso de modelos que permitam a realização de estudos pré-clínicos confiáveis. Modelos *in vitro* utilizando células humanas tem aumentado o poder de predição dos ensaios pré-clínicos, além de atender às demandas acerca das questões éticas envolvidas no uso de animais de experimentação. Junto aos avanços da engenharia tecidual, esses modelos aumentaram em complexidade permitindo o rápido desenvolvimento de novos modelos de cultura epidérmica humana reconstituída para mimetizar a morfologia da epiderme escamosa estratificada normal. Até o momento, a maioria desses modelos dependem de linhagens celulares estabelecidas ou queratinócitos epidérmicos primários derivados de pacientes com psoríase ou de indivíduos normais. Embora esses modelos sejam úteis para investigar o mecanismo molecular da doença, incluindo diferenciação de queratinócitos e resposta a estímulos, existem ainda muitas limitações como a ausência de vasos sanguíneos e microambientes fisiológicos nos tecidos reconstituídos (BOCHENSKA *et al.*, 2017). Sendo assim, para estudos farmacológicos na psoríase, modelos animais são ainda os recursos mais confiáveis na predição da eficácia.

As diferenças de espécies entre roedores e humanos é um grande problema associado a modelos *in vivo* de psoríase, visto que a psoríase parece estar restrita a humanos e aparentemente não ocorre em animais, com exceção de macacos rhesus e cynomolgus (JAYO *et al.*, 1988). Os mecanismos heterogêneos da psoríase dificultam a identificação de um modelo que espelhe completamente todos os aspectos da doença (DOWLATSHAHI *et al.*, 2013).

Os modelos animais de psoríase disponíveis são os mais diversos, uma vez que a patogênese da psoríase envolve mecanismos amplamente complexos e que não são ainda bem compreendidos. Cada um desses modelos é baseado em um mecanismo patogênico específico, tendo portanto, similaridades com parâmetros psoriáticos, mas também suas limitações. Um dos tipos mais comuns de modelos animais são os animais geneticamente modificados, sendo transgênicos ou *knockout* (KO) para genes relacionados a células epidérmicas, endoteliais ou leucócitos. Um outro tipo de modelo envolve a indução imunológica ou transplante de pele psoriática humana em camundongos saudáveis (DANILENKO, 2008; TIIRIKAINEN *et al.*, 2019).

Um dos modelos de indução direta é o da psoríase induzida pela aplicação tópica de imiquimode (IMQ) em camundongos. O IMQ é um agonista de receptor do

tipo Toll 7 (TLR7), sendo modulador da resposta imune e aprovado para uso tópico para o tratamento de verrugas causadas pelo papiloma vírus humano (HPV), no qual é normalmente bem tolerado pelos pacientes. Entretanto, alguns pacientes começaram a relatar o aparecimento de lesões psoriáticas após tratamento com IMQ tópico o que levou ao estudo dos efeitos psoriáticos dessa droga (WU *et al.*, 2004; FANTI *et al.*, 2006; RAJAN; LANGTRY, 2006). Estudos demonstraram que as lesões induzidas por IMQ são relacionadas com eventos característicos da psoríase como, grande quantidade de células dendríticas plasmocitóides (pDC) e indução da atividade de Interferon do tipo I (GILLIET *et al.*, 2004).

Frente às evidências, Van Der Fits, L. e colaboradores (2009) caracterizaram o modelo de psoríase induzida pela aplicação tópica de IMQ em camundongos. A aplicação tópica diária de IMQ levou ao desenvolvimento de placas escamosas similares às placas psoriáticas, caracterizadas pela hiperproliferação da epiderme, diferenciação incompleta de queratinócitos, presença de neutrófilos na epiderme, neoangiogênese, e infiltrado de células pDC, linfócitos TCD4+ e células dendríticas CD11c+. Além disso, foi observado o aumento na expressão das citocinas IL-23, IL17A e IL-17F, sendo que em animais deficientes para essas citocinas o desenvolvimento da doença foi praticamente inibido.

Um dos principais efeitos colaterais do IMQ é a coceira e devido a isso, o modelo de psoríase induzida por IMQ pode ser também utilizado para a investigação da coceira na psoríase (SAKAI *et al.*, 2016; KITAKA; TOMINAGA, 2017). Assim, a aplicação tópica de IMQ em camundongos promove o aparecimento de lesões e prurido com parâmetros muito semelhantes a aqueles observados nas lesões psoriáticas, representando um modelo animal de psoríase bastante interessante (VAN DER FITS *et al.*, 2009). Esse modelo foi validado através de uma caracterização genômica total da pele a qual demonstrou grande semelhança entre os perfis de expressão gênica cutânea entre lesões psoriáticas humanas e pele de camundongos tratados com IMQ. As semelhanças foram encontradas especialmente em genes relacionados ao desenvolvimento epidérmico e queratinização, ficando comprovada a validade desse modelo como ferramenta de pesquisa em estudos pré-clínicos de drogas antipsoriáticas (SWINDELL *et al.*, 2011).

1.3 RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSITÓRIO

Os receptores de potencial transitório (TRPs) constituem uma grande família de canais iônicos expressos em espécies de animais vertebrados e invertebrados. Foram identificados pela primeira vez em *Drosophila*, no ano de 1989 (MONTELL; RUBIN, 1989). Existem seis famílias de TRPs em mamíferos incluindo TRPC (canônico), TRPV (vanilóide), TRPM (melastatina), TRPA (anquirina), TRPP (policistina) e TRPML (mucolipina). Recentemente, uma nova família TRP foi identificada e nomeada como TRPY (LI, 2017).

Mamíferos expressam pelo menos 28 diferentes tipos de canais TRPs. Os canais TRPs são amplamente distribuídos pelos tecidos e podem ser controlados por diferentes estímulos físicos e químicos, variando de íons e pequenas moléculas a estímulos como calor, frio e força mecânica (JORDT; EHRLICH, 2007; CATERINA; PANG, 2016). A ativação dos canais TRPs geralmente promove influxo de cálcio influenciando diferentes processos celulares em células excitáveis e não excitáveis (YANG *et al.*, 2017).

A pele expressa muitos subtipos de canais TRPs que estão ligados ao desenvolvimento, integridade e função tanto em condições saudáveis, como em condições de doença (TOTH *et al.*, 2014). Como representado na Figura 4, os canais TRPs não são apenas expressos nas terminações nervosas sensoriais, mas também em muitas células não neuronais incluindo queratinócitos e células imunes residentes na pele. Vários canais TRPs participam da formação e manutenção de barreira cutânea, processos imunológicos e inflamatórios cutâneos, mantendo assim a homeostase da pele. E ainda, vários canais TRPs expressos na pele atuam como sensores de temperatura, estímulos mecânicos e químicos tanto em termos fisiológicos quanto em condições patológicas (YANG *et al.*, 2017).

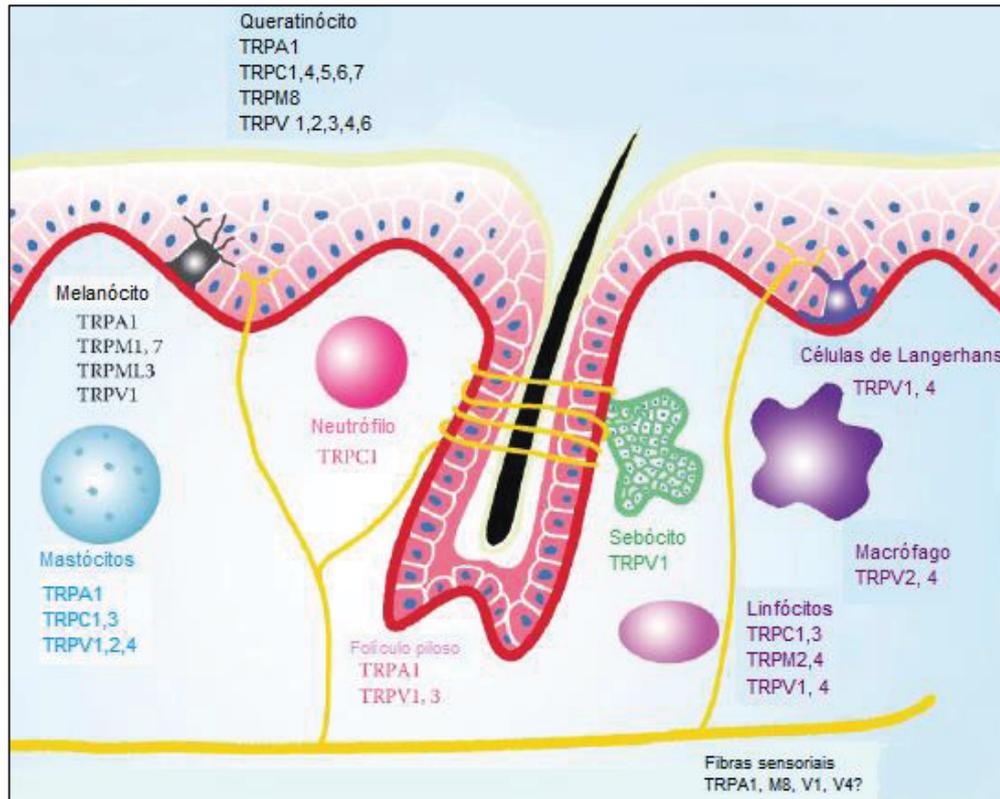


Figura 4: Canais TRP na pele. Os canais TRP expressos na pele podem contribuir para manter a fisiologia normal da pele ou desempenhar papéis importantes na patogênese das doenças de pele. FONTE: Adaptado de (YANG *et al.*, 2017).

Mais notavelmente, a capacidade de muitos canais TRPs na mediação do influxo de cálcio em neurônios cutâneos, queratinócitos, melanócitos ou células imunes fornece um mecanismo pelo qual esses canais influenciam na proliferação celular, diferenciação, secreção de fatores parácrinos/autócrinos, citotoxicidade, migração celular e de outros processos relevantes para a pele (CATERINA; PANG, 2016).

Estudos recentes demonstraram que vários membros das subfamílias TRP V, M e A atuam como receptores de sensação térmica, respondendo a mudanças moderadas ou nocivas da temperatura externa. Esses canais são chamados de termorreceptores. Os receptores de calor inócuo incluem TRPV3 e TRPV4, ativados pela temperatura entre 34 –38 e 27–35°C, respectivamente e receptores TRPV1 e TRPV2, com um limite de ativação térmica (calor nocivo) 43 e 52°C, respectivamente. As temperaturas de ativação para dois receptores de frio conhecidos, TRPA1 e TRPM8, são abaixo de 17°C (frio nocivo) e 25–28°C (frio inócuo), respectivamente. Muitos dos canais termorreceptores podem ser ativados também por outros fatores, como por exemplo, TRPV2 e TRPV4 através da hipotonicidade e estímulo mecânico,

TRPV1 e TRPV4 pela redução do pH extracelular, TRPV1 por ligantes vaniloides e canabinoides, TRPV4 por metabólitos do ácido araquidônico (AA) e mentol. Essa diversidade de estímulos pode atuar ativando TRP para potencializar a ativação da sensação de dor, resposta inflamatória ou adaptação celular/tecidual a uma variedade de estressores externos como substâncias irritantes, mediadores da inflamação e toxinas xenobióticas (EVERAERTS *et al.*, 2010).

Estudos relatam uma ampla expressão e ativação de canais TRP em tecidos não neuronais que podem direcionar ou acelerar ainda mais a resposta para mudanças físico-químicas no ambiente extracelular (KOCHUKOV *et al.*, 2006). Como os canais TRP atuam como integradores moleculares de vários sistemas de sinalização, existe uma correlação entre os níveis de expressão dos canais TRP ou de mutações em muitos dos genes que codificam os canais TRP e processos fisiopatológicos, tal como distúrbios renais, esqueléticos, neurológicos, dolorosos dentre outros (MORAN *et al.*, 2011; CHUN *et al.*, 2014).

A estrutura dos canais da família TRPV possui terminais intracelulares N e C, seis hélices de extensão de membrana (S1-S6) e um loop para formação de poros, conforme ilustrado na Figura 5 (PLANT; STROTMANN, 2007; MORAN *et al.*, 2011).

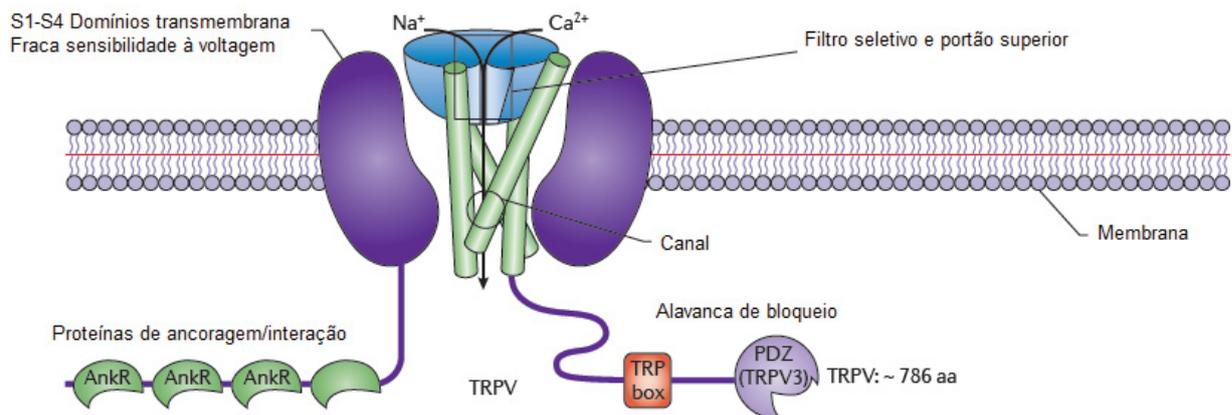


Figura 5: Estrutura dos Canais TRPV.
FONTE: Adaptado de (MORAN *et al.*, 2011).

Com base na estrutura e função, a família TRPV compreende TRPV1 a TRPV6. TRPV1-4 são cátions termossensíveis, polimodais e não seletivos, sendo 5 a 10 vezes mais permeáveis para o Ca⁺² do que para Na⁺ e TRPV5 e TRPV6 são os únicos altamente seletivos e regulados pelo Ca⁺² (KOCHUKOV *et al.*, 2006; EVERAERTS *et al.*, 2010).

1.4 RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSITÓRIO VANILÓIDE TIPO 4 (TRPV4)

O gene TRPV4 codifica a proteína do canal iônico TRPV4, que foi inicialmente referida como "canal ativado osmoticamente relacionado ao receptor de vaniloide" e canal "receptor de potencial transitório semelhante ao OSM9, membro 4". Realmente, aumento na osmolaridade reduz a atividade de TRPV4 enquanto redução (soluções hipotônicas) leva a um aumento da sua atividade. Portanto, TRPV4 é espontaneamente ativo nas condições fisiológicas, podendo sofrer alterações quando ocorre mudança de até 1% na osmolaridade (PLANT; STROTMANN, 2007). Porém, apesar de ter sido descrito nos anos 2000 e caracterizado como um canal regulado por volume devido a sensibilidade osmótica e a regulação do volume da célula, em 2002, verificou-se que esses canais assim descritos tratavam-se dos mesmos canais ativados por uma gama diversificada de estímulos físicos e químicos (WHITE *et al.*, 2016; YU *et al.*, 2019).

O receptor TRPV4 pode ser ativado por diferentes estímulos físicos e químicos, incluindo temperaturas maiores que 27°C, força mecânica e substâncias endógenas, como AA e seus metabólitos derivados do citocromo P450, endocanabinoides (anandamida e 2-araquidonilglicerol), bem como derivados sintéticos do éster de forbol (YU *et al.*, 2019). As variações na tonicidade do fluido extracelular, por exemplo, alteram a tensão na membrana celular, causando deformação mecânica da membrana e dessa forma, resultam na ativação do TRPV4 (WHITE *et al.*, 2016).

O TRPV4, é um tetrâmero e possui uma estrutura semelhante à dos canais de potássio dependente de voltagem (KV), com cada monômero possuindo seis domínios transmembranas (TM), um poro loop entre TM5 e TM6 e regiões terminais N e C intracelulares (Figura 6). Semelhante a outros TRPVs, possui seis repetições de anquirina (ANK) no terminal N, essenciais para o funcionamento regular dos canais iônicos e das interações proteína-proteína (BARATCHI *et al.*, 2013; YU *et al.*, 2019).

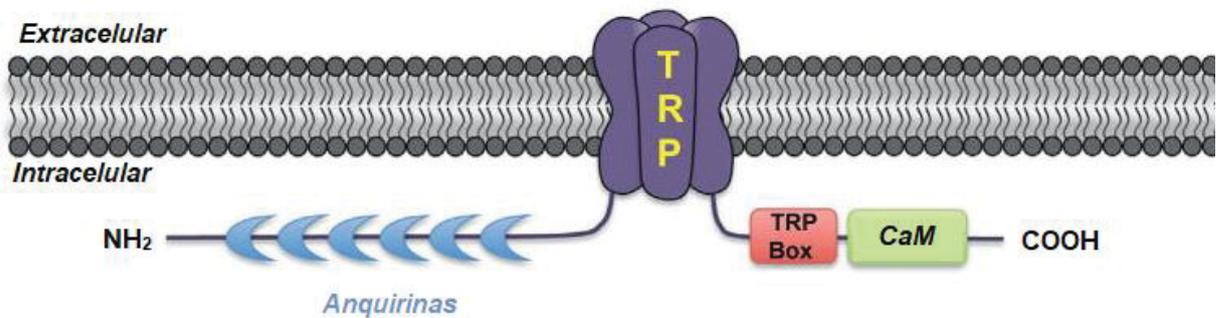


Figura 6: Estrutura molecular dos canais TRPV4

FONTE: Adaptado de (MICKLE *et al.*, 2015).

Assim como no TRPV1 e TRPV3, o domínio de repetição de ANK também encontrado no TRPV4, possui um local de ligação para trifosfato de adenosina (ATP) e calmodulina (CaM), bem como para outros ligantes. O ATP e a CaM funcionam através desse local de ligação de vários ligantes para moldar os diferentes perfis de sensibilidade e adaptação desses canais. O TRPV4 também pode tornar-se sensibilizado através das vias PLC (fosfolipase C) e PKA (proteína quinase A), resultando na diminuição do limiar de ativação. Interações com outros canais iônicos, como TRPC1 e TRPC6, também podem alterar a sensibilização de TRPV4 (PLANT; STROTMANN, 2007; WHITE *et al.*, 2016).

No terminal N, existe um sítio de ligação para o fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2), um fosfolípido encontrado nas membranas celulares e considerado uma molécula importante para o funcionamento do TRPV4. PIP2 promove uma ligação e reorganização das caudas N e C citosólicas do TRPV4 para permitir que estímulos hipotônicos e de calor ativem o canal. Um exemplo é o inchaço celular, em que após uma alteração hipotônica, a fosfolipase A2 (PLA2) produz o AA, que pode ativar o TRPV4. Posteriormente, o AA é usado como substrato pela epoxigenase do citocromo P450 para produzir ácidos epoxieicosatrienoicos (EET), que também ativam o TRPV4, como representado na Figura 7 (EVERAERTS *et al.*, 2010; WHITE *et al.*, 2016). A mesma via responsável pela resposta de ativação do TRPV4 aos estímulos hipotônicos ocorre para os endocanabinoides como anandamida, sendo hidrolisada em AA, que ativa o canal como descrito acima (WATANABE *et al.*, 2003).

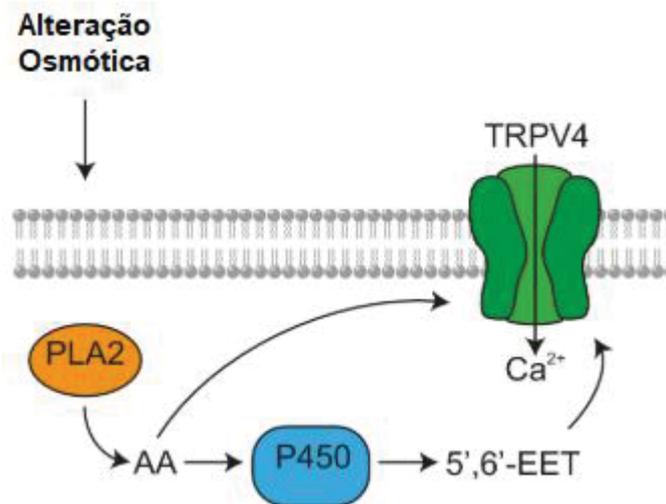


Figura 7: Via de sinalização dos canais TRPV4 após estresse hipotônico
 FONTE: Adaptado de (SERVIN-VENCES *et al.*, 2017).

Os estímulos de hipotonicidade e calor também podem promover a ativação extracelular de 1, 4, 5 fosfatidilinositol trisfosfato (IP3) mediada pelo ATP para sensibilizar o TRPV4. Apesar do IP3 não ser um agonista do TRPV4, verificou-se que atua promovendo uma sensibilização do TRPV4 para EET, através da ligação do IP3 a um domínio do terminal C do TRPV4 (YU *et al.*, 2019).

A atividade do TRPV4 é fortemente regulada pelo Ca^{+2} , sendo que a atividade espontânea do TRPV4 é fortemente reduzida na ausência de Ca^{+2} extracelular. Além disso, a ativação do TRPV4 pelos ésteres de forbol ou por soluções hipotônicas é mais lenta na ausência de Ca^{+2} . As mutações no local de ligação do Ca^{+2} a CaM impedem a ligação e diminuem a taxa de ativação do canal (PLANT; STROTMANN, 2007).

O TRPV4 integra múltiplos estímulos, transmitindo sinais de cálcio e induzindo uma série de respostas ao estresse, como promoção da liberação de óxido nítrico, prostaciclina e ácido enoico derivado do endotélio no sistema endotelial vascular, relaxamento dos músculos lisos vasculares, produção de fatores inflamatórios (por exemplo, interleucina-6 (IL-6) no tecido pulmonar e desenvolvimento de respostas inflamatórias (YU *et al.*, 2019).

O TRPV4 foi isolado pela primeira vez em rim de ratos (LIEDTKE *et al.*, 2000) e atualmente, sabe-se que é amplamente expresso no sistema nervoso (JIE *et al.*, 2015), sistema imunológico (BALAKRISHNA *et al.*, 2014), olho (RYSKAMP *et al.*, 2016), ouvido (KARASAWA *et al.*, 2008), sistema cardiovascular (RANDHAWA;

JAGGI, 2015), sistema respiratório (GOLDENBERG *et al.*, 2015), sistema urinário (THORNELOE *et al.*, 2008) e sistema digestivo (HOLZER, 2011), sendo expresso de modo relevante nas células epiteliais, musculares lisas e endoteliais em diferentes tecidos, incluindo coração, pele e intestino (GARCIA-ELIAS *et al.*, 2014).

O TRPV4 mantém a homeostase da pressão osmótica pela ativação rápida e eficiente do influxo de cálcio mantendo a morfologia celular. Quando o tecido cutâneo é fisicamente e quimicamente estimulado, a abertura do TRPV4 promove respostas mecânicas de fibroblastos subcutâneos e células endoteliais, manifestadas como vasodilatação e relaxamento muscular esquelético (SOKABE *et al.*, 2010). E por estar envolvido na homeostase de diferentes tecidos e sistemas é que possíveis alterações envolvendo os canais TRPV4 implicam em diferentes tipos de doenças (PLANT; STROTMANN, 2007; WHITE *et al.*, 2016; YU *et al.*, 2019).

Camundongos com deleção gênica para o TRPV4 e vários compostos farmacológicos sintéticos que têm como alvo seletivo o TRPV4 permitiram um avanço nas pesquisas farmacológicas acerca das atividades desse receptor. Atualmente já existem duas linhagens de camundongos com deleção gênica para TRPV4, geradas em C57BL/6 por diferentes métodos. Suzuki e colaboradores (2003) geraram uma linhagem com deleção gênica para o TRPV4 usando a mutagênese de inserção de cassetes do exon 5 enquanto Liedtke e colaboradores (2003) usaram a excisão do exon 12. Camundongos com deleção gênica para TRPV4 não apresentam anormalidades aparentes, possuindo tamanho, aparência, crescimento e temperatura normais (SUZUKI *et al.*, 2003). Apesar da deleção do TRPV4 prejudicar muitos processos fisiológicos já citados acima, muitas vezes as respostas não são completamente abolidas, sugerindo redundância nos mecanismos fisiológicos e a existência de mecanismos de compensação na ausência de TRPV4 durante o desenvolvimento. A detecção de estímulos mecânicos inócuos em camundongos TRPV4 tipo selvagem e nocaute não foi diferente, porém os nocautes apresentaram respostas reduzidas a estímulos nocivos de pressão (ALESSANDRI-HABER *et al.*, 2006). De maneira semelhante, os camundongos do tipo selvagem e nocaute apresentaram regulação equivalente da osmolaridade em condições normais (LIEDTKE; FRIEDMAN, 2003).

Além dos camundongos com deleção gênica para o TRPV4, foram descobertos vários compostos sintéticos que tem como alvo o TRPV4, tais como os agonistas sintéticos: éster de forbol 4- α -forbol 12,13-didecanoato (4 α PDD) e o mais potente

GSK1016790A (THORNELOE *et al.*, 2008; KLAUSEN *et al.*, 2009). O desenvolvimento de agonistas de TRPV4 como possíveis ferramentas terapêuticas ficou prejudicado em relação aos antagonistas devido à toxicidade causada pela ativação sistêmica de TRPV4. Recentemente, um estudo em modelo animal utilizando um agonista de TRPV4, denominado de 36HCl, mostrou-se seguro e eficaz no tratamento de osteoartrite e pode representar uma novidade para a pesquisa nessa área (ATOBE, 2019).

Os primeiros antagonistas utilizados não eram seletivos e exibiam diferentes efeitos, entretanto a nova geração de antagonistas farmacológicos possui alta seletividade e especificidade, tais como o RN1734, HC-067047 e GSK2193874. Dessa forma, a combinação do uso de animais com deleção gênica para o receptor TRPV4 juntamente com o uso de antagonistas em vários estudos tem reforçado o potencial terapêutico do TRPV4 em edema, dor, distúrbios gastrointestinais, doenças pulmonares, dentre outros (DARBY *et al.*, 2016; GRACE *et al.*, 2017; LAWHORN *et al.*, 2020). Em 2019 foi publicado o primeiro estudo de fase clínica em humanos para GSK2798745 que avaliou principalmente a segurança, tolerabilidade e farmacocinética de doses orais repetidas de GSK2798745 administradas a indivíduos saudáveis e pacientes com insuficiência cardíaca estável. O GSK2798745 foi bem tolerado em ambos os grupos de pacientes e os dados obtidos sugerem a possibilidade de avaliação do medicamento em estudos clínicos de longo prazo inclusive para outras indicações (GOYAL *et al.*, 2019).

Na pele, o TRPV4 está envolvido na homeostase da barreira epidérmica. Estudos demonstram que a ativação térmica ou por meios farmacológicos, do TRPV4, promove redução do tempo de regeneração da barreira epidérmica em camundongos (DENDA *et al.*, 2007). Em trabalhos publicados por Sokabe e colaboradores (SOKABE *et al.*, 2010), verificou-se que o TRPV4 permite o influxo de íons Ca^{+2} do espaço extracelular na temperatura fisiológica corporal, promovendo a organização das fibras de actina e a formação de junções, aumentando assim a integridade da barreira (SOKABE *et al.*, 2010; SOKABE; TOMINAGA, 2010). Além disso, em cultivo celular de queratinócitos epidérmicos humanos e em culturas de pele de doadores humanos, verificou-se que o TRPV4 é expresso com certas proteínas juncionais (β -catenina e E-caderina) que também são essenciais para a barreira epidérmica adequada (KIDA *et al.*, 2012).

Embora TRPV4 seja expresso em queratinócitos, macrófagos, linfócitos, mastócitos, células de Langerhans e outras células imunes dérmicas, existem poucos estudos relatando a importância desse receptor em doenças de pele. No entanto, devido às propriedades inerentes ao TRPV4 em resposta a tensão mecânica e mudanças de pressão osmótica, propõe-se que possa desempenhar um papel na patogênese de doenças de pele com distúrbios da barreira cutânea, como dermatite de contato, psoríase e dermatite atópica (VALDES-RODRIGUEZ *et al.*, 2013).

De fato, estudos demonstraram aumento de expressão de TRPV4 em macrófagos, linfócitos, mastócitos e outras células imunes dérmicas em pacientes com rosácea. Devido a essas descobertas, acredita-se que o TRPV4 também pode contribuir à vasodilatação e resposta inflamatória observada em rosácea (SULK *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2017; MASCARENHAS *et al.*, 2017).

Assim como o TRPV1 e TRPA1, o receptor TRPV4 também tem um importante papel em eventos nociceptivos e também parece mediar sensações de prurido (LAING; DHAKA, 2016). Um estudo de SAKAI e colaboradores demonstrou um aumento do RNAm para o receptor TRPV4 no gânglio da raiz dorsal (DRG) de camundongos com lesões psoriáticas induzidas por IMQ, com expressão máxima no segundo dia. Em contraste, o mRNA de TRPV4 diminuiu significativamente ao longo do tempo na pele de camundongos tratados com IMQ, confirmando que o mRNA de TRPV4 é regulado negativamente na pele no modelo de psoríase induzida por IMQ. A expressão do gene TRPV4 aumentada transitoriamente nas células DRG foi paralela ao curso do tempo da expressão da serotonina na pele, podendo indicar que níveis elevados de produção gênica de TRPV4 em células DRG podem estar relacionados ao aumento da expressão de serotonina (SAKAI *et al.*, 2016). Apesar do forte indício que o prurido induzido por serotonina está ligado ao TRPV4 (AKIYAMA *et al.*, 2016), acredita-se que a serotonina não atue como principal mediador do prurido na fase aguda da psoríase (AKIYAMA *et al.*, 2010; MORITA *et al.*, 2015).

Existem poucos estudos sobre o papel dos canais TRP no prurido psoriático. O banco de dados RNA-seq indica uma regulação negativa do mRNA de TRPV4 na pele psoriática (LI *et al.*, 2014). Outro estudo aponta também o envolvimento do receptor TRPV4 no prurido induzido por substâncias histaminérgicas (SHIBASAKI, 2020). De fato, Shibasaki e colaboradores (2020) também verificaram que em resposta a moléculas histaminérgicas, que causam prurido na pele, os canais TRPV4 nos queratinócitos promovem influxo de Ca^{+2} . Outros estudos também reforçam o

envolvimento do TRPV4 na transmissão do prurido na pele (KITAKA; TOMINAGA, 2017; HIDDING *et al.*, 2019) que é um dos sintomas observados em pacientes com psoríase e outros problemas de pele. Com essa nova visão, o TRPV4 passou a ser considerado um pruriceptor importante que parece atuar nos queratinócitos da pele. Interessantemente, em estudos recentes foram relatados que os receptores TRPA1 e TRPV1, que são co-expressos com o TRPV4 em neurônios sensoriais (KEMENY *et al.*, 2018) apresentam um papel modulatório no modelo de psoríase induzida por IMQ em camundongos. Nesses estudos foi possível observar uma piora das lesões psoriáticas bem como do prurido tanto em animais tratados com antagonistas bem como em animais nocautes para o receptor TRPA1. Por outro lado, as lesões psoriáticas bem como o prurido foram diminuídos quando a função do TRPV1 foi inibida por antagonistas ou em animais com deleção gênica para esse receptor. Então, TRPA1 mas não TRPV1 teria efeito protetor na dermatite psoriática, induzida por imiquimode em camundongos, pela ativação dele tanto em células neuronais como não neuronais (KEMENY *et al.*, 2018). Por outro lado, pouco se sabe sobre o papel modulatório do TRPV4 nas lesões psoriáticas.

2 HIPÓTESE

Estudos recentes demonstram um aumento na expressão do receptor TRPV4 na pele de camundongos com lesões psoriáticas induzidas por IMQ. No entanto, o papel modulatório do TRPV4 nas lesões psoriáticas, no prurido ou comportamento depressivo ainda não foi elucidado. Nesse sentido, o presente trabalho tem como hipótese que os receptores TRPV4 estão envolvidos nas lesões psoriáticas induzidas por IMQ bem como outros sintomas como prurido e o bem-estar do animal.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a participação do receptor TRPV4 no processo inflamatório crônico de pele, utilizando o modelo de psoríase induzida por imiquimode (IMQ) em camundongos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a influência da deleção gênica do receptor TRPV4 e do tratamento com antagonista desse receptor sobre os sinais indicadores de psoríase através da avaliação da Área de Psoríase e o Índice de Gravidade (PASI- Psoriasis Area Severity Index) e avaliação do prurido;
- Analisar a influência da deleção gênica do receptor TRPV4 e do tratamento com antagonista desse receptor no infiltrado de células inflamatórias, através de análise histológica;
- Avaliar o efeito da deleção gênica do receptor TRPV4 e do tratamento com antagonista desse receptor sobre a proliferação de queratinócitos, através de análise histológica e de imunohistoquímica;
- Verificar a influência da deleção gênica do receptor TRPV4 e do tratamento com antagonista desse receptor sobre o comportamento de bem-estar dos animais no modelo de psoríase induzido por IMQ.
- Avaliar o efeito da deleção gênica e do tratamento com antagonista de TRPV4 sobre a hiperalgesia mecânica em animais submetidos ao protocolo de indução de psoríase através de IMQ.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O protocolo descrito na tabela 1 refere-se ao tratamento com o IMQ em camundongos com ou sem a deleção gênica para o receptor TRPV4. Na tabela 2, constam os grupos de tratamento utilizados nesse protocolo experimental.

PROTOCOLO DE INDUÇÃO DE PSORÍASE ATRAVÉS DA ADMINISTRAÇÃO DE IMQ EM ANIMAIS TRPV4 ^{+/+} E TRPV4 ^{-/-}							
Dias	1	2	3	4	5	6	7
	IMQ PASI	IMQ PASI	IMQ PASI	IMQ PASI	IMQ PASI	IMQ PASI	PASI <i>Hiperalgesia Mecânica</i> <i>Nest Building</i> <i>Prurido</i> Coleta das amostras de pele do dorso
				<i>Hiperalgesia Mecânica</i> <i>Nest Building</i> <i>Prurido</i>			

Tabela 1: Protocolo utilizado nos camundongos com ou sem deleção gênica para o receptor TRPV4. IMQ = Imiquimode (62,5 mg). Avaliação Diária PASI (Eritema, Escarificação e Descamação) e fotografia dos animais.
FONTE: O AUTOR (2020).

GRUPOS	TRPV4 ^{+/+} - Veículo	TRPV4 ^{+/+} - IMQ	TRPV4 ^{-/-} - IMQ
IMQ (62,5mg – tópico)		X	X
Veículo (Creme não-iônico Tópico)	X		

Tabela 2: Grupos de tratamento do protocolo utilizado nos camundongos com ou sem deleção gênica para o receptor TRPV4. IMQ = Imiquimode (62,5 mg). O grupo Veículo recebe apenas o creme não-iônico por via tópica no dorso.
FONTE: O AUTOR (2020).

Na tabela 3, encontra-se o protocolo utilizado nos animais C57BL/6 que foram tratados com o antagonista do receptor TRPV4 ou com o seu veículo e submetidos ao protocolo de indução de psoríase com IMQ. Os grupos de tratamento se encontram na tabela 4.

PROTOCOLO DE INDUÇÃO DE PSORÍASE ATRAVÉS DA ADMINISTRAÇÃO DE IMQ EM ANIMAIS C57/BL6							
Dias	1	2	3	4	5	6	7
	IMQ	IMQ	IMQ	IMQ	IMQ	IMQ	PASI
	PASI	PASI	PASI	PASI	PASI	PASI	<i>Hiperalgesia Mecânica</i>
	TTO 2x ao dia Gavagem	TTO 2x ao dia Gavagem	TTO 2x ao dia Gavagem	TTO 2x ao dia Gavagem	TTO 2x ao dia Gavagem	TTO 2x ao dia Gavagem	<i>Nest Building</i>
				<i>Nest Building</i>			<i>Prurido</i>
							Coleta das amostras de pele do dorso

Tabela 3: Protocolo utilizado nos camundongos C57BL/6 tratados com o antagonista do receptor TRPV4. IMQ = Imiquimode (62,5 mg). TTO = Tratamento com o veículo ou com o antagonista TRPV4 (HC-067047, 10 mg/Kg).
 FONTE: O AUTOR (2020).

GRUPOS	VEÍCULO (V)	HC	V+IMQ	HC+IMQ
	IMQ (62,5mg – tópico)			X
Creme não-iônico (tópico)	X			
HC-067047, 10 mg/Kg (Via oral, Gavagem, 2x/dia)		X		X
Veículo DMSO 8%+TWEEN 4% (Via oral, Gavagem, 2x/dia)	X		X	

Tabela 4: Grupos de tratamento do protocolo utilizado nos camundongos C57BL/6 tratados com o antagonista do receptor TRPV4.
 FONTE: O AUTOR (2020).

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 (20-25 g) fornecidos pelo CIEnP – Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos em Florianópolis e camundongos com deleção gênica para o receptor TRPV4 (*Trpv4*^{-/-}), 25-30 gerados de camundongos C57BL/6 heterozigotos (LI PUMA et al., 2019) fornecidos pelo Grupo do professor Peirangelo Geppeti, Universidade de Florença, Itália. Os animais foram mantidos em condições de temperatura controlada (23 ± 2 °C), respeitando uma fase claro/escuro de 12 horas e com livre acesso a água e ração. Os animais foram

mantidos na sala de experimento durante pelo menos uma hora antes da realização dos testes, para adaptação.

Todos os experimentos realizados seguiram a recomendação das diretrizes ARRIVE – do inglês, *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments* (KILKENNY *et al.*, 2011), assim como do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Esse projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), sob número de registro 1234 e pela Comissão de ética da Universidade de Florença, Itália.

4.3 DROGAS E REAGENTES

Para a execução dos protocolos experimentais foram utilizados IMQ (Modik[®], GERMED), HC-067047 (Sigma-Aldrich Co, 43 USA), Dimetilsulfóxido (DMSO), Tween 20, etanol absoluto, peróxido de hidrogênio, hematoxilina, eosina, xilol, glicina, fosfato de sódio, cloreto férrico (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). Acetona, fenol, formaldeído, ácido acético glacial, Entellan e parafina (Merck Biosciences, Alemanha). Albumina de soro bovino (BSA), gelatina, bálsamo do Canadá (Sigma-Aldrich Co., 43 USA). Cetamina e xilazina (Syntec, Cotia, Brasil). Anticorpo policlonal anti-PCNA (sc-9857), anticorpo secundário conjugado à peroxidase (HRP – horseradish peroxidase, sc-2020) (Santa Cruz Biotechnology[®], EUA), kit substrato diaminobenzidina (DAB) para peroxidase (BD Biosciences harmigen[®], EUA).

4.4 MODELO ANIMAL DE PSORÍASE

As lesões psoriáticas foram induzidas de acordo com metodologia desenvolvida por Van Der Fits e colaboradores (VAN DER FITS *et al.*, 2009) com algumas modificações (Ver tabela 1 da seção 4.1) através da aplicação de IMQ, um imunomodulador disponível comercialmente para o tratamento de infecções por papiloma vírus. A aplicação tópica de 62,5 mg de IMQ (creme) no dorso dos animais foi realizada diariamente durante 6 dias consecutivos por via tópica. A evolução do processo inflamatório foi avaliada diariamente. No sétimo dia os animais foram eutanasiados e biópsias do dorso foram coletadas para análises.

Para avaliar o efeito do antagonista do receptor TRPV4 na psoríase induzida por IMQ os animais foram tratados conforme as Tabelas 3 e 4 da seção 4.1.

4.5 AVALIAÇÃO DA SEVERIDADE DA INFLAMAÇÃO CUTÂNEA

A fim de avaliar a intensidade do processo inflamatório estabelecido, foi utilizado um sistema de escore baseado no índice clínico PASI. Esta avaliação foi realizada durante os sete dias de tratamento com IMQ. Nesse sistema os parâmetros eritema, descamação e escarificação receberam um escore de 0 a 4 de acordo com a severidade desse item, em que 0 = ausente; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = grave e 4 = muito grave. Eritema, descamação e escarificação foram avaliados visualmente e o escore cumulativo foi utilizado como escore de severidade da inflamação (0-12).

4.6 AVALIAÇÃO DA HIPERALGESIA MECÂNICA

O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado de acordo com o método descrito por (CHAPLAN *et al.*, 1994). Através da superfície de uma tela de metal, uma série de filamentos de Von Frey (Semmes-Weinstein Monofilaments, Stoelting, EUA) calibrados para produzir forças de 0,02 a 4 g foram aplicados perpendicularmente em ordem crescente ou decrescente no meio da pata traseira dos animais por um período máximo de 8 s, ou até o animal apresentar uma resposta nociceptiva de retirada da pata, seguida de lambida e/ou chacoalhar da mesma. O teste teve início com o filamento de 0,4 g. Na ausência de resposta, filamentos de força maior foram consecutivamente aplicados até que ocorresse a resposta de retirada da pata. Caso o filamento de 4 g promovesse uma resposta, após um intervalo de 2 minutos, filamentos de força menor eram aplicados até que ocorresse novamente a resposta de retirada da pata. Os dados coletados utilizando este método denominado *up-and-down*, proposto por (DIXON, 1980), foram utilizados para calcular 50% do limiar de retirada da pata (em g). A redução no limiar de retirada da pata do camundongo caracterizou a hipernocicepção mecânica e foi avaliada nos dias 4 e 7.

4.7 AVALIAÇÃO DO PRURIDO

Para avaliação do prurido os animais foram ambientados em caixas de acrílico com o fundo metálico vazado por aproximadamente 30 minutos. Em seguida, o movimento de coçar ou morder o dorso (região em que foi aplicado o IMQ) espontaneamente foi cronometrado com o auxílio de um cronômetro por um período de 15 minutos e caracterizado como prurido. O prurido foi avaliado no 4º e no 7º dia.

4.8 MODELO DE BEM ESTAR DO ANIMAL (*NEST BUILDING*)

Trata-se de um teste simples, barato e de fácil execução que, juntamente com outros testes de comportamento, é sensível para identificar fenótipos comportamentais como a qualidade de vida ou de bem-estar do animal, visto que para pequenos roedores, os ninhos são importantes na conservação de calor, bem como na reprodução e abrigo (DEACON, 2006). Os camundongos foram colocados em gaiolas individuais e foi ofertado um algodão prensado de aproximadamente 8 cm² para cada um deles na fase escura, sendo avaliada a construção ou não do ninho na manhã seguinte. Os ninhos foram avaliados em um escore de 1 a 5 em que, 1= > 90% intacto, 2= 50 – 90% do algodão intacto 3= Algodão desfiado, porém sem ninho identificável, menos de 50% do algodão permanece intacto, 4 = 50-90% do material foi desfiado 5 = Formação de ninho visível, em que >90% do material é desfiado de forma plana com paredes maiores que a altura corporal do animal, conforme Figura 8. Para o experimento do *Nest build*, os animais foram deixados com o algodão prensado nos dias 3 e 6 a noite e os ninhos foram avaliados pela manhã dos dias 4 e 7.



Figura 8: Demonstração da quantificação do escore do bem estar do animal (*Nest building*)
 FONTE: Adaptado de (DEACON, 2006)

4.9 ANÁLISE DE ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS

As amostras do tecido do dorso dos animais coletadas no sétimo dia foram fixadas em solução ALFAC (85 mL de álcool 80%, 10 mL de formaldeído 40% e 5 mL de ácido acético glacial) num período de 16 horas, sendo em seguida conservadas em álcool 70% até início do processo de desidratação. Os tecidos foram posteriormente desidratados, emblocados em parafina, seccionados em cortes de 5 μ m em um micrótomo e coradas com hematoxilina e eosina. A infiltração de leucócitos, edema, espessura da epiderme, distribuição das camadas da epiderme e a presença de células nucleadas na epiderme foram avaliadas em áreas representativas com aumento de 200x e/ou 400x. A quantificação dos leucócitos presentes na derme e epiderme foi realizada através da contagem dessas células por campo com aumento de 400x, sendo analisados 5 campos de 3 cortes histológicos distintos. Estas análises foram realizadas com auxílio do software *ImageJ* (Image Processing and Analysis in Java, Bethesda, Maryland, USA).

4.10 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PCNA ATRAVÉS DE IMUNOHISTOQUÍMICA

Através da análise imunohistoquímica é possível verificar a expressão de marcadores celulares como marcadores de proliferação e diferenciação celular, angiogênese entre outros. Nesse experimento foi avaliada a expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA - marcador da atividade proliferativa). Para verificar a expressão desse marcador, amostras do dorso de animais submetidas ao protocolo descrito acima foram emblocadas em parafina (como descrito na análise histológica) e seccionadas em cortes de 5 μ m em um micrótomo. Estes cortes histológicos foram montados em lâminas gelatinizadas. As lâminas foram submetidas a banhos de xilol para desparafinização e em seguida hidratadas com banhos sucessivos em concentrações de álcool decrescentes. As lâminas foram então submetidas a um banho de glicina 0,1 M para o bloqueio dos radicais aldeídos, enquanto a peroxidase endógena e os sítios inespecíficos também foram bloqueados com banhos de H₂O₂ 3% em metanol e PBS/BSA 1%, respectivamente. Os cortes foram então incubados com o anticorpo primário anti-PCNA (1:50) durante duas horas

a temperatura ambiente em câmara úmida. Após banho com PBS, as lâminas foram novamente incubadas, desta vez com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:50) durante uma hora a temperatura ambiente e em câmara úmida. As lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com kit contendo o cromógeno DAB durante 15 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas, contracoradas com hematoxilina e os cortes foram desidratados com banhos sucessivos de álcool em concentrações crescentes. A presença de células positivas para o marcador foi quantificada em áreas representativas com aumento de 400x em microscópio óptico. A quantificação foi realizada através da contagem do número de células positivas por campo, sendo analisados 5 campos de 3 cortes histológicos distintos. Esta análise foi realizada com auxílio do software *ImageJ* (Image Processing and Analysis in Java, Bethesda, Maryland, USA).

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), que foram representados como a média aritmética acompanhada de seus respectivos intervalos de confiança de 95%. Os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Bonferroni. Valores de P menores ou iguais a 0,05 ($P \leq 0,05$) foram considerados como indicativos de significância. Os cálculos foram realizados utilizando o Software estatístico GraphPad Prism version 6.00, San Diego Califórnia, EUA.

5 RESULTADOS

5.1 EFEITO DA DELEÇÃO GÊNICA DO RECEPTOR TRPV4 NAS LESÕES PSORIÁTICAS INDUZIDAS POR IMQ

Os resultados apresentados nas Figuras 9 e 10 demonstram que camundongos tratados com IMQ apresentaram lesões psoriáticas já no 4º dia de tratamento. O grupo TRPV4^{+/+} que recebeu IMQ no dorso (TRPV4^{+/+} IMQ) apresentou um aumento no escore em todos os critérios avaliados, sendo um aumento no eritema, escarificação, e na descamação, cumulando um escore de $4,4 \pm 0,75$ do PASI, expressivamente maior quando comparado ao grupo TRPV4^{+/+} que foi tratado no dorso com o creme não iônico (TRPV4^{+/+} veículo) e teve um escore de 0. Os resultados demonstram também que, os animais com deleção gênica para o receptor TRPV4 tratados com IMQ (TRPV4^{-/-} IMQ) não apresentaram melhoras das lesões psoriáticas, sendo essas lesões muito semelhantes aos animais do grupo TRPV4^{+/+} tratados com IMQ. Os animais TRPV4^{-/-} tratados com IMQ tiveram um escore do PASI de $5,8 \pm 0,37$ (Figuras 9 e 10).

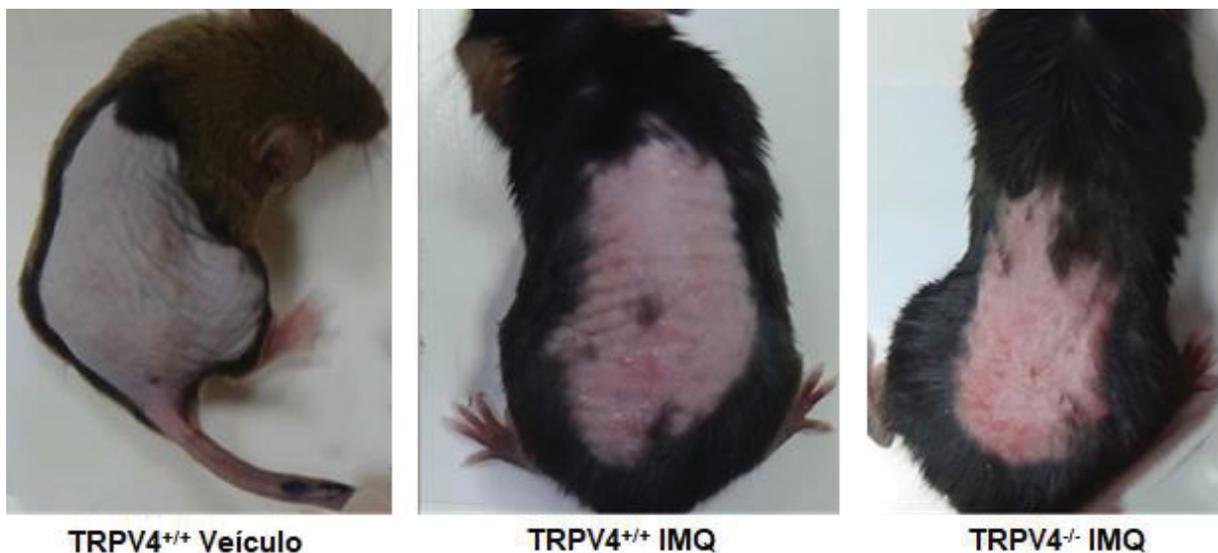


Figura 9: Fotos representativas das lesões psoriáticas induzidas pelo IMQ, no 4º dia de tratamento, em animais TRPV4^{+/+} e TRPV4^{-/-}. Os animais do grupo TRPV4^{+/+} Veículo receberam diariamente a aplicação tópica de creme não-iônico, enquanto os grupos TRPV4^{+/+} IMQ e TRPV4^{-/-} IMQ receberam a aplicação tópica de 62,5mg de IMQ no dorso.

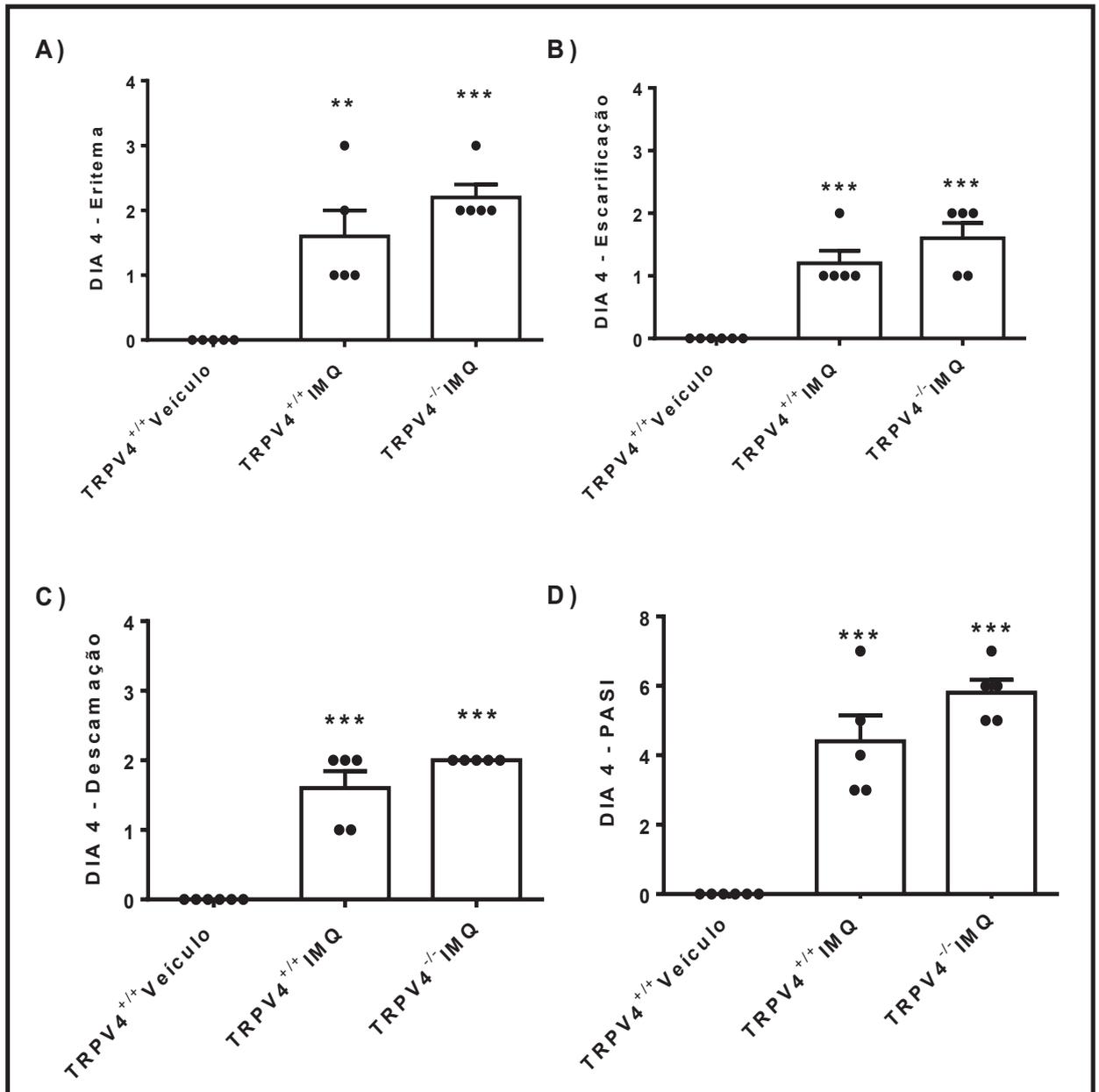


Figura 10: Efeito da deleção gênica do receptor TRPV4 na severidade das lesões psoriáticas induzidas pela aplicação de IMQ no 4º dia. Os seguintes parâmetros foram avaliados no 4º dia do protocolo experimental: Eritema (A), Escarificação (B), Descamação (C) e PASI (D). Os animais do grupo TRPV4^{+/+} Veículo receberam diariamente a aplicação tópica de creme não-iônico, enquanto os grupos TRPV4^{+/+} IMQ e TRPV4^{-/-} IMQ receberam a aplicação tópica de 62,5mg de IMQ no dorso. Os gráficos apresentam a média ± EPM. Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo TRPV4^{+/+} Veículo, **P<0,01; ***P< 0,001, e analisados por ANOVA de uma via seguida por post-hoc de Bonferroni. (n= 5-6).

As Figuras 11 e 12 demonstram os resultados da avaliação dos parâmetros realizada no 7ª dia do protocolo experimental. É possível observar que, novamente, houve um aumento do escore do PASI dos grupos TRPV4^{+/+} e TRPV4^{-/-} tratados com IMQ ($2,33 \pm 0,8$ e $3,33 \pm 0,42$, respectivamente) quando comparados ao grupo

TRPV4^{+/+} e que recebeu o creme não-iônico no dorso (TRPV4^{+/+} Veículo) com um escore de $0,5 \pm 0,5$.

Conforme observado, não houve diferença entre as lesões psoriáticas dos animais TRPV4^{-/-} e dos animais do grupo TRPV4^{+/+} e que receberam IMQ no dorso.

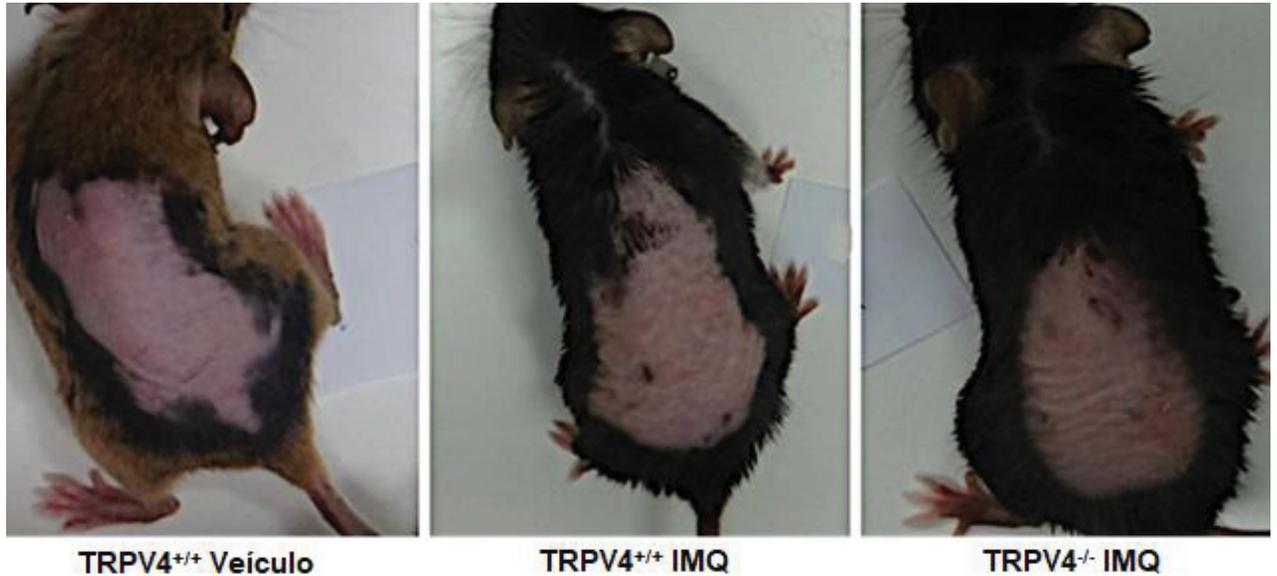


Figura 11: Fotos representativas das lesões psoriáticas induzidas pelo IMQ, no 7º dia de tratamento, em animais TRPV4^{+/+} e TRPV4^{-/-}. Os animais do grupo TRPV4^{+/+} Veículo receberam diariamente a aplicação tópica de creme não-iônico, enquanto os grupos TRPV4^{+/+} IMQ e TRPV4^{-/-}IMQ receberam a aplicação tópica de 62,5mg de IMQ no dorso.

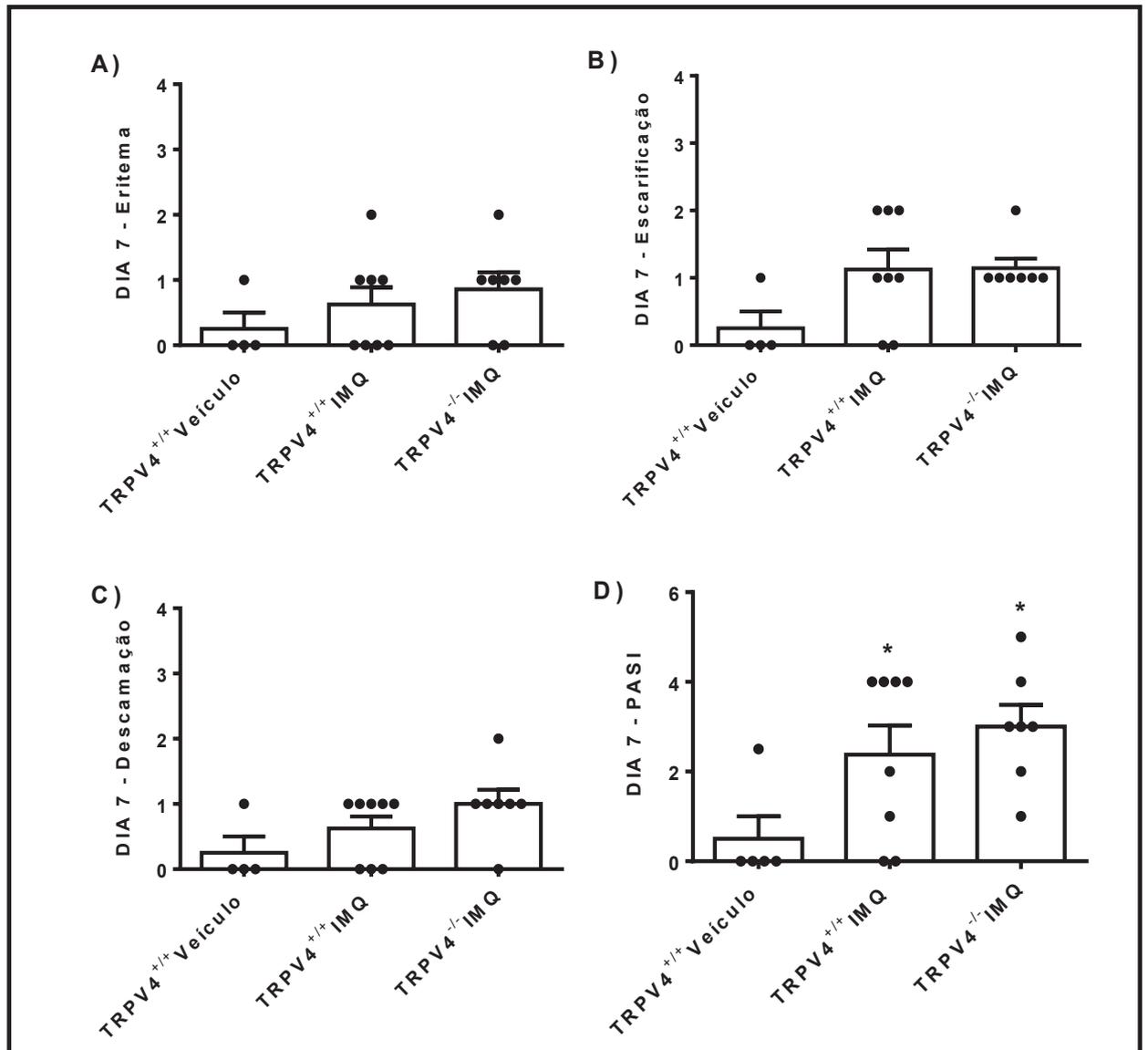


Figura 12: Efeito da deleção gênica do receptor TRPV4 na severidade das lesões induzidas pela aplicação de IMQ no 7º dia. Os seguintes parâmetros foram avaliados no 7º dia de protocolo experimental: Eritema (A), Escarificação (B), Descamação (C) e PASI (D). Os animais do grupo TRPV4^{+/+} Veículo receberam diariamente a aplicação tópica de creme não-iônico, enquanto os grupos TRPV4^{+/+} IMQ e TRPV4^{-/-} IMQ receberam a aplicação tópica de 62,5mg de IMQ no dorso. Os gráficos apresentam a média ± EPM. Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo TRPV4^{+/+} Veículo, *P<0,05 e analisados por ANOVA de uma via seguida por post-hoc de Bonferroni (n= 4-8).

5.2 EFEITO DA DELEÇÃO GÊNICA DE TRPV4 NA ESTRUTURA DA PELE DOS ANIMAIS AVALIADO ATRAVÉS DA ANÁLISE HISTOLÓGICA

Além da avaliação dos parâmetros visuais, a confirmação das alterações teciduais promovidas pelo IMQ, pode ser feita através da análise histológica. Na

Figura 13, é possível verificar que o grupo TRPV4^{+/+} e que foi tratado com IMQ apresentou aumento da espessura da epiderme assim como, aumento do número de células na derme quando comparado ao grupo TRPV4^{+/+} e que foi tratado com o creme não iônico (TRPV4^{+/+} Veículo). Além disso, foi observado que animais TRPV4^{-/-} IMQ (Figura 13C) apresentaram resultados semelhantes aos animais TRPV4^{+/+} IMQ (Figura 13B). Na análise da infiltração leucocitária, verifica-se um aumento de $99,57 \pm 26,46\%$ para o grupo TRPV4^{+/+} IMQ e de $105,89 \pm 11,21\%$ para o grupo TRPV4^{-/-} IMQ quando comparados ao grupo TRPV4^{+/+} Veículo (Figura 13D). Esses resultados demonstram que a deleção gênica do receptor TRPV4 não foi capaz de reduzir a migração de células inflamatórias para a região inflamada.

A análise histológica também revelou que não houve diferença entre os animais TRPV4^{+/+} IMQ e TRPV4^{-/-} IMQ com relação à espessura da epiderme (Figura 13E), sendo que ambos os grupos apresentaram aumento da espessura em $126,92 \pm 18,68\%$ (TRPV4^{+/+} IMQ) e $115,03 \pm 13,73\%$ (TRPV4^{-/-} IMQ) quando comparados ao grupo veículo (TRPV4^{+/+}Veículo). Assim como verificado anteriormente, a deleção gênica de TRPV4 não reduz o aumento da espessura da epiderme induzida pelo IMQ.

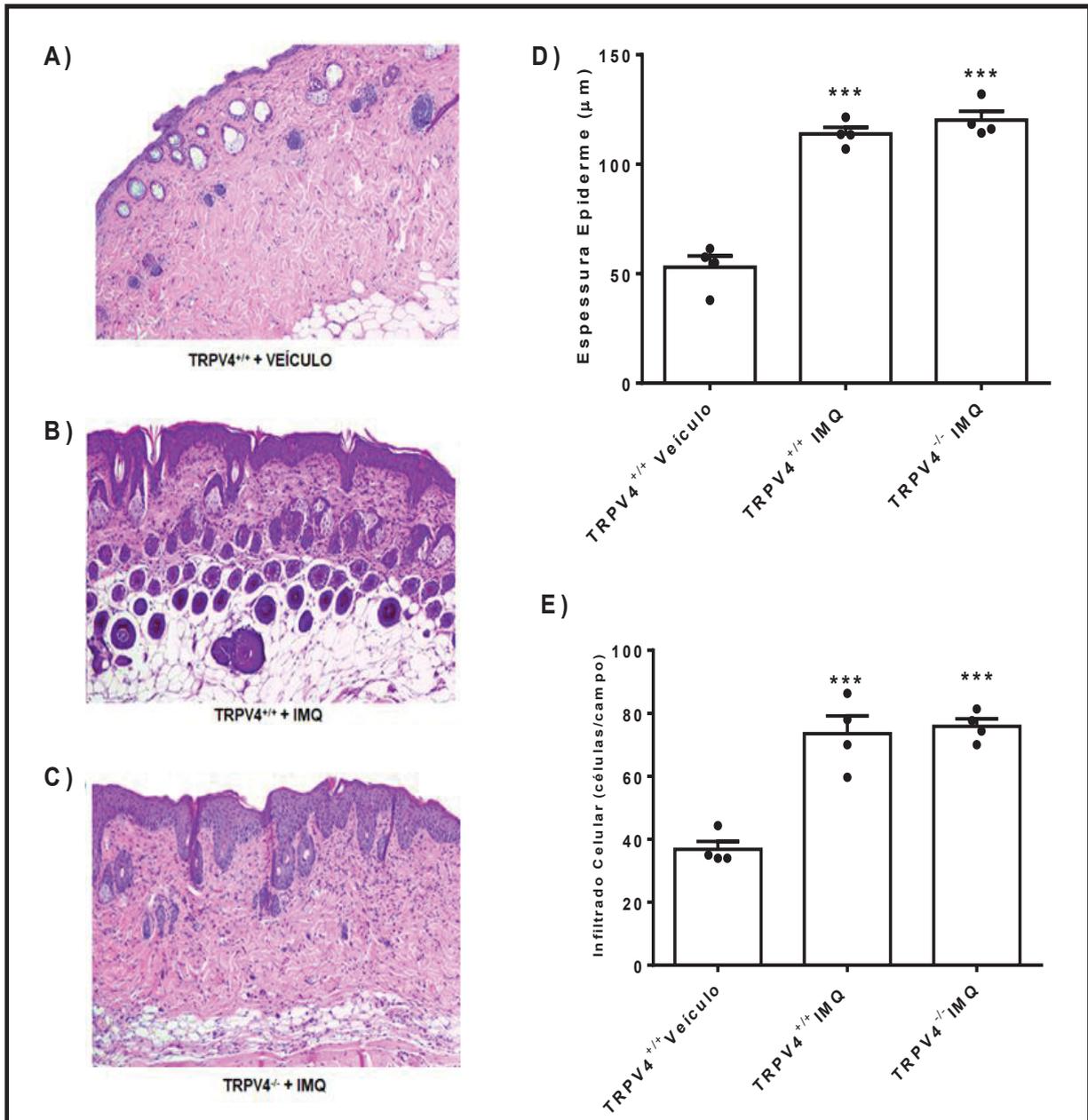


Figura 13: Fotos representativas e análise das alterações histológicas dos cortes de amostras dos dorsos dos animais TRPV4^{+/+} e TRPV4^{-/-} submetidos ao protocolo de indução de psoríase através da aplicação de IMQ. A) TRPV4^{+/+} + Veículo (creme não-iônico); B) TRPV4^{+/+} + IMQ; C) TRPV4^{-/-} + IMQ. As amostras dos dorsos dos animais foram coletadas, processadas e coradas com HE e fotografadas em aumento de 400x, escala de 200 μm. Análise quantitativa da espessura da epiderme (D) e da migração celular (E). A quantificação foi realizada através da contagem do número de células na derme e a avaliação da epiderme através da medida da mesma em μm, com aumento de 400x em cinco campos distintos de três cortes histológicos diferentes de três animais de cada grupo, através do software *ImageJ*. Os valores estão expressos como média ± EPM. Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo TRPV4^{+/+} veículo, *** P < 0,001 e analisados por ANOVA de uma via seguida por post-hoc de Bonferroni (n=4).

5.3 EFEITO DA DELEÇÃO GÊNICA DE TRPV4 NA HIPERALGESIA MECÂNICA NO MODELO DE PSORÍASE INDUZIDA POR IMQ

Para determinar se a deleção de TRPV4 teria envolvimento na hiperalgesia mecânica, foi realizado o teste com os filamentos de Von Frey. Na Figura 14, é possível visualizar que o tratamento dos camundongos com o IMQ promove redução no limiar nociceptivo mecânico, caracterizado pelo aumento na frequência de retiradas da pata frente a aplicações do filamento de von Frey. Tais efeitos foram observados no 4º e no 7º dia do protocolo, nos dois grupos que receberam o IMQ. Além disso, foi observado que animais TRPV4^{-/-} IMQ não apresentaram melhora da hiperalgesia induzida por IMQ quando comparados ao grupo TRPV4^{+/+} IMQ tanto no quarto quanto no 7º dia.

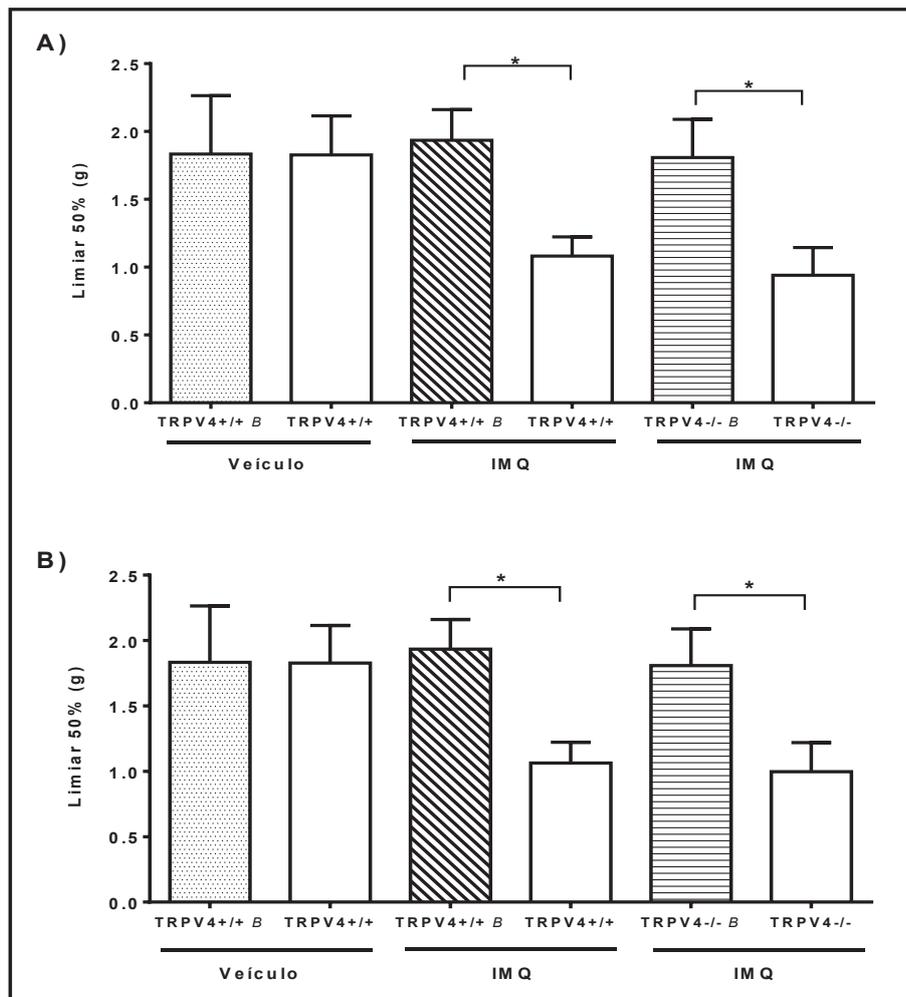


Figura 14: Avaliação da hiperalgesia mecânica em animais selvagens (TRPV4^{+/+}) e nocautes (TRPV4^{-/-}) submetidos ao protocolo de indução de psoríase através da aplicação de IMQ no dia 4 (A) e no dia 7 (B). Os valores estão expressos como média ± EPM. O símbolo *P<0,05 representa o nível de significância quando comparado ao grupo Basal (TRPV4^{+/+}B ou TRPV4^{-/-}B) antes do tratamento com IMQ e analisados por ANOVA de uma via seguida por post-hoc de Bonferroni, (n=5-8).

5.4 EFEITO DA DELEÇÃO GÊNICA DE TRPV4 NO PRURIDO INDUZIDO PELA APLICAÇÃO TÓPICA DE IMQ

Para avaliar o efeito da deleção gênica de TRPV4 no prurido dos animais submetidos ao protocolo de indução de psoríase por IMQ, foi avaliado o tempo que cada animal permanecia lambendo ou mordendo o dorso, no quarto e no sétimo dia durante 15 minutos. Na Figura 15A é possível observar que, no quarto dia, o tratamento com IMQ foi capaz de causar prurido no dorso dos animais (aumento de: $72,63 \pm 24,3$ segundos no grupo TRPV4^{+/+} IMQ e $66,43 \pm 15,98$ segundos no grupo TRPV4^{-/-} IMQ), quando comparado aos animais TRPV4^{+/+} tratados com o creme não iônico (TRPV4^{+/+} Veículo, $1,00 \pm 0,41$ segundos). Por outro lado, no sétimo dia, foi possível observar uma inibição de $64,86 \pm 11,27\%$ do tempo de prurido nos animais TRPV4^{-/-} IMQ ($43,00 \pm 13,79$ segundos) quando comparado com os animais do grupo TRPV4^{+/+} IMQ ($122,6 \pm 36,20$ segundos) (Figura 15B). Esses resultados mostram que a deleção do gene de TRPV4 foi capaz de reduzir a sensação de prurido gerada pelo IMQ nos animais apenas no 7º dia.

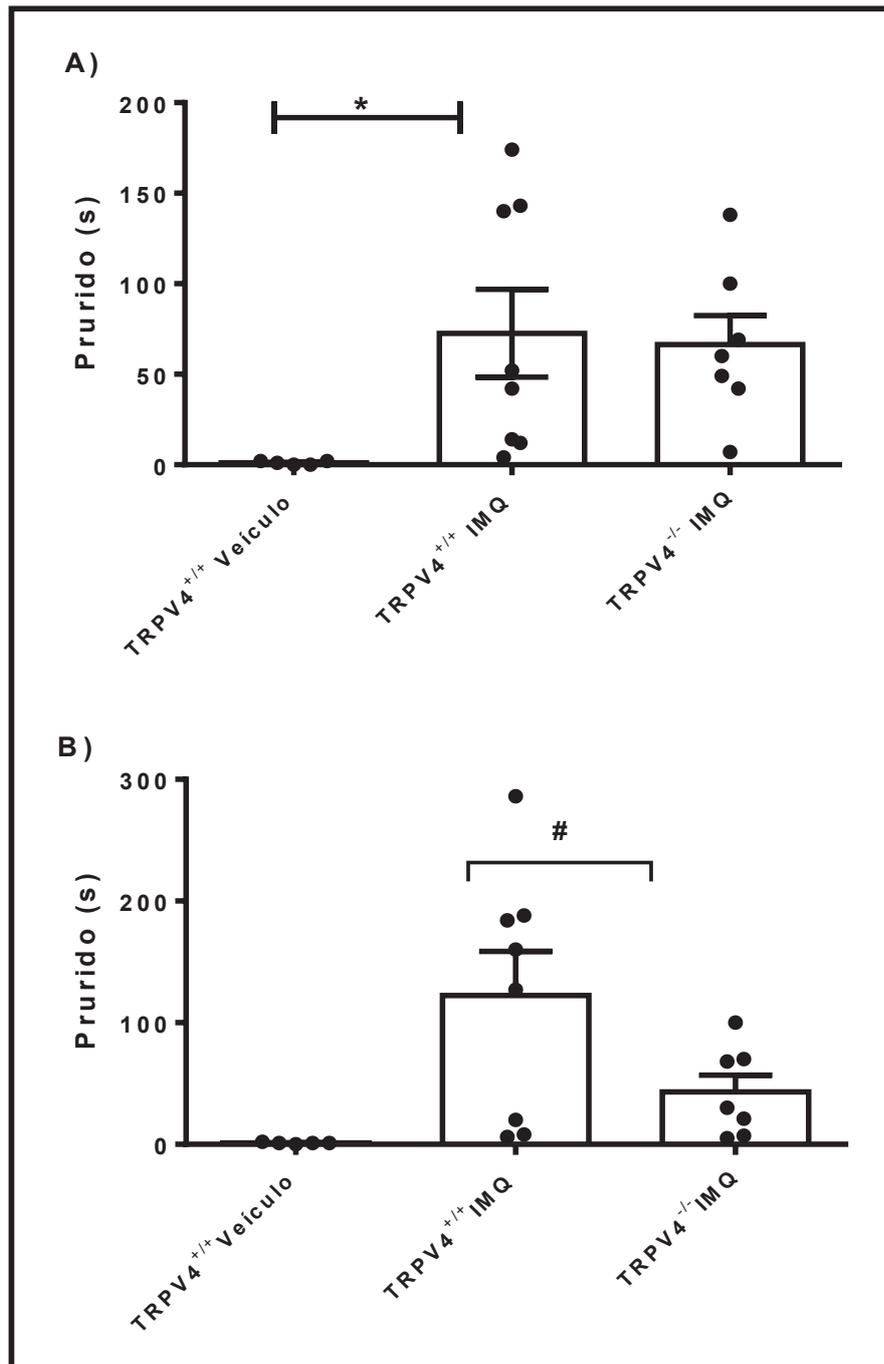


Figura 15: Efeito da deleção gênica de TRPV4 no prurido em animais submetidos ao protocolo de indução de psoríase através da aplicação de IMQ. Os animais do grupo TRPV4^{+/+} Veículo receberam diariamente a aplicação tópica de creme não-iônico, enquanto os grupos TRPV4^{+/+} IMQ e TRPV4^{-/-} IMQ receberam a aplicação tópica de 62,5mg de IMQ no dorso. A avaliação do prurido foi realizada através da medição do tempo que cada animal permanecia lambendo ou mordendo a região do dorso no dia 4 (A) e no dia 7 (B). Os valores estão expressos como média ± EPM. O símbolo *P<0,05 representa o nível de significância quando comparados ao grupo TRPV4^{+/+} veículo. # P<0,05 quando comparado com o grupo TRPV4^{+/+} IMQ e analisados por ANOVA de uma via seguida por post-hoc de Bonferroni (n=5-8).

5.5 EFEITO DA DELEÇÃO GÊNICA DE TRPV4 NO BEM-ESTAR DOS ANIMAIS SUBMETIDOS AO MODELO DE PSORÍASE INDUZIDA POR IMQ

Na avaliação da construção do ninho, verifica-se através da Figura 16A que no dia 4 do protocolo, o grupo dos animais TRPV4^{+/+} tratados com IMQ (TRPV4^{+/+} IMQ) apresentou uma redução no escore do bem-estar (escore de: $2,38 \pm 0,74$) dos animais quando comparado com o grupo TRPV4^{+/+} tratados com o creme não iônico (escore de: $4,4 \pm 0,4$) (TRPV4^{+/+} Veículo), sendo essa redução de $45,90 \pm 14,32\%$.

Em animais TRPV4^{-/-} e tratados com IMQ foi observado um escore de bem-estar do animal de $2,71 \pm 0,57$ o que representou uma redução de $38,41 \pm 12,95\%$ quando comparado ao grupo TRPV4^{+/+} Veículo. Por outro lado, no dia 7 (Figura 16B) os animais do grupo TRPV4^{-/-} IMQ não apresentaram diminuição no padrão de bem-estar e os dados foram semelhante aos animais TRPV4^{+/+} tratados com o creme não iônico (escore de $4,0 \pm 0,31$ e $4,2 \pm 0,37$, respectivamente).

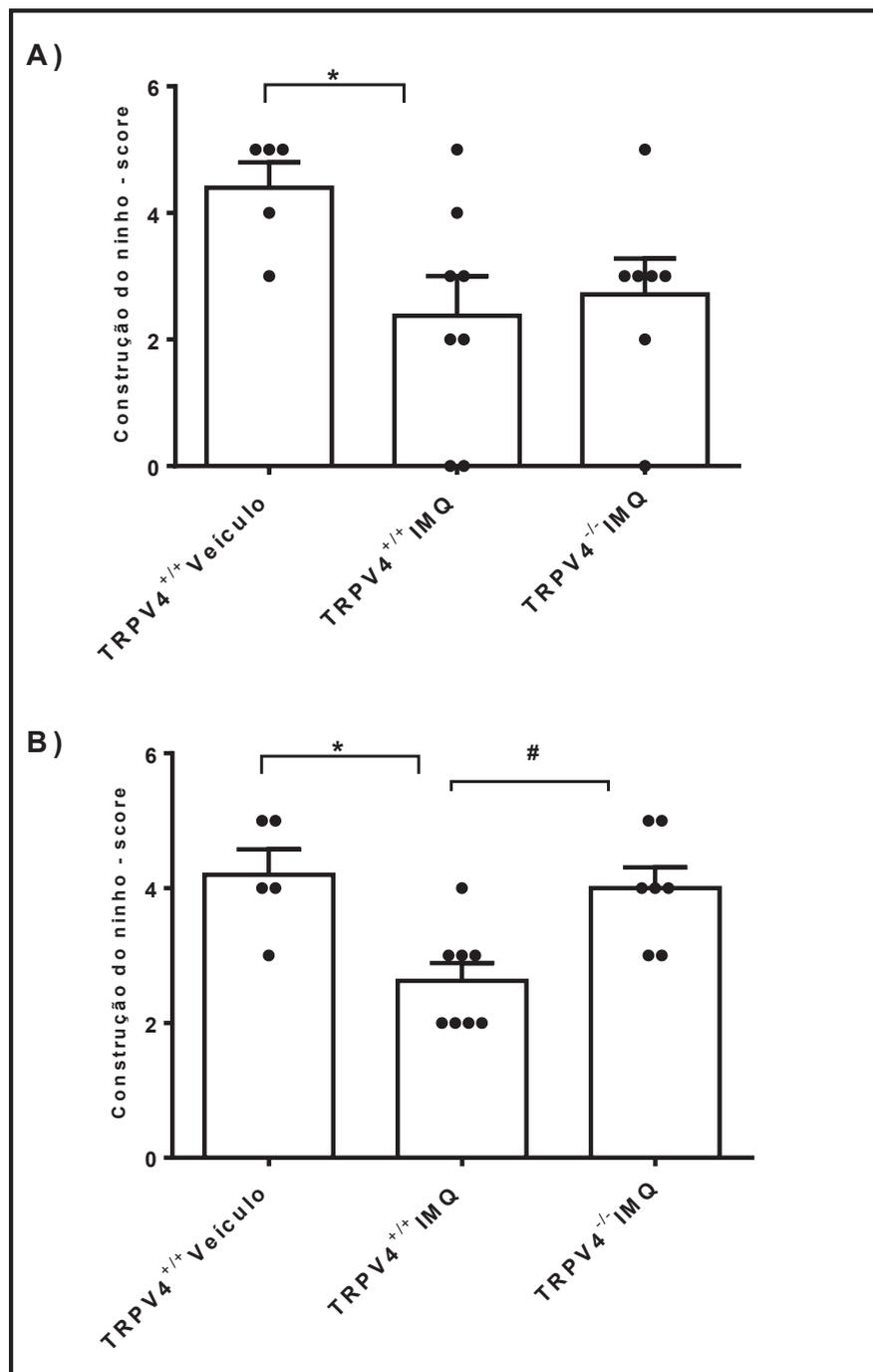


Figura 16: Avaliação do bem-estar dos animais selvagens (TRPV4^{+/+}) e nocautes (TRPV4^{-/-}) submetidos ao protocolo de indução de psoríase através da aplicação de IMQ. A avaliação do bem-estar dos animais foi realizada através do protocolo de *Nest Building*, em que cada animal é avaliado pela construção do ninho. Os animais são colocados em gaiolas individuais contendo um algodão no dia 3 e no dia 6 do protocolo experimental. Nos dias 4 (A) e 7 (B) o ninho foi avaliado através de escala pré-determinada. Os valores estão expressos como média \pm EPM. O símbolo * $P < 0,05$ representa o nível de significância quando comparado ao grupo TRPV4^{+/+} veículo. # $P < 0,05$ quando comparado com o grupo TRPV4^{+/+} IMQ. Analisados por ANOVA de uma via seguida por post-hoc de Bonferroni (n=5-8).

5.6 EFEITO DO ANTAGONISTA SELETIVO DE TRPV4 (HC-067047) NA SEVERIDADE DA LESÃO PSORIÁTICA INDUZIDA POR IMQ EM ANIMAIS C57BL/6

Para confirmar os dados obtidos com os animais com deleção gênica para o receptor TRPV4, o protocolo experimental foi realizado em animais C57BL/6 e tratados com o antagonista de TRPV4. Para os parâmetros de severidade da lesão (eritema, escarificação e descamação) quando avaliados separadamente no dia 4 (Figuras 17 e 18), verificou-se que apesar dos valores serem superiores, os escores dos grupos IMQ+Veículo e IMQ+HC, não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados aos grupos dos animais que receberam o veículo do HC e foram tratados com o creme não iônico (Veículo) ou que apenas receberam o HC (Figura 18A, B e C). Apenas na avaliação cumulativa desses parâmetros (PASI) é que verificou-se diferença estatística entre os grupos IMQ+Veículo e IMQ+HC quando comparados ao grupo Veículo. A média dos valores de PASI para os grupos IMQ+HC e IMQ+Veículo foi de $5,4 \pm 0,8$ e $6,3 \pm 0,3$, respectivamente, enquanto para o grupo V foi de $3,16 \pm 0,6$ (Figura 18D). Com isso, verificou-se que a administração do antagonista HC não foi capaz de alterar a formação de lesões teciduais induzidas pelo IMQ no 4º dia do protocolo.

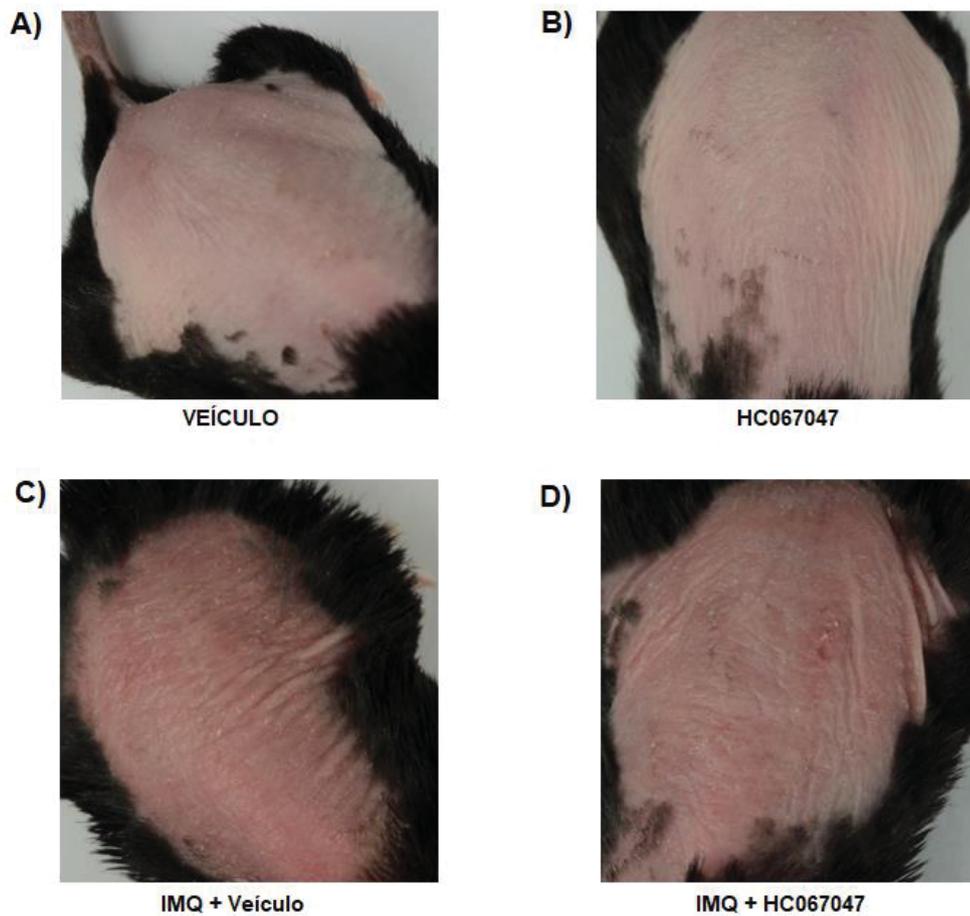


Figura 17: Fotos representativas das lesões psoriáticas induzidas pelo IMQ, no 4º dia de tratamento, em animais C57BL/6. A) Grupo Veículo que recebeu creme não iônico aplicado por via tópica no dorso + veículo DMSO 8%+TWEEN 4% através de gavagem; B) Grupo HC-067047 que recebeu creme não iônico aplicado por via tópica no dorso + 10mg/kg de HC-067047 através de gavagem, duas vezes ao dia; C) Grupo IMQ + Veículo que recebeu IMQ aplicado por via tópica no dorso + Veículo DMSO 8%+TWEEN 4% através de gavagem e D) Grupo IMQ+ HC-067047 que recebeu IMQ aplicado por via tópica no dorso + 10mg/kg de HC-067047 através de gavagem.

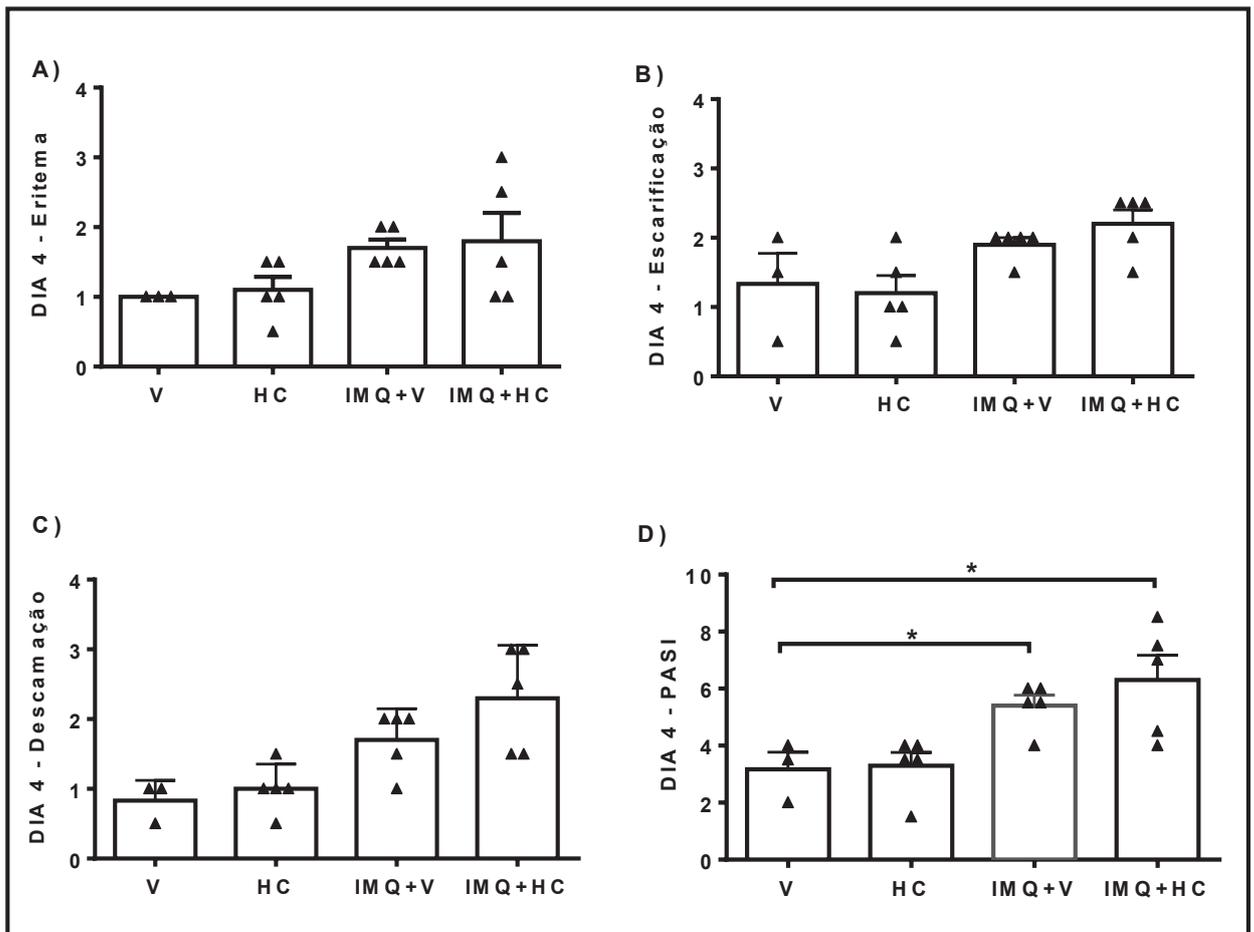


Figura 18: Efeito da administração de HC-067047 (10 mg/kg) na severidade das lesões psoriáticas induzidas pelo IMQ em animais C57BL/6 no 4º dia do protocolo experimental. Os parâmetros avaliados foram Eritema (A), Escarificação (B), Descamação (C) e o PASI (D). Os valores estão expressos como média \pm EPM. Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo Veículo, * $P < 0,05$ e analisados por ANOVA de uma via seguida por post-hoc de Bonferroni ($n=3-5$).

Na Figura 19 é possível observar as lesões no dorso dos animais no sétimo dia. Na Figura 20, verifica-se que os parâmetros avaliados no dia 7 mantêm as mesmas proporções do dia 4. O valor da média de PASI para o grupo IMQ+V foi de $3,8 \pm 0,37$ e para o grupo IMQ+HC foi de $4,7 \pm 0,56$, ambos mais elevados quando comparados ao grupo Veículo $1,6 \pm 0,73$ (Figura 20D). Esses resultados indicam que a administração do antagonista de TRPV4 não foi capaz de reverter, no sétimo dia, o eritema, escarificação e a descamação gerados pela aplicação do IMQ.

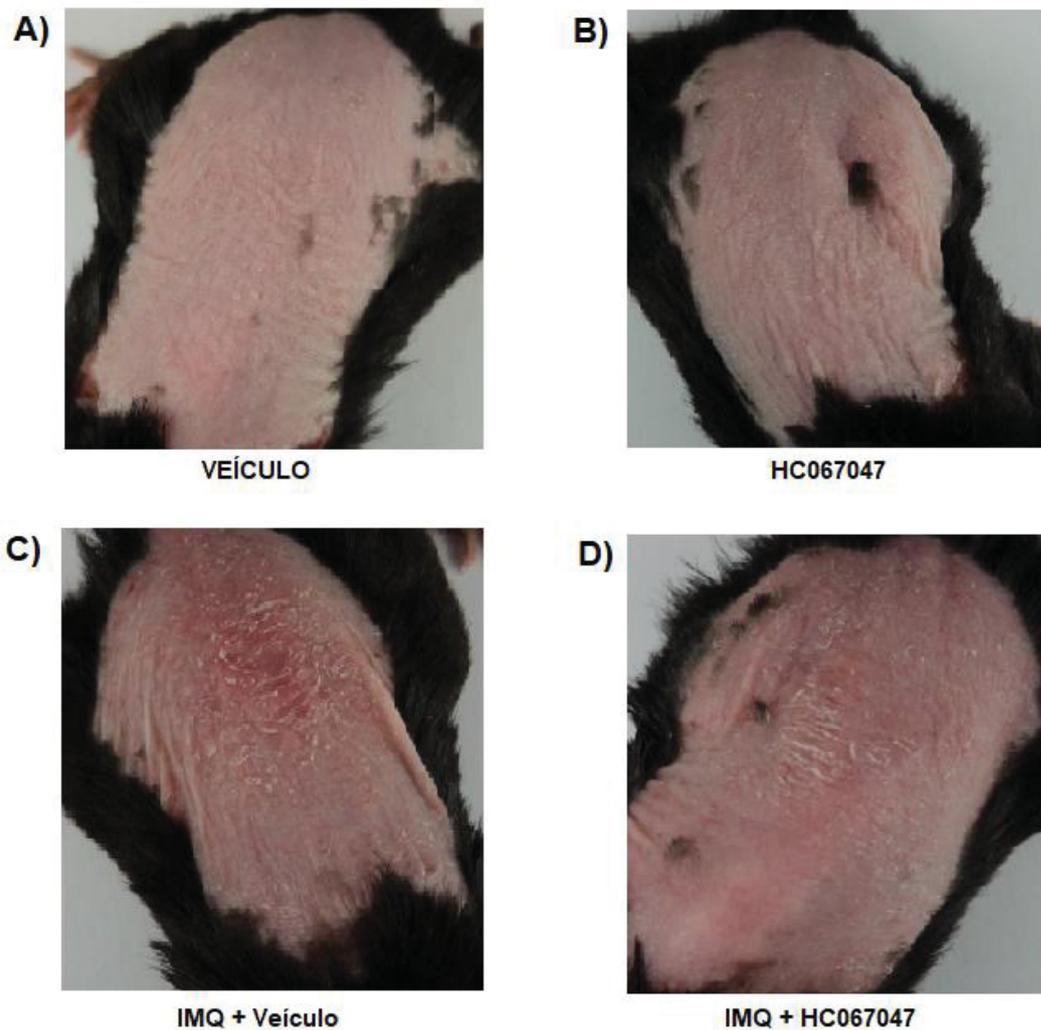


Figura 19: Fotos representativas das lesões psoriáticas induzidas pelo IMQ, no 7º dia de tratamento, em animais C57BL/6. A) Grupo Veículo que recebeu creme não iônico aplicado por via tópica no dorso + veículo DMSO 8%+TWEEN 4% através de gavagem; B) Grupo HC-067047 que recebeu creme não iônico aplicado por via tópica no dorso + 10 mg/kg de HC-067047 através de gavagem duas vezes ao dia; C) Grupo IMQ + Veículo que recebeu IMQ aplicado por via tópica no dorso + Veículo DMSO 8%+TWEEN 4% através de gavagem e D) Grupo IMQ+ HC-067047 que recebeu IMQ aplicado por via tópica no dorso + 10 mg/kg de HC-067047 através de gavagem.

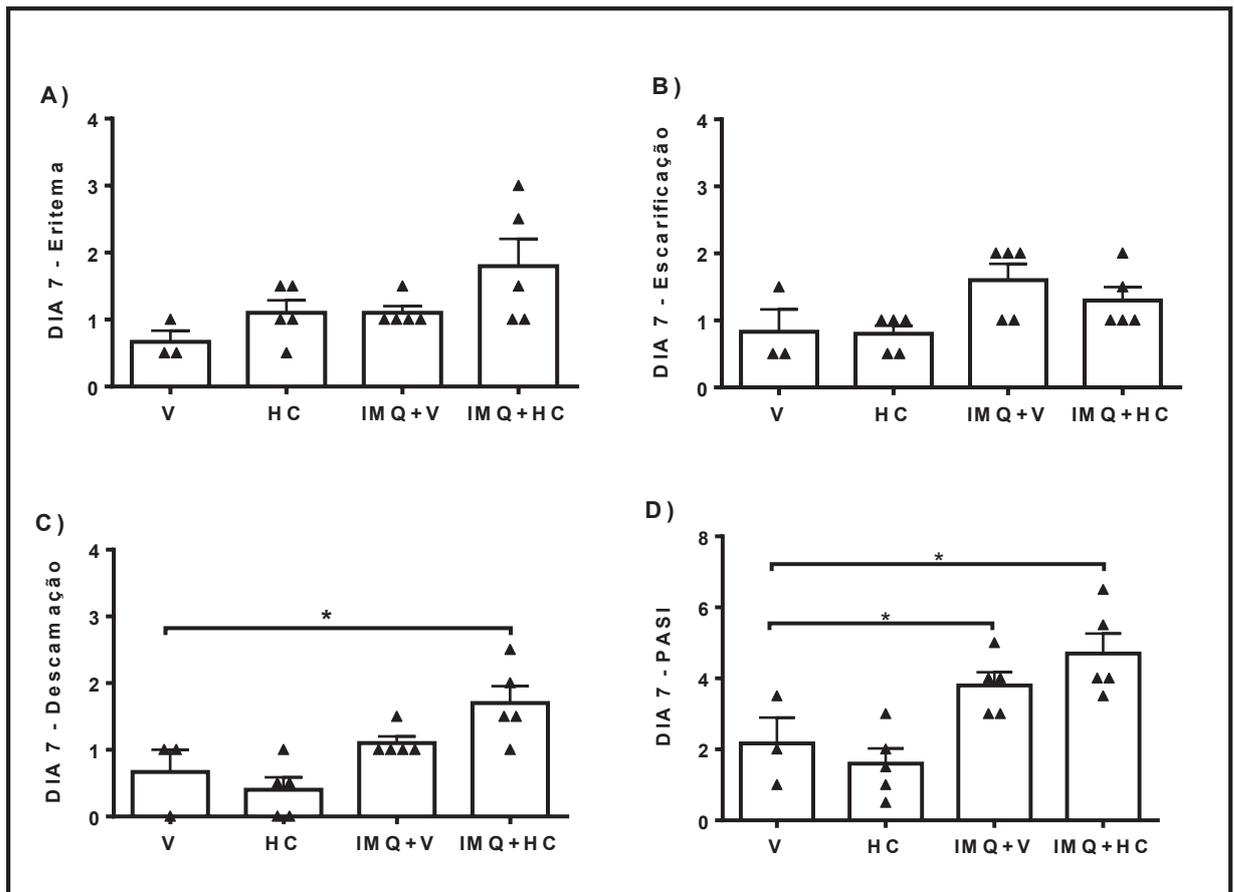


Figura 20: Efeito da administração de HC-067047 (10 mg/kg) na severidade das lesões psoriáticas induzidas pelo IMQ em animais C57BL/6 no 7º dia do protocolo experimental. Os parâmetros avaliados foram Eritema (A), Escarificação (B), Descamação (C) e o PASI (D). Os valores estão expressos como média \pm EPM. Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo Veículo, * $P < 0,05$ e analisados por ANOVA de uma via seguida por post-hoc de Bonferroni (n=3-5).

5.7 EFEITO DO ANTAGONISTA SELETIVO DE TRPV4 (HC-067047) NA PELE DE ANIMAIS C57BL/6 SUBMETIDOS A APLICAÇÃO DE IMQ

Para confirmar as alterações promovidas pelo IMQ na pele dos animais, amostras do dorso dos animais foram submetidas à análise histológica. Conforme observado na Figura 21, a aplicação de IMQ promoveu alterações características deste protocolo de indução de psoríase, como o aumento da espessura da epiderme (acantose) e aumento do número de células inflamatórias na derme nos grupos que receberam IMQ.

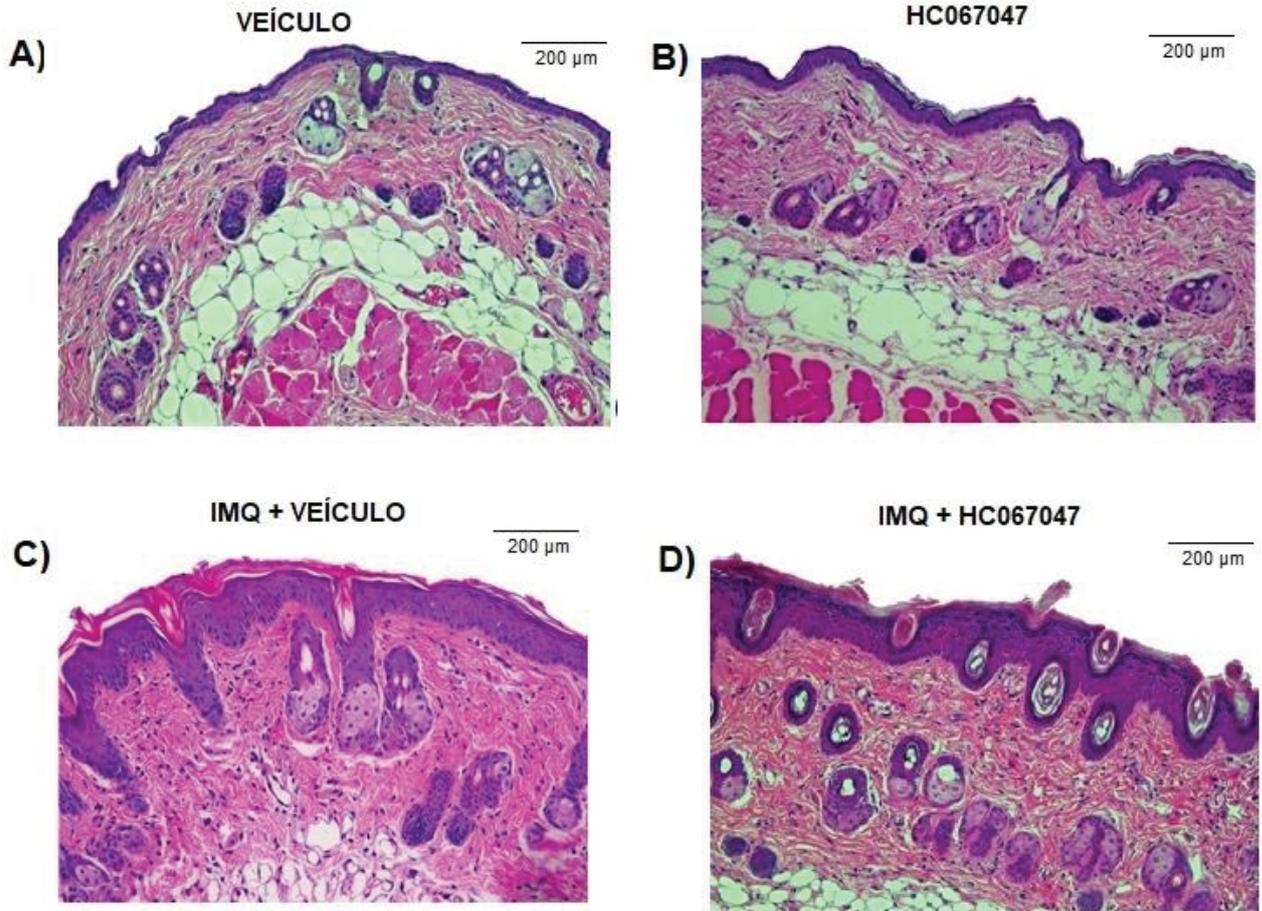


Figura 21: Fotos representativas de cortes histológicos de amostras dos dorsos dos animais C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de psoríase através da aplicação de IMQ. Os cortes histológicos foram corados com HE, aumento de 400x, escala de 200 µm. Sendo representados, A) Grupo Veículo que recebeu creme não iônico aplicado por via tópica no dorso + veículo DMSO 8%+TWEEN 4% através de gavagem; B) Grupo HC-067047 que recebeu creme não iônico aplicado por via tópica no dorso + 10mg/kg de HC-067047 através de gavagem; C) Grupo IMQ + Veículo que recebeu IMQ aplicado por via tópica no dorso + Veículo DMSO 8%+TWEEN 4% através de gavagem e D) Grupo IMQ+ HC-067047 que recebeu IMQ aplicado por via tópica no dorso + 10 mg/kg de HC-067047 através de gavagem.

Na avaliação histológica do processo psoriático na pele dos camundongos, podemos verificar que houve um aumento no infiltrado celular no grupo IMQ+Veículo ($276,47 \pm 32,52\%$) e no grupo IMQ+HC ($274,47 \pm 29,87\%$) quando comparados ao grupo Veículo (Figuras 21 e 22A). Esse resultado confirma os dados observados anteriormente, mostrando que o tratamento com o antagonista HC não é capaz de alterar o processo induzido pelo IMQ.

O mesmo foi observado em relação à espessura da epiderme em que verificou-se um aumento de $303,81 \pm 46,95\%$ do grupo IMQ+Veículo e um aumento de $282,01 \pm 24,13\%$ do grupo IMQ+HC quando comparados ao grupo veículo (Figura 22B). Tanto na avaliação do infiltrado celular como no da espessura da epiderme, não houve diferença estatística entre os grupos V e HC.

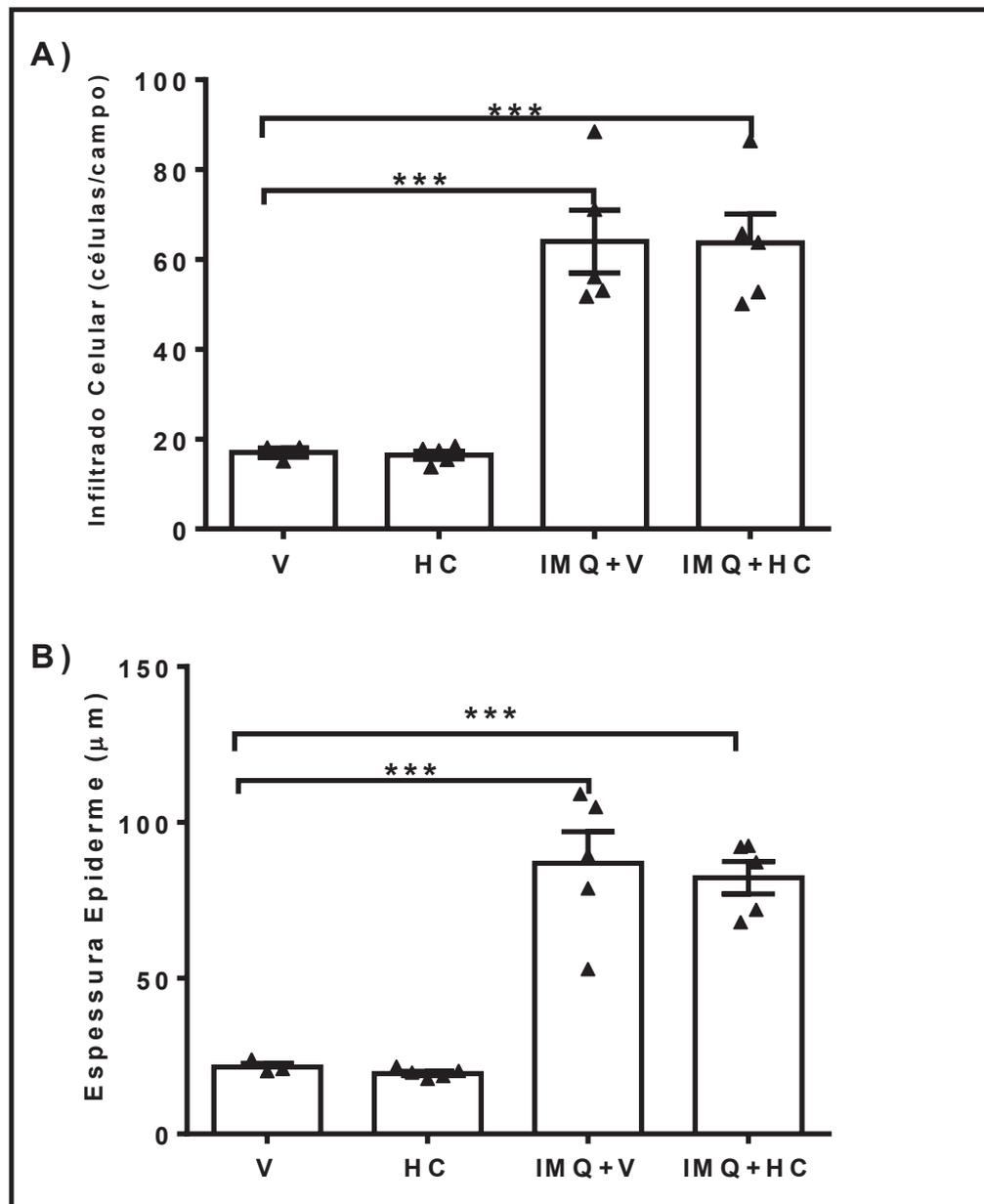


Figura 22: Efeito da administração de HC-067047 (10 mg/kg) na migração celular e na espessura da epiderme da pele de animais C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de psoríase através da aplicação de IMQ. A quantificação do infiltrado celular (A) foi realizada através da contagem do número de células na derme e a espessura da epiderme (B) através da medida da epiderme (μm), com aumento de 400x em cinco campos distintos de três cortes histológicos diferentes de três animais de cada grupo através do software *ImageJ*. Os valores estão expressos como média \pm EPM. Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo Veículo (V), *** $P < 0,001$ e analisados por ANOVA de uma via seguida por post-hoc de Bonferroni ($n=3-5$).

5.8 EFEITO DO ANTAGONISTA SELETIVO DE TRPV4 (HC-067047) NA EXPRESSÃO DE PCNA NA PELE DE ANIMAIS SUBMETIDOS AO MODELO DE PSORÍASE INDUZIDA POR IMQ

Para confirmar se o antagonista de TRPV4 teria efeito sobre a hiperproliferação de queratinócitos resultante do estímulo do IMQ, os cortes histológicos foram submetidos à análise imunohistoquímica para o marcador de proliferação celular PCNA. Na Figura 23 podemos verificar visualmente que a aplicação do IMQ promoveu um aumento no número de células positivas para PCNA (coradas em marrom) na epiderme dos animais dos grupos IMQ+V e IMQ+HC, quando comparados aos grupos V e HC.

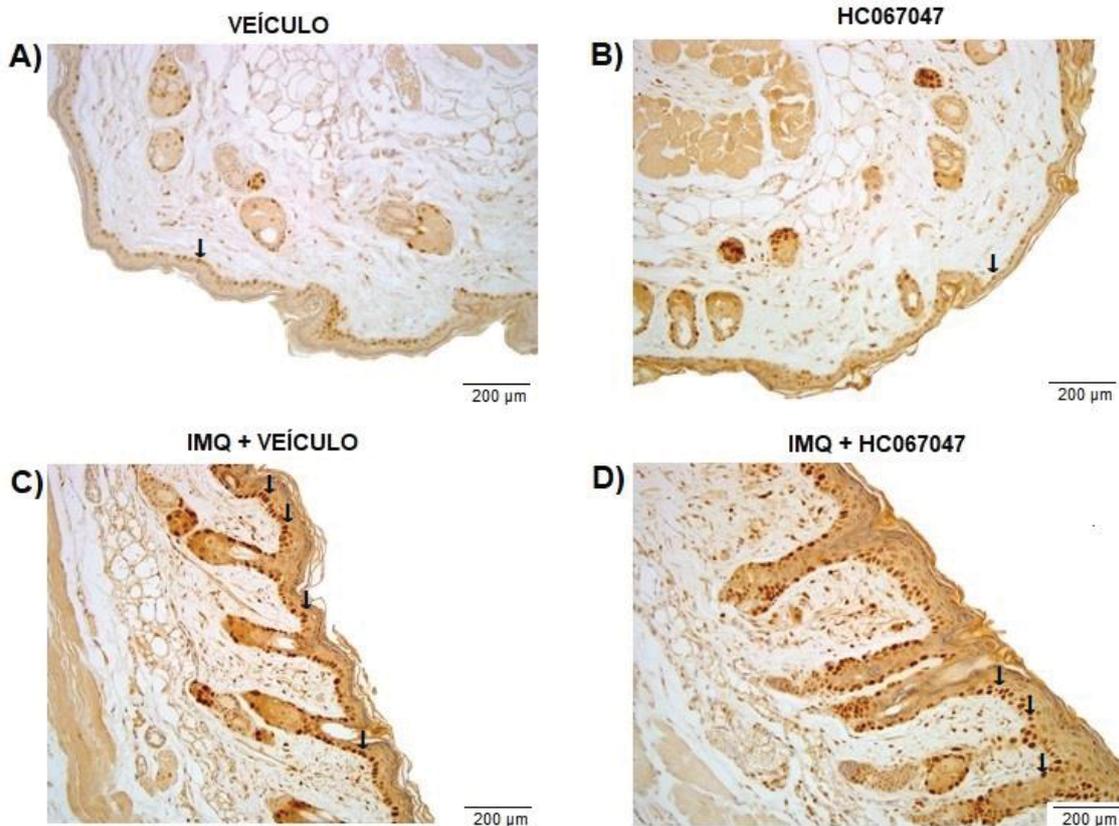


Figura 23: Fotos representativas da análise imunohistoquímica de PCNA dos cortes histológicos do dorso de animais C57BL/6, contra corados com HE (200x, escala de 200 µm), submetidos ao protocolo de psoríase através da aplicação de IMQ. A) Grupo Veículo que recebeu creme não iônico aplicado por via tópica no dorso + veículo DMSO 8%+TWEEN 4% através de gavagem; B) Grupo HC-067047 que recebeu creme não iônico aplicado por via tópica no dorso + 10mg/kg de HC-067047 através de gavagem; C) Grupo IMQ + Veículo que recebeu IMQ aplicado por via tópica no dorso + Veículo DMSO 8%+TWEEN 4% através de gavagem e D) Grupo IMQ+ HC-067047 que recebeu IMQ aplicado por via tópica no dorso + 10 mg/kg de HC-067047 através de gavagem. As células coradas em marrom são positivas para PCNA, conforme exemplos indicados pelas setas.

A análise quantitativa das lâminas da imunohistoquímica para PCNA (Figura 24) demonstrou que o grupo IMQ+Veículo apresentou um aumento de $150,81 \pm 7,88\%$ nas células imunomarcadas para o PCNA, quando comparado ao grupo Veículo, indicando uma hiperproliferação dos queratinócitos da epiderme. O grupo IMQ+HC também obteve um aumento de $166,91 \pm 22,47\%$, quando comparado ao grupo Veículo. Os grupos IMQ+V e IMQ+HC não foram diferentes entre si, demonstrando que o tratamento com o HC não interfere no aumento da proliferação celular ocasionada pela aplicação do IMQ.

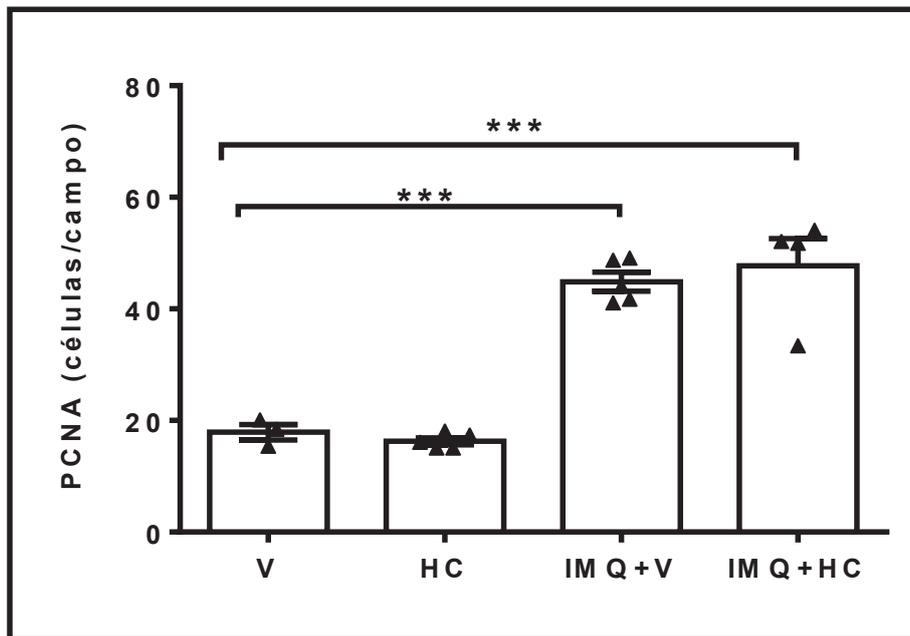


Figura 24: Efeito da administração de HC-067047 (10 mg/kg) sobre a expressão epidérmica de PCNA na pele do dorso de animais C57BL/6 submetidos ao protocolo de psoríase induzida pela aplicação de IMQ. A quantificação foi realizada através da contagem das células positivas para PCNA com aumento de 400x em cinco campos distintos de cada corte histológico, de cada grupo, através do software *ImageJ*. As barras verticais representam a média \pm EPM. Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo Veículo (V), *** $P < 0,001$ e analisados por ANOVA de uma via seguida por post-hoc de Bonferroni ($n=3-5$).

5.9 EFEITO DO ANTAGONISTA SELETIVO DE TRPV4 (HC-067047) NA AVALIAÇÃO DA HIPERALGESIA MECÂNICA

Na avaliação da hiperalgesia mecânica, verificou-se que os grupos tratados com o veículo do HC ou que apenas receberam o HC não apresentam alterações na hiperalgesia mecânica quando comparados aos seus resultados basais (Figura 25). Além disso, confirmando os dados obtidos com os animais com deleção gênica para

o receptor TRPV4, o tratamento com HC, duas vezes ao dia, não foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica induzida pelo tratamento com IMQ, tanto no quarto quanto no sétimo dia do experimento.

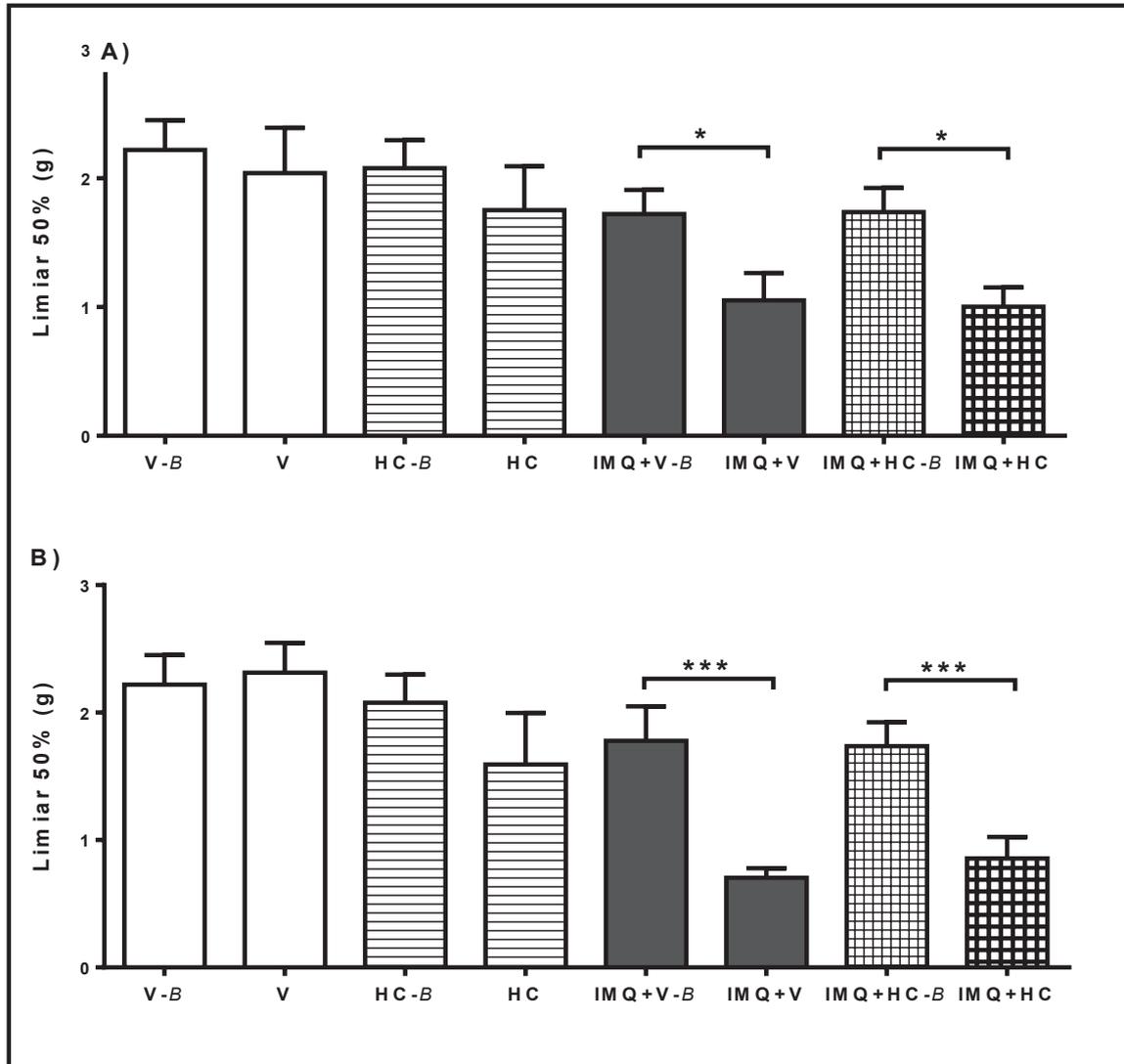


Figura 25: Efeito da administração de HC-067047 (10 mg/kg) na hiperalgesia mecânica em animais C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de psoríase através da aplicação de IMQ no dia 4 (A) e no dia 7 (B). As barras verticais representam a média \pm EPM (n=3-12). Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao valor obtido no basal em animais que receberam IMQ (IMQ+V-B ou IMQ+HC-B), e analisados por ANOVA de uma via seguida por post-hoc de Bonferroni (n=5-12),* P< 0,05; *** P<0,001.

5.10 EFEITO DO ANTAGONISTA SELETIVO DE TRPV4 (HC-067047) NO PRURIDO NO MODELO DE PSORÍASE INDUZIDA POR IMQ

Para avaliar o efeito do antagonista de TRPV4 no prurido em lesões psoriáticas induzidas por IMQ, foi avaliado o tempo que cada animal permanecia lambendo ou mordendo o dorso, no quarto e no sétimo dia do protocolo experimental. No quarto dia (Figura 26A), os animais dos grupos tratados com o veículo do HC e que receberam o creme não iônico no dorso bem como os animais que receberam apenas HC obtiveram uma média de tempo de prurido de $0,71 \pm 0,36$ segundos e $15,60 \pm 7,13$ segundos, respectivamente, não sendo diferentes estatisticamente. Por outro lado, os grupos dos animais que receberam IMQ no dorso e o tratamento com o veículo do HC (IMQ+Veículo) ou HC 10 mg/kg (IMQ+HC) tiveram uma média de $93,4 \pm 30,00$ e $92,2 \pm 21,13$ segundos, respectivamente. Esses resultados demonstram que os animais que receberam IMQ tiveram um aumento no tempo de prurido e a administração de HC não foi capaz de reverter esse aumento no quarto dia de protocolo.

Já na avaliação do prurido realizada no sétimo dia (Figura 26B), o grupo dos animais tratados com IMQ no dorso e que recebem o veículo do HC (IMQ+Veículo) obteve uma média do tempo de prurido de $102,11 \pm 13,25$ segundos, enquanto o grupo tratado com IMQ e que receberam HC (IMQ+HC) teve uma média de $57,30 \pm 12,21$ segundos. Esse valor representa uma redução significativa de $43,88 \pm 11,96\%$ no tempo de prurido quando comparado ao grupo IMQ+Veículo. Esse dado indica que a administração do antagonista HC no sétimo dia reduz a sensação de prurido provocada pela aplicação de IMQ no dorso dos animais.

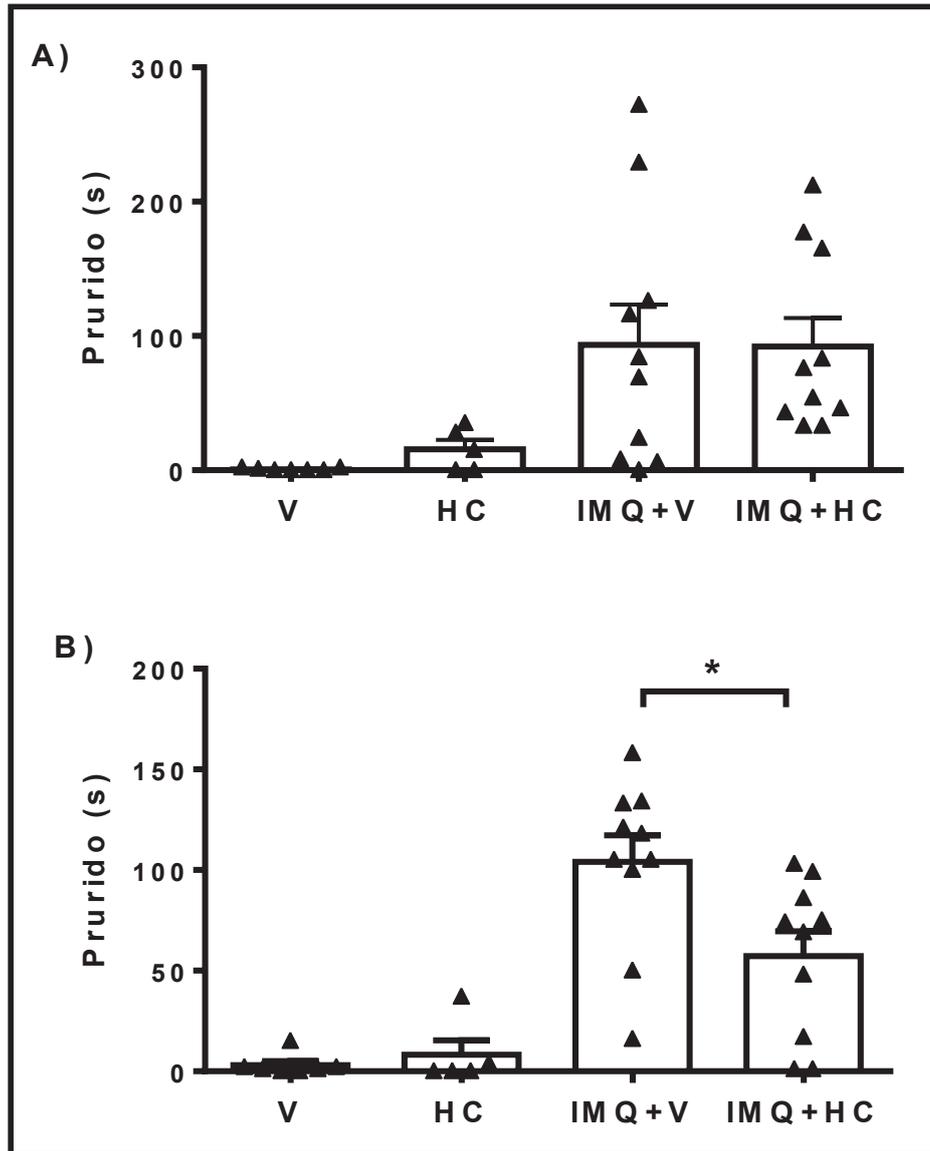


Figura 26: Efeito da administração de HC-067047 (10 mg/kg) no tempo de prurido em animais C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de psoríase através da aplicação de IMQ. A avaliação do prurido foi realizada através da contagem do tempo que cada animal permanecia lambendo ou mordendo a região do dorso, local que recebeu o veículo (creme não iônico) ou IMQ no 4º dia (A) e no 7º dia (B). As barras verticais representam a média \pm EPM. Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo IMQ+Veículo (IMQ+V), * $P < 0,05$ e analisados por ANOVA de uma via seguida por post-hoc de Bonferroni ($n=5-12$).

5.11 EFEITO DO ANTAGONISTA SELETIVO DE TRPV4 (HC-067047) NA AVALIAÇÃO DO BEM-ESTAR ANIMAL ATRAVÉS DO TESTE DE *NEST BUILDING*

Para confirmar os dados obtidos em animais com deleção gênica para o receptor TRPV4 no teste de bem-estar do animal, os animais foram tratados com o

antagonista do TRPV4 (HC-067047) e avaliados nos dias 4 e 7. Na avaliação do dia 4 do protocolo da construção do ninho (Figura 27A), verificou-se que os grupos dos animais que receberam o veículo do HC e seguido do tratamento com o creme não iônico no dorso (V) ou que apenas receberam o HC (HC) apresentaram um escore médio de construção do ninho de $4,5 \pm 0,28$ e $4 \pm 0,63$, respectivamente, enquanto os grupos dos animais tratados com IMQ e que receberam o veículo do HC (IMQ+V) ou tratados com IMQ e receberam HC (IMQ+HC), apresentaram escores médios de $1,85 \pm 0,34$ e $1,70 \pm 0,17\%$ respectivamente. Esses dados permitem observar que já no 4º dia de protocolo, os animais que recebem a administração tópica de IMQ, têm sua condição de bem-estar reduzida e o tratamento com o HC não foi capaz de melhorar essa condição.

Na avaliação realizada no dia 7 (Figura 27B), os escores dos grupos dos animais que receberam o veículo do HC e tratados com o creme não iônico no dorso (V) ou que apenas receberam o HC (HC) continuaram com os escores de bem-estar maiores ($4,42 \pm 0,42$ e $4,00 \pm 0,54$, respectivamente) quando comparado ao grupo tratado com IMQ e que receberam o veículo do HC (IMQ+V) (escore de: $2,6 \pm 0,35$). Por outro lado, o grupo IMQ que recebeu o HC (IMQ+HC) apresentou uma tendência em melhorar o escore de bem-estar dos animais ($3,15 \pm 0,38$) quando comparado ao grupo IMQ+Veículo (escore de: $2,6 \pm 0,35$), no entanto, esses valores não apresentam diferença estatística.

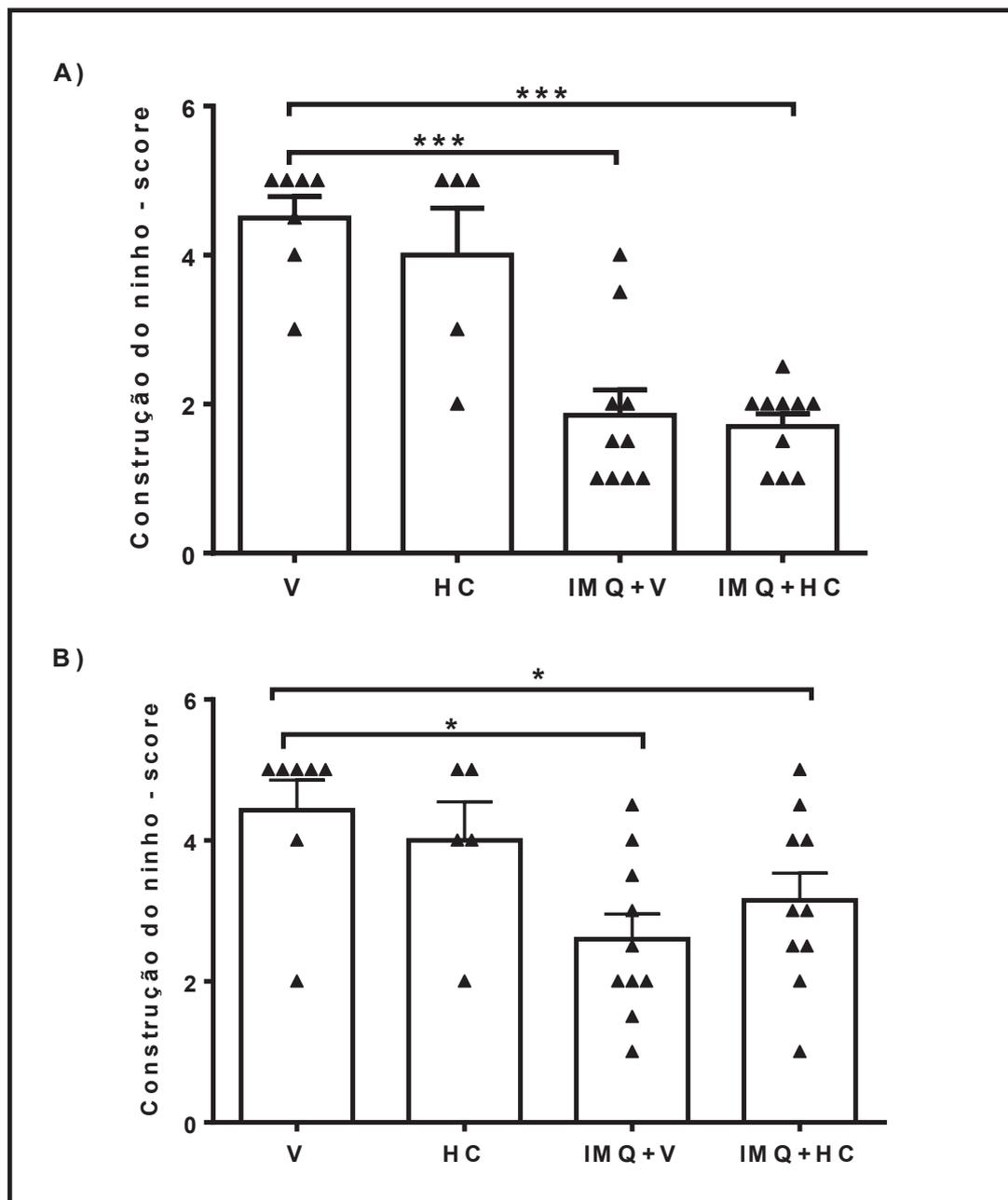


Figura 27: Efeito da administração de HC-067047 (10 mg/kg) no bem-estar dos animais C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de psoríase através da aplicação de IMQ. A avaliação do bem-estar dos animais foi realizada através do protocolo de *Nest Building*, em que cada animal é avaliado pela construção do ninho. Os animais são colocados em gaiolas individuais contendo um algodão no dia 3 e no dia 6 do protocolo experimental. Nos dias 4 (A) e 7 (B) o ninho foi avaliado através de escala pré-determinada. As barras verticais representam a média \pm EPM. Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo Veículo (V), * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$, e analisados por ANOVA de uma via seguida por post-hoc de Bonferroni ($n=5-12$).

Na Figura 28, é possível correlacionar o grupo de tratamento e o estado da pele do animal com o ninho construído.

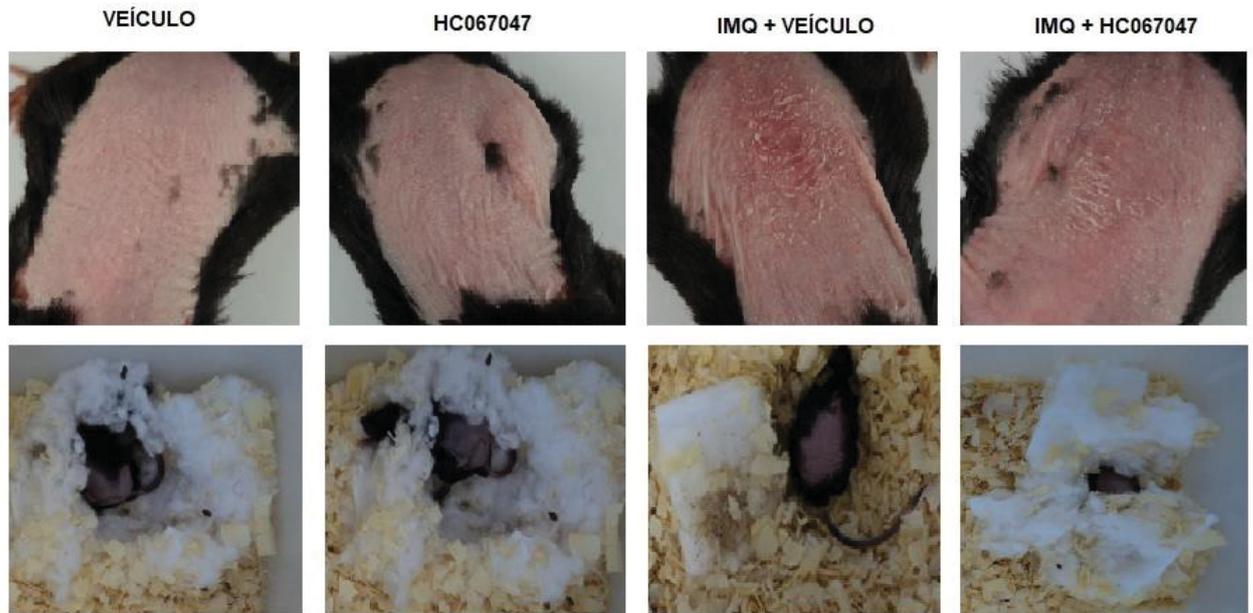


Figura 28: Fotos representativas da pele do dorso dos animais e do resultado final do teste de *Nest Building* submetidos ao protocolo de psoríase através da aplicação de IMQ.

6 DISCUSSÃO

Entre as doenças de pele relacionadas às áreas visíveis que mais afetam a auto imagem e conseqüentemente a qualidade de vida, acompanhadas de dor, prurido ou queimação, está a psoríase (SANCLEMENTE *et al.*, 2017).

No presente trabalho, na busca por novos alvos farmacológicos avaliamos a participação do TRPV4 na psoríase induzida por IMQ. A hipótese do TRPV4 estar envolvido na psoríase foi baseada no fato de que alguns estudos demonstravam o envolvimento de diferentes tipos de receptores TRP, como por exemplo TRPA1 e TRPV1 na dermatite atópica, TRPV1 e TRPC6 na psoríase, TRPV4 na rosácea e TRPC1 e TRPC4 no câncer de pele (YANG *et al.*, 2017). Como o TRPV1 e TRPA1 possuem relação com doenças de pele, tornou-se interessante investigar nesse projeto o papel do TRPV4, visto que aqueles receptores são co-expressos com o TRPV4 em neurônios sensoriais que expressam os neuropeptídeos, substância P e CGRP, que promovem respostas inflamatórias neurogênicas (BENEMEI *et al.*, 2015). Além disso, TRPV4 e TRPV1 apresentam homologia de sequência de aproximadamente 50% (MARTINS *et al.*, 2014; NILIUS; SZALLASI, 2014; KEMENY *et al.*, 2018).

Alguns receptores TRPs, como TRPV1 e TRPA1, já foram descritos como potenciais participantes da fisiopatologia de doenças inflamatórias cutâneas. TRPV1 e TRPA1 são co-expressos em um grande subconjunto de nervos sensoriais da pele, ocorrendo também em queratinócitos, mastócitos, células dendríticas e células endoteliais, em que atuam como sensores nociceptivos e potencializam o processo inflamatório (GOUIN *et al.*, 2017). Um estudo de Riol-Blanco e colaboradores (2014) utilizou o modelo de psoríase induzida por IMQ em camundongos, para verificar a interação dos neurônios sensoriais TRPV1 na resposta inflamatória. Após o bloqueio farmacológico de TRPV1 verificou-se que houve redução da produção de IL-23 pelas células dendríticas dérmicas (RIOL-BLANCO *et al.*, 2014). Mais recentemente, Ágnes Kemény e colaboradores (2018) relataram que camundongos com deleção gênica de TRPV1 também demonstraram diminuição nas alterações da espessura da pele e perfusão sanguínea em comparação com camundongos WT após o tratamento com IMQ (KEMENY *et al.*, 2018). Zhou e colaboradores (2018) mostraram que camundongos com deleção gênica para TRPV1 submetidos ao protocolo de indução de psoríase por IMQ tiveram os escores clínicos, a extensão da hiperplasia da pele, e

alterações histopatológicas características da psoríase reduzidos significativamente, além da redução da infiltração de leucócitos, como mastócitos e células T, na pele e redução da expressão de citocinas importantes na psoríase como IL-1 β , IL-6 e IL-23 (ZHOU *et al.*, 2018). Diante da atividade cutânea de TRPV1, estudos clínicos de fase 2 (identificados como NCT02583022, NCT02052531 e NCT02565134) com um antagonista de TRPV1 em creme (PAC-14028) em dermatite atópica parecem promissores. Juntamente com a recuperação acelerada da função de barreira da pele, o PAC-14028 aliviou os sintomas gerais de dermatite atópica, incluindo aumento sérico de IgE, degranulação de mastócitos, redução no comportamento de arranhões e gravidade clínica da dermatite, podendo ser uma modalidade de tratamento para o tratamento de pacientes com dermatite atópica leve a moderada (YUN *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2019).

O TRPA1 também parece estar envolvido em processos inflamatórios de pele (SILVA *et al.*, 2011) e em alguns dos sintomas de dermatite de contato irritativa como dor, inflamação neurogênica e possivelmente prurido induzido pela exposição tópica de alguns irritantes químicos voláteis (LIU *et al.*, 2013; NOROES *et al.*, 2019). O envolvimento de TRPA1 também foi avaliado na psoríase em que parece ter efeitos protetores mediados pela ativação de receptores TRPA1 neuronais e não neuronais (KEMENY *et al.*, 2018).

Existem indícios da participação do TRPV4 em processos inflamatórios. Estudos demonstram que o TRPV4 é sensibilizado sob condições inflamatórias por vários fatores, incluindo proteases e serotonina (SEGOND VON BANCHET *et al.*, 2013), e participa de processos inflamatórios em diferentes sistemas, como gastrointestinal (MIHARA *et al.*, 2020), respiratório (DUAN *et al.*, 2020) e cardiovascular (VERGNOLLE *et al.*, 2010). Em estudos pré-clínicos, também foi demonstrado que esse receptor está envolvido em condições inflamatórias crônicas, incluindo artrite e doença inflamatória intestinal, e medeia hiperalgesia térmica e mecânica (WHITE *et al.*, 2016).

Em se tratando de pele, o papel do TRPV4 na inflamação parece ser bastante complexo, visto que um processo inflamatório com a presença de histamina (CENAC *et al.*, 2010), proteases (GRANT *et al.*, 2007) e prostaglandina E2 (PGE2) (ALESSANDRI-HABER *et al.*, 2003) podem levar à sensibilização de TRPV4 nas células do sistema imune que se encontram na derme (SULK *et al.*, 2012). Ao mesmo tempo que o aumento de TRP pode estar correlacionado com o aumento do processo

inflamatório na pele em algumas situações, em outras parece não estar. Em lesões pré-malignas e em câncer de pele do tipo não melanoma, por exemplo, o nível de TRPV4 encontrado em queratinócitos cutâneos saudáveis ou inflamados é reduzido, logo, permanece desconhecido se este receptor é um componente do mecanismo de tais doenças (FUSI *et al.*, 2014; LIEDTKE *et al.*, 2014).

Para estudar o envolvimento do TRPV4, utilizamos animais com deleção gênica bem como antagonista para o receptor TRPV4. Ao focar no papel desempenhado pela sinalização do TRPV4 na mediação da inflamação da pele induzida por IMQ, mostramos aqui através da avaliação da severidade das lesões e histologia que a deleção do gene TRPV4 não foi capaz de alterar o processo inflamatório induzido pelo IMQ. A deleção gênica ou o bloqueio farmacológico do TRPV4 não modificaram os parâmetros avaliados visualmente (eritema, escarificação, descamação do PASI) e nem os parâmetros histológicos alterados pelo IMQ. Assim, esses achados sugerem que diferente dos dados encontrados para outros receptores como para o TRPV1 e TRPA1, o TRPV4 não parece participar do processo inflamatório no modelo de psoríase induzido por IMQ.

O IMQ é um agonista sintético que atua através da ativação de TLR7 e é utilizado para o tratamento de lesões provocadas pelo papiloma vírus. A aplicação clínica do IMQ foi relacionada com a indução de psoríase e agravamento das lesões em pacientes com psoríase (BONG *et al.*, 2002). Através da ativação de TLR7, o IMQ induz o processo inflamatório psoriático, caracterizado por eritema e infiltração de células na pele. Da mesma forma, a pele de camundongos mostrou muitas semelhanças com a psoríase humana envolvendo as mesmas vias de citocinas, principalmente a dependência do eixo IL-17/IL-23 (VAN DER FITS *et al.*, 2009; VAN BELLE *et al.*, 2012). Ao estudar o envolvimento do TRPV4 na psoríase através do modelo do IMQ não encontramos uma atuação direta de TRPV4 nos parâmetros inflamatórios avaliados.

Especulamos que o papel da TRPV4 no processo psoriático poderia envolver o recrutamento de células inflamatórias para o tecido, visto que o papel de TRPV4 em células imunes vem sendo melhor descrito e compreendido (DUTTA *et al.*, 2020). Na lesão pulmonar por exemplo, o TRPV4 medeia a fagocitose de macrófagos, a secreção de citocinas pró-resolutivas e a geração de espécies reativas de oxigênio (BALAKRISHNA *et al.*, 2014). Em ateromas, o TRPV4 regula a formação de células espumosas chamadas de '*foam cells*', que são macrófagos carregados de lipídios,

característicos dos ateromas, em resposta à rigidez da matriz e à estimulação de lipopolissacarídeos (XU *et al.*, 2016). Os dados da literatura também apontam para um papel do TRPV4 na atividade do macrófago na patogênese da resposta contra corpos estranhos, uma condição inflamatória crônica, através da formação de células gigantes de corpo estranho (DUTTA *et al.*, 2020). Porém, nesse modelo de psoríase induzida por IMQ, também não foi possível visualizar alterações decorrentes da deleção gênica de TRPV4 na migração de células inflamatórias para o tecido. De modo semelhante, com a utilização do antagonista de TRPV4 também não foi possível visualizar alteração na migração celular. Sendo assim, é necessária uma investigação mais aprofundada visto que a metodologia utilizada (coloração HE) não é específica para esses tipos celulares. Porém, esses resultados reforçam os dados obtidos *in vivo*, no qual sugere-se que o receptor TRPV4 parece não ser essencial no desenvolvimento das lesões psoriáticas.

Na psoríase, existe desequilíbrio entre proliferação e diferenciação (SEGRE, 2006; RAMOS-E-SILVA; JACQUES, 2012). A pele psoriática é caracterizada por níveis reduzidos de marcadores de diferenciação (K10), níveis aumentados de marcadores de proliferação epidérmica (PCNA), e também por níveis aumentados de citocinas inflamatórias na epiderme sendo que estes ainda contribuem para o aumento da proliferação. Acredita-se que a ativação de TRPV1, TRPV3, TRPV4 e TRPV6 diminui a proliferação e aumenta a diferenciação de queratinócitos, enquanto a formação de barreira cutânea é induzida pela ativação de TRPV1, TRPV3, TRPV4 e TRPV6 (ELSHOLZ *et al.*, 2014). Em outro estudo de Huang e colaboradores com uma linhagem de queratinócitos humanos imortalizados (HaCat) mostrou-se que o TRPV4 estava envolvido na diferenciação celular, através do aumento de cálcio induzido pelo flavonoide baicaleína (HUANG *et al.*, 2016).

Como o cálcio desempenha um papel crucial na homeostase dos queratinócitos (LEE; CATERINA, 2005), investigamos se o canal TRPV4 (um canal permeável a cálcio) contribuía para o aumento da proliferação dos queratinócitos de camundongos com psoríase induzida por IMQ. E, como o TRPV1 participa na disfunção da barreira epidérmica relatada na psoríase (ZHOU *et al.*, 2018), acreditava-se que o TRPV4 também pudesse participar de alguma forma desse processo. Nesse estudo, avaliamos a proliferação celular através da marcação de PCNA. Porém nossos resultados demonstraram que o aumento de PCNA promovido pelo IMQ não é alterado após a administração do antagonista HC-06747. Apesar de existirem outros

parâmetros que poderiam ser avaliados, aparentemente o TRPV4 parece não ter um envolvimento direto com a hiperproliferação epidérmica decorrente do estímulo com IMQ.

De qualquer maneira, encontra-se mais uma peça nesse enorme quebra-cabeça: diferente do que foi observado para outros TRPs, o receptor TRPV4 não parece participar dos mecanismos inflamatórios avaliados em nosso modelo de psoríase utilizando tanto animais com deleção gênica para o receptor TRPV4 quanto o antagonista HC-067047. O HC-067047 é um antagonista TRPV4 potente e seletivo, com atividade já relatada *in vivo*, e os resultados observados com o mesmo complementam os dados obtidos com os animais com deleção gênica para o receptor TRPV4.

Pouco se discute sobre os sintomas físicos não aparentes de pacientes com doenças de pele como prurido e fadiga associada, os quais também podem aumentar o sofrimento devido às múltiplas deficiências que os pacientes experimentam na vida diária (EVERS *et al.*, 2005). Além do prurido, pacientes com diferentes doenças de pele relatam diversas sensações como dor, formigamento, frio e calor (DARSOW *et al.*, 2001; DAWN *et al.*, 2009; SCHNEIDER *et al.*, 2015; STANDER *et al.*, 2015). Dados da literatura já tem mostrado o envolvimento do receptor TRPV4 na dor. De fato, foi evidenciado que o antagonismo de TRPV4 atenuou a dor neuropática (MATERAZZI *et al.*, 2012) e a dor induzida pela quimioterapia em ratos (ALESSANDRI-HABER *et al.*, 2004). Outros estudos mostram que animais tratados com estreptozotocina apresentaram hiperalgesia mecânica e hiperalgesia térmica ao frio, e o HC-067047 (1 mg/kg) administrado via subcutânea, diariamente, impediu significativamente o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica (DIAS *et al.*, 2019). Embora a dor não seja o sintoma que mais incomoda o paciente com psoríase, ela também está presente nesses pacientes (KITAKA; TOMINAGA, 2017). No entanto, o envolvimento do TRPV4 na dor psoriática ainda não havia sido relatado.

No presente trabalho, foi observado que a aplicação de IMQ causa hiperalgesia mecânica nos animais. Essa é a primeira vez que se observa uma queda no limiar da dor em modelo de psoríase induzida por IMQ. No entanto, os dados obtidos mostraram que tanto a deleção gênica como o bloqueio do receptor com a utilização do antagonista de TRPV4, não foram capazes de inibir a hiperalgesia mecânica causada pelo IMQ. Sugerindo que embora o TRPV4 participe de alguns processos de dor, na dor psoriática induzida por IMQ esse canal parece não estar envolvido.

Com relação ao prurido, existe uma forte associação entre ele e a redução da qualidade de vida, sendo importante a avaliação da dimensão psicossomática para o paciente (ELEWSKI *et al.*, 2019). Importante ressaltar que de acordo com a literatura, o prurido parece ser um fenômeno bastante constante em pacientes com depressão. Trata-se de um sintoma que afeta diretamente a qualidade de vida do paciente e por isso o objetivo é identificar os mecanismos subjacentes do prurido nas doenças de pele e estabelecer uma terapia direcionada (CACCAVALE *et al.*, 2016; SCHUT *et al.*, 2019).

Mesmo acreditando-se que não existe correlação entre a gravidade da doença e a intensidade do prurido em pacientes com psoríase (ROBLIN *et al.*, 2014), o prurido foi relatado em 60-90% dos pacientes com psoríase (REICH; SZEPIETOWSKI, 2014). Várias substâncias foram associadas ao prurido na psoríase, incluindo fator de crescimento neural (NGF), substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), neuropeptídeo Y (NPY) e produto do gene da proteína 9.5 (PGP 9.5). Em geral, esses neuropeptídeos têm sido implicados na fisiopatologia do prurido via receptores ativados por protease (PAR-2) (ELEWSKI *et al.*, 2019).

Canais TRPs no nervo sensorial também contribuem para o prurido, mas acredita-se que a expressão de TRPV3 e TRPV4 em queratinócitos, em níveis muito mais altos do que os observados nos neurônios, possam estar envolvidos no prurido não histaminérgico. Mediadores como PGE2 e ATP que ativam os neurônios no DRG também podem estar ativando os canais TRP nos queratinócitos (LEE; LEE, 2018).

Um dos principais efeitos colaterais do IMQ é o prurido. Sugere-se que a sinalização do prurido induzido por IMQ é devida à co-expressão dos receptores TLR7 com os receptores TRPV1 no DRG (KITAKA; TOMINAGA, 2017). Embora os mecanismos pelos quais o IMQ cause potenciais de ação nos neurônios DRG permaneçam desconhecidos, o TRPV4 parece estar fortemente envolvido (SAKAI *et al.*, 2016).

Em estudo anteriores, mostrou-se que na psoríase, o prurido pode ser desencadeado por diferentes estímulos químicos (histamina, serotonina, etc). Embora os estudos não mostrem a participação do TRPV4 no prurido psoriático no modelo de IMQ, sabe-se que a deleção de TRPV4 em macrófagos e queratinócitos suprime o prurido alérgico e não alérgico, respectivamente, em modelos animais para avaliação de prurido (LUO *et al.*, 2015; LUO *et al.*, 2018). Outro estudo também relata que os queratinócitos dependem do influxo de cálcio mediado pelo TRPV4 na resposta à

histamina (CHEN *et al.*, 2016). Sendo assim, fica evidente que a expressão de TRPV4 nos queratinócitos é importante para o prurido. Além disso, estudos mostram que as respostas intracelulares de cálcio para a histamina e serotonina são reduzidas em queratinócitos tratados com o antagonista de TRPV4 (HASHIMOTO *et al.*, 2019).

Neste trabalho, foi evidenciado a importância do TRPV4 no prurido psoriático induzido pelo IMQ. Os resultados encontrados mostraram uma redução no tempo de prurido tanto em animais nocautes para o TRPV4 quanto pelo bloqueio realizado com o antagonista deste receptor. Apesar de não ter sido investigado o mecanismo pelo qual o TRPV4 estaria envolvido na coceira ocasionada pelo IMQ, o envolvimento deste receptor ficou bastante evidente nos resultados encontrados. Sabe-se que o TRPV4 é regulado positivamente na pele de indivíduos com certas condições de coceira (YANG *et al.*, 2015; MOORE *et al.*, 2018). Em estudo realizado por Akiyama e colaboradores (2016) mostrou que camundongos com deleção gênica para TRPV4 apresentaram uma redução significativa no comportamento de coceira em resposta à serotonina, mas não à histamina, cloroquina ou agonista de PAR2/MrgprC11. No mesmo estudo, utilizando HC-067047, 10 mg/kg, via intraperitoneal, verificaram redução da quantidade de arranhões provocados pela serotonina. Com isso, existem evidências que o TRPV4 é crítico para a sinalização da serotonina em camundongos normais (AKIYAMA *et al.*, 2016). A coceira mediada por serotonina é bastante complexa pois existem numerosos receptores de serotonina expressos nos neurônios aferentes primários, bem como em mediadores imunológicos que podem estar envolvidos (SNYDER *et al.*, 2016).

Akiyama e colaboradores (2016) também descobriram que cerca de 90% dos neurônios sensoriais que respondem à serotonina, expressam TRPV4. Também verificaram que a ativação pela serotonina é dependente do TRPV4 e que, apenas a proporção dos neurônios que responderam à serotonina, estava reduzida significativamente em camundongos com deleção gênica para o TRPV4. E ainda, para identificar o receptor através do qual a serotonina atuava, os autores usaram antagonistas específicos ao subtipo para 5-HT1 e 5-HT2 e verificaram que existe a possibilidade de que 5-HT2, agindo via TRPV4, seja um dos principais mediadores da coceira evocada por serotonina. Assim, parece haver pelo menos duas vias distintas através das quais a serotonina medeia a coceira: uma via dependente de TRPA1 que medeia a coceira mediada por 5-HT7, bem como uma via dependente de

TRPV4 que provavelmente medeia a coceira mediada por 5-HT₂ (AKIYAMA *et al.*, 2016).

Interessantemente, além da melhora no prurido, foi possível também observar um aumento no bem-estar dos animais com a deleção gênica para receptor TRPV4, embora, essa melhora não tenha sido significativa após o tratamento com o antagonista do TRPV4. Essa diferença observada entre os dados obtidos com os animais com deleção gênica para o TRPV4 e o uso do antagonista, possivelmente está relacionado com a dose do antagonista utilizado nesse estudo. Nesse sentido, uma curva dose resposta com o antagonista poderia elucidar esse ponto. No entanto, com base nos dados aqui apresentados é possível observar tanto uma melhora no prurido bem como na qualidade de vida dos animais. É possível sugerir que a redução do prurido tenha impactado na melhora da qualidade de vida. No entanto, não podemos descartar que a melhora na qualidade de vida dos animais também possa estar ocorrendo por uma modulação do TRPV4 no sistema nervoso central (SNC). No entanto, diferente do que se observa para o TRPV1 e TRPA1, em que ambos estão envolvidos na ansiedade e/ou depressão (DE MOURA *et al.*, 2014) pouco se sabe sobre o papel do TRPV4 no SNC.

Até pouco tempo atrás, a abordagem clínica das doenças dermatológicas se baseava no reconhecimento da doença e seu respectivo tratamento. Atualmente, com os avanços na compreensão biológica das doenças, é possível diagnosticar e tratar os processos subjacentes da doença para aumentar a qualidade de vida do paciente. Isso significa que, ao invés do tratamento ser focado na doença que acomete o paciente, é possível abordar também os distúrbios patológicos específicos que cada paciente pode apresentar, levando maiores benefícios para os pacientes e a saúde da sociedade em geral (BLUME-PEYTAVI *et al.*, 2019).

Nesse sentido, embora os resultados obtidos nesse estudo não tenham demonstrado uma melhora nas lesões psoriáticas, nem na hiperalgesia mecânica, fica evidente o envolvimento do receptor TRPV4 na melhora do prurido e na qualidade de vida. Esses dois sintomas, são de extrema relevância para o paciente psoriático, uma vez que a maior queixa dos pacientes não está relacionada a dor nas lesões psoriáticas, mas sim com o prurido e a queda da qualidade de vida nesses pacientes. Nos últimos anos tem crescido o número de artigos que avaliam a qualidade de vida em pacientes com psoríase (OTUKI *et al.*, 2011; MATTEI *et al.*, 2014; SANCLEMENTE *et al.*, 2017). Além disso, muitos estudos tentam relacionar os sintomas apresentados

pelos pacientes psoriáticos e seu impacto na qualidade de vida deles (SARKAR *et al.*, 2016). Em 2009, Globe e colaboradores mostram um estudo no qual a maioria dos pacientes classificam o prurido como o sintoma mais importante (31/39 pacientes avaliados), mais grave (31/39 pacientes avaliados) e mais problemático (24/39, pacientes avaliados) e observaram que o prurido afetava negativamente as atividades diárias (por exemplo, concentração, sono, capacidade de frequentar trabalho ou escola), bem como emoções (por exemplo, ansiedade e vergonha) desses pacientes (GLOBE *et al.*, 2009). Nesse sentido, o TRPV4 poderia ser um novo alvo molecular para o desenvolvimento de fármacos que melhoram não somente o prurido mas que também interferem no parâmetro de bem-estar psoríase ou outros problemas de pele em que esses sintomas estão presentes.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo é o primeiro a investigar o papel do receptor TRPV4 no processo psoriático em camundongos. Os resultados obtidos indicam que o TRPV4 não promove melhora nas condições inflamatórias promovidas pelo IMQ, porém parece estar relacionado com o bem-estar animal e redução do prurido provocado pelo IMQ. Estudos posteriores serão necessários para elucidar os mecanismos pelos quais o TRPV4 possa estar reduzindo o prurido e melhorando a qualidade de vida de pacientes com psoríase.

REFERÊNCIAS

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Pacientes terão novos medicamentos para tratamento da psoríase, de 17 de Setembro de 2019. Disponível em: <<https://saude.gov.br/noticias/agencia-saude/45808-pacientes-terao-novos-medicamentos-para-tratamento-da-psoriase>> Acessado em: 12/12/2019.

AKIYAMA, T. *et al.* Enhanced scratching evoked by PAR-2 agonist and 5-HT but not histamine in a mouse model of chronic dry skin itch. **Pain**, v.151, n.2, Nov, p.378-83. 2010.

AKIYAMA, T. *et al.* Involvement of TRPV4 in Serotonin-Evoked Scratching. **J Invest Dermatol**, v.136, n.1, Jan, p.154-160. 2016.

ALESSANDRI-HABER, N. *et al.* A transient receptor potential vanilloid 4-dependent mechanism of hyperalgesia is engaged by concerted action of inflammatory mediators. **J Neurosci**, v.26, n.14, Apr 5, p.3864-74. 2006.

ALESSANDRI-HABER, N. *et al.* Transient receptor potential vanilloid 4 is essential in chemotherapy-induced neuropathic pain in the rat. **J Neurosci**, v.24, n.18, May 5, p.4444-52. 2004.

ALESSANDRI-HABER, N. *et al.* Hypotonicity induces TRPV4-mediated nociception in rat. **Neuron**, v.39, n.3, Jul 31, p.497-511. 2003.

ARMSTRONG, A. *et al.* Patient perceptions of clear/almost clear skin in moderate-to-severe plaque psoriasis: results of the Clear About Psoriasis worldwide survey. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v.32, n.12, Dec, p.2200-2207. 2018.

ATOBE, M. Discovery of Novel Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) Agonists as Regulators of Chondrogenic Differentiation: Identification of Quinazolin-4(3 H)-ones and in Vivo Studies on a Surgically Induced Rat Model of Osteoarthritis. v.62, n.3, Feb 14, p.1468-1483. 2019.

BALAKRISHNA, S. *et al.* TRPV4 inhibition counteracts edema and inflammation and improves pulmonary function and oxygen saturation in chemically induced acute lung injury. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v.307, n.2, Jul 15, p.L158-72. 2014.

BARATCHI, S. *et al.* **A microfluidic platform to study the mechano sensational properties of ion channels**: SPIE, v.8923. 2013 (SPIE Micro+Nano Materials, Devices, and Applications)

BARBARROJA, N. *et al.* Cardiovascular risk factors in psoriatic disease: psoriasis versus psoriatic arthritis. **Ther Adv Musculoskelet Dis**, v.11, p.1759720x19880742. 2019.

BENEMEI, S. *et al.* TRP channels. **Curr Opin Pharmacol**, v.22, Jun, p.18-23. 2015.

- BLUME-PEYTAVI, U. *et al.* Dermatology today and tomorrow: from symptom control to targeted therapy. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v.33 Suppl 1, Jan, p.3-36. 2019.
- BOCHENSKA, K. *et al.* Models in the Research Process of Psoriasis. **Int J Mol Sci**, v.18, n.12, Nov 24. 2017.
- BOEHNCKE, W. H.; SCHON, M. P. Psoriasis. **Lancet**, v.386, n.9997, Sep 5, p.983-94. 2015.
- BONG, A. B. *et al.* Imiquimod, a topical immune response modifier, in the treatment of cutaneous metastases of malignant melanoma. **Dermatology**, v.205, n.2, p.135-8. 2002.
- BRANDON, A. *et al.* Diagnosis and Management of Cutaneous Psoriasis: A Review. **Adv Skin Wound Care**, v.32, n.2, Feb, p.58-69. 2019.
- CACCAVALE, S. *et al.* Skin and brain: itch and psychiatric disorders. **G Ital Dermatol Venereol**, v.151, n.5, Oct, p.525-9. 2016.
- CALMAN, K. C. Quality of life in cancer patients--an hypothesis. **J Med Ethics**, v.10, n.3, Sep, p.124-7. 1984.
- CARCANO, C. B. M. *et al.* The Brazilian version of Skindex-16 is a valid and reliable instrument to assess the health-related quality of life of patients with skin diseases. **PLoS One**, v.13, n.3, p.e0194492. 2018.
- CATERINA, M. J.; PANG, Z. TRP Channels in Skin Biology and Pathophysiology. **Pharmaceuticals (Basel)**, v.9, n.4, Dec 14. 2016.
- CENAC, N. *et al.* Potentiation of TRPV4 signalling by histamine and serotonin: an important mechanism for visceral hypersensitivity. **Gut**, v.59, n.4, Apr, p.481-8. 2010.
- CHAPLAN, S. R. *et al.* Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**, v.53, n.1, 1994/07/01/, p.55-63. 1994.
- CHEN, Y. *et al.* Transient Receptor Potential Vanilloid 4 Ion Channel Functions as a Pruriceptor in Epidermal Keratinocytes to Evoke Histaminergic Itch. **J Biol Chem**, v.291, n.19, May 6, p.10252-62. 2016.
- CHEN, Y. *et al.* TRPV4 Moves toward Center-Fold in Rosacea Pathogenesis. **J Invest Dermatol**, v.137, n.4, Apr, p.801-804. 2017.
- CHUN, J. N. *et al.* A network perspective on unraveling the role of TRP channels in biology and disease. **Pflugers Arch**, v.466, n.2, Feb, p.173-82. 2014.
- COHEN, S. N. *et al.* Guidance on the diagnosis and clinical management of psoriasis. **Clin Exp Dermatol**, v.37 Suppl 1, May, p.13-8. 2012.
- DANILENKO, D. M. Review paper: preclinical models of psoriasis. **Vet Pathol**, v.45, n.4, Jul, p.563-75. 2008.

DARBY, W. G. *et al.* Modulation of TRPV4 by diverse mechanisms. **Int J Biochem Cell Biol**, v.78, Sep, p.217-228. 2016.

DARSOW, U. *et al.* New aspects of itch pathophysiology: component analysis of atopic itch using the 'Eppendorf Itch Questionnaire'. **Int Arch Allergy Immunol**, v.124, n.1-3, Jan-Mar, p.326-31. 2001.

DAWN, A. *et al.* Itch characteristics in atopic dermatitis: results of a web-based questionnaire. **Br J Dermatol**, v.160, n.3, Mar, p.642-4. 2009.

DE MOURA, J. C. *et al.* The blockade of transient receptor potential ankirin 1 (TRPA1) signalling mediates antidepressant- and anxiolytic-like actions in mice. **Br J Pharmacol**, v.171, n.18, Sep, p.4289-99. 2014.

DEACON, R. M. Assessing nest building in mice. **Nat Protoc**, v.1, n.3, p.1117-9. 2006.

DENDA, M. *et al.* Effects of skin surface temperature on epidermal permeability barrier homeostasis. **J Invest Dermatol**, v.127, n.3, Mar, p.654-9. 2007.

DIAS, F. C. *et al.* The selective TRPV4 channel antagonist HC-067047 attenuates mechanical allodynia in diabetic mice. **Eur J Pharmacol**, v.856, Aug 5, p.172408. 2019.

DIBONAVENTURA, M. *et al.* The association between psoriasis and health-related quality of life, work productivity, and healthcare resource use in Brazil. **An Bras Dermatol**, v.93, n.2, Mar, p.197-204. 2018.

DIXON, W. J. Efficient analysis of experimental observations. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.20, p.441-62. 1980.

DOWLATSHAHI, E. A. *et al.* Markers of systemic inflammation in psoriasis: a systematic review and meta-analysis. **Br J Dermatol**, v.169, n.2, Aug, p.266-82. 2013.

DUAN, J. *et al.* Exposure to both formaldehyde and high relative humidity exacerbates allergic asthma by activating the TRPV4-p38 MAPK pathway in Balb/c mice. **Environ Pollut**, v.256, Jan, p.113375. 2020.

DUTTA, B. *et al.* Role of macrophage TRPV4 in inflammation. **Lab Invest**, v.100, n.2, Feb, p.178-185. 2020.

ECKERT, R. L. Structure, function, and differentiation of the keratinocyte. **Physiol Rev**, v.69, n.4, Oct, p.1316-46. 1989.

ELEWSKI, B. *et al.* Itch: an under-recognized problem in psoriasis. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v.33, n.8, Aug, p.1465-1476. 2019.

ELSHOLZ, F. *et al.* Calcium--a central regulator of keratinocyte differentiation in health and disease. **Eur J Dermatol**, v.24, n.6, Nov-Dec, p.650-61. 2014.

EVERAERTS, W. *et al.* The vanilloid transient receptor potential channel TRPV4: from structure to disease. **Prog Biophys Mol Biol**, v.103, n.1, Sep, p.2-17. 2010.

EVERS, A. W. *et al.* Common burden of chronic skin diseases? Contributors to psychological distress in adults with psoriasis and atopic dermatitis. **Br J Dermatol**, v.152, n.6, Jun, p.1275-81. 2005.

FANTI, P. A. *et al.* Generalized psoriasis induced by topical treatment of actinic keratosis with imiquimod. **Int J Dermatol**, v.45, n.12, Dec, p.1464-5. 2006.

FINLAY, A. Y.; COLES, E. C. The effect of severe psoriasis on the quality of life of 369 patients. **Br J Dermatol**, v.132, n.2, Feb, p.236-44. 1995.

FU, M.; WANG, G. Keratin 17 as a therapeutic target for the treatment of psoriasis. **J Dermatol Sci**, v.67, n.3, Sep, p.161-5. 2012.

FU, Y. *et al.* Association of Psoriasis With Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. **JAMA Dermatol**, v.154, n.12, Dec 1, p.1417-1423. 2018.

FUSI, C. *et al.* Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) is downregulated in keratinocytes in human non-melanoma skin cancer. **J Invest Dermatol**, v.134, n.9, Sep, p.2408-2417. 2014.

GARCIA-ELIAS, A. *et al.* The TRPV4 channel. **Handb Exp Pharmacol**, v.222, p.293-319. 2014.

GILLIET, M. *et al.* Psoriasis triggered by toll-like receptor 7 agonist imiquimod in the presence of dermal plasmacytoid dendritic cell precursors. **Arch Dermatol**, v.140, n.12, Dec, p.1490-5. 2004.

GLOBE, D. *et al.* The impact of itch symptoms in psoriasis: results from physician interviews and patient focus groups. **Health Qual Life Outcomes**, v.7, Jul 6, p.62. 2009.

GOLDENBERG, N. M. *et al.* TRPV4: physiological role and therapeutic potential in respiratory diseases. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v.388, n.4, Apr, p.421-36. 2015.

GORELICK, J. *et al.* Understanding Treatment Preferences in Patients with Moderate to Severe Plaque Psoriasis in the USA: Results from a Cross-Sectional Patient Survey. **Dermatol Ther (Heidelb)**, Oct 19. 2019.

GORUNTLA, N. *et al.* Comparison of efficacy, safety, and cost-effectiveness of topical salicylic acid 6% versus clobetasol propionate 0.05% in the treatment of limited chronic plaque psoriasis. **Journal of Health Research and Reviews**, v.5, n.2, May 1, 2018, p.86-92. 2018.

GOUIN, O. *et al.* TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation: pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization. **Protein Cell**, v.8, n.9, Sep, p.644-661. 2017.

- GOYAL, N. *et al.* Clinical Pharmacokinetics, Safety, and Tolerability of a Novel, First-in-Class TRPV4 Ion Channel Inhibitor, GSK2798745, in Healthy and Heart Failure Subjects. **Am J Cardiovasc Drugs**, v.19, n.3, Jun, p.335-342. 2019.
- GRACE, M. S. *et al.* Modulation of the TRPV4 ion channel as a therapeutic target for disease. **Pharmacol Ther**, v.177, Sep, p.9-22. 2017.
- GRANT, A. D. *et al.* Protease-activated receptor 2 sensitizes the transient receptor potential vanilloid 4 ion channel to cause mechanical hyperalgesia in mice. **J Physiol**, v.578, n.Pt 3, Feb 1, p.715-33. 2007.
- GRILLS, N. *et al.* Prevalence survey of dermatological conditions in mountainous north India. **Int J Dermatol**, v.51, n.5, May, p.579-87. 2012.
- GUPTA, R. *et al.* Genetic Epidemiology of Psoriasis. **Curr Dermatol Rep**, v.3, n.1, Mar, p.61-78. 2014.
- HIDDING, J. *et al.* Sensory Qualities Point to Different Structural and Functional Skin Patterns in Chronic Pruritus Patients. A Translational Explorative Study. **Acta Derm Venereol**, v.99, n.7, Jun 1, p.668-674. 2019.
- HOLZER, P. Transient receptor potential (TRP) channels as drug targets for diseases of the digestive system. **Pharmacol Ther**, v.131, n.1, Jul, p.142-70. 2011.
- HUANG, K. F. *et al.* Baicalein increases keratin 1 and 10 expression in HaCaT keratinocytes via TRPV4 receptor activation. **Exp Dermatol**, v.25, n.8, Aug, p.623-9. 2016.
- JACOBSON, C. C. *et al.* Latitude and psoriasis prevalence. **J Am Acad Dermatol**, v.65, n.4, Oct, p.870-3. 2011.
- JAYO, M. J. *et al.* Psoriatic plaques in *Macaca fascicularis*. **Vet Pathol**, v.25, n.4, Jul, p.282-5. 1988.
- JENSEN, P.; SKOV, L. Psoriasis and Obesity. **Dermatology**, v.232, n.6, p.633-639. 2016.
- JIE, P. *et al.* Blockage of transient receptor potential vanilloid 4 inhibits brain edema in middle cerebral artery occlusion mice. **Front Cell Neurosci**, v.9, p.141. 2015.
- JORDT, S. E.; EHRLICH, B. E. TRP channels in disease. **Subcell Biochem**, v.45, p.253-71. 2007.
- KAAZ, K. *et al.* Sleep quality among adult patients with chronic dermatoses. **Postepy Dermatol Alergol**, v.36, n.6, Dec, p.659-666. 2019.
- KARASAWA, T. *et al.* TRPV4 enhances the cellular uptake of aminoglycoside antibiotics. **J Cell Sci**, v.121, n.Pt 17, Sep 1, p.2871-9. 2008.

KARIMKHANI, C. *et al.* Global Skin Disease Morbidity and Mortality: An Update From the Global Burden of Disease Study 2013. **JAMA Dermatol**, v.153, n.5, May 1, p.406-412. 2017.

KEMENY, A. *et al.* TRPA1 Acts in a Protective Manner in Imiquimod-Induced Psoriasiform Dermatitis in Mice. **J Invest Dermatol**, v.138, n.8, Aug, p.1774-1784. 2018.

KIDA, N. *et al.* Importance of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) in epidermal barrier function in human skin keratinocytes. **Pflugers Arch**, v.463, n.5, Apr, p.715-25. 2012.

KILKENNY, C. *et al.* Animal research: reporting in vivo experiments--the ARRIVE guidelines. **J Cereb Blood Flow Metab**, v.31, n.4, Apr, p.991-3. 2011.

KITTAKA, H.; TOMINAGA, M. The molecular and cellular mechanisms of itch and the involvement of TRP channels in the peripheral sensory nervous system and skin. **Allergol Int**, v.66, n.1, Jan, p.22-30. 2017.

KLAUSEN, T. K. *et al.* Modulation of the transient receptor potential vanilloid channel TRPV4 by 4alpha-phorbol esters: a structure-activity study. **J Med Chem**, v.52, n.9, May 14, p.2933-9. 2009.

KLIJN, S. L.; VAN DEN REEK, J. Biologic treatment sequences for plaque psoriasis: a cost-utility analysis based on 10 years of Dutch real-world evidence from BioCAPTURE. v.178, n.5, May, p.1181-1189. 2018.

KOCHUKOV, M. Y. *et al.* Thermosensitive TRP ion channels mediate cytosolic calcium response in human synoviocytes. **Am J Physiol Cell Physiol**, v.291, n.3, Sep, p.C424-32. 2006.

KOLARSICK, P. A. J. *et al.* Anatomy and Physiology of the Skin. **Journal of the Dermatology Nurses' Association**, v.3, n.4, p.203-213. 2011.

KROMER, C. *et al.* Biologicals and small molecules in psoriasis: A systematic review of economic evaluations. v.13, n.1, p.e0189765. 2018.

LAING, R. J.; DHAKA, A. ThermoTRPs and Pain. **The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry**, v.22, n.2, p.171-187. 2016.

LAWHORN, B. G. *et al.* Recent advances in TRPV4 agonists and antagonists. **Bioorg Med Chem Lett**, Feb 8, p.127022. 2020.

LEE, H.; CATERINA, M. J. TRPV channels as thermosensory receptors in epithelial cells. **Pflugers Arch**, v.451, n.1, Oct, p.160-7. 2005.

LEE, S. E.; LEE, S. H. Skin Barrier and Calcium. v.30, n.3, Jun, p.265-275. 2018.

- LEE, Y. W. *et al.* Efficacy and safety of PAC-14028 cream - a novel, topical, nonsteroidal, selective TRPV1 antagonist in patients with mild-to-moderate atopic dermatitis: a phase IIb randomized trial. *v.180, n.5, May, p.1030-1038. 2019.*
- LI, B. *et al.* Transcriptome analysis of psoriasis in a large case-control sample: RNA-seq provides insights into disease mechanisms. **J Invest Dermatol**, v.134, n.7, Jul, p.1828-1838. 2014.
- LI, H. TRP Channel Classification. **Adv Exp Med Biol**, v.976, p.1-8. 2017.
- LIEDTKE, W. *et al.* Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. **Cell**, v.103, n.3, Oct 27, p.525-35. 2000.
- LIEDTKE, W.; FRIEDMAN, J. M. Abnormal osmotic regulation in *trpv4*^{-/-} mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.100, n.23, Nov 11, p.13698-703. 2003.
- LIEDTKE, W. *et al.* Keratinocyte growth regulation TRP-ed up over downregulated TRPV4? **J Invest Dermatol**, v.134, n.9, Sep, p.2310-2312. 2014.
- LIU, B. *et al.* TRPA1 controls inflammation and pruritogen responses in allergic contact dermatitis. **Faseb j**, v.27, n.9, Sep, p.3549-63. 2013.
- LUO, J. *et al.* Molecular and cellular mechanisms that initiate pain and itch. **Cell Mol Life Sci**, v.72, n.17, Sep, p.3201-23. 2015.
- LUO, J. *et al.* Transient receptor potential vanilloid 4-expressing macrophages and keratinocytes contribute differentially to allergic and nonallergic chronic itch. **J Allergy Clin Immunol**, v.141, n.2, Feb, p.608-619.e7. 2018.
- MAHE, A. *et al.* The proportion of medical consultations motivated by skin diseases in the health centers of Bamako (Republic of Mali). **Int J Dermatol**, v.36, n.3, Mar, p.185-6. 1997.
- MARTINS, D. *et al.* "Hotheaded": the role OF TRPV1 in brain functions. **Neuropharmacology**, v.85, Oct, p.151-7. 2014.
- MASCARENHAS, N. L. *et al.* TRPV4 Mediates Mast Cell Activation in Cathelicidin-Induced Rosacea Inflammation. **J Invest Dermatol**, v.137, n.4, Apr, p.972-975. 2017.
- MASON, A. R. *et al.* Topical treatments for chronic plaque psoriasis of the scalp: a systematic review. **Br J Dermatol**, v.169, n.3, Sep, p.519-27. 2013.
- MATERAZZI, S. *et al.* TRPA1 and TRPV4 mediate paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice via a glutathione-sensitive mechanism. **Pflugers Arch**, v.463, n.4, Apr, p.561-9. 2012.
- MATTEI, P. L. *et al.* Psoriasis Area Severity Index (PASI) and the Dermatology Life Quality Index (DLQI): the correlation between disease severity and psychological burden in patients treated with biological therapies. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v.28, n.3, Mar, p.333-7. 2014.

MICHALEK, I. M. *et al.* A systematic review of worldwide epidemiology of psoriasis. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v.31, n.2, Feb, p.205-212. 2017.

MICKLE, A. D. *et al.* Sensory TRP channels: the key transducers of nociception and pain. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v.131, p.73-118. 2015.

MIHARA, H. *et al.* Transient Receptor Potential Vanilloid 4 Regulation of Adenosine Triphosphate Release by the Adenosine Triphosphate Transporter Vesicular Nucleotide Transporter, a Novel Therapeutic Target for Gastrointestinal Baroreception and Chronic Inflammation. **Digestion**, v.101, n.1, p.6-11. 2020.

MIOT, H. A. Profile of dermatological consultations in Brazil (2018). v.93, n.6, Nov/Dec, p.916-928. 2018.

MONTELL, C.; RUBIN, G. M. Molecular characterization of the *Drosophila trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. **Neuron**, v.2, n.4, Apr, p.1313-23. 1989.

MOORE, C. *et al.* Regulation of Pain and Itch by TRP Channels. v.34, n.1, Feb, p.120-142. 2018.

MORAN, M. M. *et al.* Transient receptor potential channels as therapeutic targets. **Nat Rev Drug Discov**, v.10, n.8, Aug 1, p.601-20. 2011.

MORITA, T. *et al.* HTR7 Mediates Serotonergic Acute and Chronic Itch. **Neuron**, v.87, n.1, Jul 1, p.124-38. 2015.

NAKAJIMA, K.; SANO, S. Mouse models of psoriasis and their relevance. v.45, n.3, Mar, p.252-263. 2018.

NALDI, L. Psoriasis and smoking: links and risks. **Psoriasis (Auckl)**, v.6, p.65-71. 2016.

NESTLE, F. O. *et al.* Psoriasis. **New England Journal of Medicine**, v.361, n.5, p.496-509. 2009.

NESTLE, F. O. *et al.* Psoriasis. **N Engl J Med**, v.361, n.5, Jul 30, p.496-509. 2009.

NILIUS, B.; SZALLASI, A. Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine. **Pharmacol Rev**, v.66, n.3, Jul, p.676-814. 2014.

NOROES, M. M. *et al.* Role of TRPA1 receptors in skin inflammation induced by volatile chemical irritants in mice. **Eur J Pharmacol**, v.858, Sep 5, p.172460. 2019.

ORTONNE, J. P. Aetiology and pathogenesis of psoriasis. **Br J Dermatol**, v.135 Suppl 49, Oct, p.1-5. 1996.

OTUKI, M. F. *et al.* Patient-reported outcomes in psoriasis research and practice. **Br J Dermatol**, v.165, n.6, Dec, p.1361-2. 2011.

PARISI, R. *et al.* Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence. **J Invest Dermatol**, v.133, n.2, Feb, p.377-85. 2013.

PEREZ-CHADA, L. *et al.* Achieving Consensus on Patient-Reported Outcome Measures in Clinical Practice for Inflammatory Skin Disorders: On Behalf of International Dermatology Outcome Measures and the American Academy of Dermatology. **J Am Acad Dermatol**, Sep 13. 2019.

PLANT, T. D.; STROTMANN, R. TRPV4. **Handb Exp Pharmacol**, n.179, p.189-205. 2007.

RAJAN, N.; LANGTRY, J. A. Generalized exacerbation of psoriasis associated with imiquimod cream treatment of superficial basal cell carcinomas. **Clin Exp Dermatol**, v.31, n.1, Jan, p.140-1. 2006.

RAMOS-E-SILVA, M.; JACQUES, C. Epidermal barrier function and systemic diseases. **Clin Dermatol**, v.30, n.3, May-Jun, p.277-9. 2012.

RANDHAWA, P. K.; JAGGI, A. S. TRPV4 channels: physiological and pathological role in cardiovascular system. **Basic Res Cardiol**, v.110, n.6, Nov, p.54. 2015.

REICH, A.; SZEPIETOWSKI, J. C. Frontiers in Neuroscience Clinical Aspects of Itch: Psoriasis. (2014). In: Carstens, E.;Akiyama, T. **Itch: Mechanisms and Treatment**CRC Press/Taylor & Francis (c) 2014 by Taylor & Francis Group, LLC.:

RICHMOND, J. M.; HARRIS, J. E. Immunology of the Skin. (2016). In: Ratcliffe, M. J. H. **Encyclopedia of Immunobiology**Academic Press: 30-36.

RING, J. Quality of life - an essential parameter for dermatology. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v.31, n.4, Apr, p.573. 2017.

RIOL-BLANCO, L. *et al.* Nociceptive sensory neurons drive interleukin-23-mediated psoriasiform skin inflammation. **Nature**, v.510, n.7503, Jun 5, p.157-61. 2014.

RITCHLIN, C. T. *et al.* Psoriatic Arthritis. **N Engl J Med**, v.376, n.10, Mar 9, p.957-970. 2017.

ROBLIN, D. *et al.* Pruritus severity in patients with psoriasis is not correlated with psoriasis disease severity. **J Am Acad Dermatol**, v.70, n.2, Feb, p.390-1. 2014.

RYSKAMP, D. A. *et al.* TRPV4 regulates calcium homeostasis, cytoskeletal remodeling, conventional outflow and intraocular pressure in the mammalian eye. **Sci Rep**, v.6, Aug 11, p.30583. 2016.

SABAT, R. *et al.* Immunopathogenesis of psoriasis. **Exp Dermatol**, v.16, n.10, Oct, p.779-98. 2007.

SAKAI, K. *et al.* Mouse model of imiquimod-induced psoriatic itch. **Pain**, v.157, n.11, Nov, p.2536-2543. 2016.

SANCLEMENTE, G. *et al.* The impact of skin diseases on quality of life: A multicenter study. **Actas Dermosifiliogr**, v.108, n.3, Apr, p.244-252. 2017.

SARKAR, R. *et al.* General measures and quality of life issues in psoriasis. **Indian Dermatol Online J**, v.7, n.6, Nov-Dec, p.481-488. 2016.

SAW, S. M. *et al.* A population-based prevalence survey of skin diseases in adolescents and adults in rural Sumatra, Indonesia, 1999. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.95, n.4, Jul-Aug, p.384-8. 2001.

SCHNEIDER, G. *et al.* Cutaneous sensory function is not related to depression and anxiety in patients with chronic pruritus with dysesthetic subqualities. **Acta Derm Venereol**, v.95, n.3, Mar, p.289-93. 2015.

SCHRADER, N. H. B. *et al.* Pain Quality Assessment Scale for Epidermolysis Bullosa. **Acta Derm Venereol**, v.98, n.3, Mar 13, p.346-349. 2018.

SCHUT, C. *et al.* Occurrence, Chronicity and Intensity of Itch in a Clinical Consecutive Sample of Patients with Skin Diseases: A Multi-centre Study in 13 European Countries. **Acta Derm Venereol**, v.99, n.2, Feb 1, p.146-151. 2019.

SEGOND VON BANCHET, G. *et al.* Neuronal IL-17 receptor upregulates TRPV4 but not TRPV1 receptors in DRG neurons and mediates mechanical but not thermal hyperalgesia. **Mol Cell Neurosci**, v.52, Jan, p.152-60. 2013.

SEGRE, J. A. Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. **J Clin Invest**, v.116, n.5, May, p.1150-8. 2006.

SERVIN-VENCES, M. R. *et al.* Direct measurement of TRPV4 and PIEZO1 activity reveals multiple mechanotransduction pathways in chondrocytes. v.6, Jan 30. 2017.

SETH, D. *et al.* Global Burden of Skin Disease: Inequities and Innovations. **Curr Dermatol Rep**, v.6, n.3, Sep, p.204-210. 2017.

SIJERCIC, I. *et al.* A Systematic Review of Cognitive and Behavioral Treatments for Individuals with Psoriasis. **J Dermatolog Treat**, Nov 7, p.1-26. 2019.

SILVA, C. R. *et al.* The involvement of TRPA1 channel activation in the inflammatory response evoked by topical application of cinnamaldehyde to mice. **Life Sci**, v.88, n.25-26, Jun 20, p.1077-87. 2011.

SNYDER, L. M. *et al.* An Unexpected Role for TRPV4 in Serotonin-Mediated Itch. **J Invest Dermatol**, v.136, n.1, Jan, p.7-9. 2016.

SOKABE, T. *et al.* The TRPV4 channel contributes to intercellular junction formation in keratinocytes. **J Biol Chem**, v.285, n.24, Jun 11, p.18749-58. 2010.

SOKABE, T.; TOMINAGA, M. The TRPV4 cation channel: A molecule linking skin temperature and barrier function. **Commun Integr Biol**, v.3, n.6, Nov, p.619-21. 2010.

STANDER, S. *et al.* Facing the challenges of chronic pruritus: a report from a multi-disciplinary medical itch centre in Germany. **Acta Derm Venereol**, v.95, n.3, Mar, p.266-71. 2015.

SULK, M. *et al.* Distribution and expression of non-neuronal transient receptor potential (TRPV) ion channels in rosacea. **J Invest Dermatol**, v.132, n.4, Apr, p.1253-62. 2012.

SULTANA, A. *et al.* Comorbidities in Patients with Psoriasis. **Mymensingh Med J**, v.28, n.4, Oct, p.894-899. 2019.

SUZUKI, M. *et al.* Impaired pressure sensation in mice lacking TRPV4. **J Biol Chem**, v.278, n.25, Jun 20, p.22664-8. 2003.

SWINDELL, W. R. *et al.* Genome-wide expression profiling of five mouse models identifies similarities and differences with human psoriasis. **PLoS One**, v.6, n.4, p.e18266. 2011.

THORNELOE, K. S. *et al.* N-((1S)-1-[4-((2S)-2-[(2,4-dichlorophenyl)sulfonyl]amino)-3-hydroxypropanoyl)-1-piperazinyl]carbonyl)-3-methylbutyl)-1-benzothiophene-2-carboxamide (GSK1016790A), a novel and potent transient receptor potential vanilloid 4 channel agonist induces urinary bladder contraction and hyperactivity: Part I. **J Pharmacol Exp Ther**, v.326, n.2, Aug, p.432-42. 2008.

TIIRIKAINEN, M. L. *et al.* Ex vivo culture of lesional psoriasis skin for pharmacological testing. **J Dermatol Sci**, Dec 27. 2019.

TIZEK, L. *et al.* Skin diseases are more common than we think: screening results of an unreferral population at the Munich Oktoberfest. v.33, n.7, Jul, p.1421-1428. 2019.

TOTH, B. I. *et al.* TRP channels in the skin. **Br J Pharmacol**, v.171, n.10, May, p.2568-81. 2014.

VAKHARIA, P. P. *et al.* Burden of skin pain in atopic dermatitis. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v.119, n.6, Dec, p.548-552.e3. 2017.

VALDES-RODRIGUEZ, R. *et al.* Transient receptor potential channels and dermatological disorders. **Curr Top Med Chem**, v.13, n.3, p.335-43. 2013.

VAN BELLE, A. B. *et al.* IL-22 is required for imiquimod-induced psoriasiform skin inflammation in mice. **J Immunol**, v.188, n.1, Jan 1, p.462-9. 2012.

VAN DER FITS, L. *et al.* Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. **J Immunol**, v.182, n.9, May 1, p.5836-45. 2009.

- VERGNOLLE, N. *et al.* A role for transient receptor potential vanilloid 4 in tonicity-induced neurogenic inflammation. **Br J Pharmacol**, v.159, n.5, Mar, p.1161-73. 2010.
- WATANABE, H. *et al.* Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. **Nature**, v.424, n.6947, Jul 24, p.434-8. 2003.
- WHITE, J. P. *et al.* TRPV4: Molecular Conductor of a Diverse Orchestra. **Physiol Rev**, v.96, n.3, Jul, p.911-73. 2016.
- WU, J. K. *et al.* Psoriasis induced by topical imiquimod. **Australas J Dermatol**, v.45, n.1, Feb, p.47-50. 2004.
- XU, S. *et al.* A novel TRPV4-specific agonist inhibits monocyte adhesion and atherosclerosis. **Oncotarget**, v.7, n.25, p.37622-37635. 2016.
- YANG, P. *et al.* Frontiers in Neuroscience
A Critical Role for TRP Channels in the Skin. (2017). In: Nd;Emir, T. L. R. **Neurobiology of TRP Channels**CRC Press/Taylor & Francis
(c) 2018 by Taylor & Francis Group, LLC.: 95-111.
- YANG, Y. S. *et al.* Increased expression of three types of transient receptor potential channels (TRPA1, TRPV4 and TRPV3) in burn scars with post-burn pruritus. **Acta Derm Venereol**, v.95, n.1, Jan, p.20-4. 2015.
- YU, S. *et al.* Transient receptor potential ion-channel subfamily V member 4: a potential target for cancer treatment. **Cell Death Dis**, v.10, n.7, Jun 24, p.497. 2019.
- YUN, J. W. *et al.* TRPV1 antagonist can suppress the atopic dermatitis-like symptoms by accelerating skin barrier recovery. **J Dermatol Sci**, v.62, n.1, Apr, p.8-15. 2011.
- ZHANG, W. *et al.* Systematic review of cost-effectiveness analyses of treatments for psoriasis. **Pharmacoeconomics**, v.33, n.4, Apr, p.327-40. 2015.
- ZHOU, Y. *et al.* TRPV1 mediates inflammation and hyperplasia in imiquimod (IMQ)-induced psoriasiform dermatitis (PsD) in mice. **J Dermatol Sci**, v.92, n.3, Dec, p.264-271. 2018.