

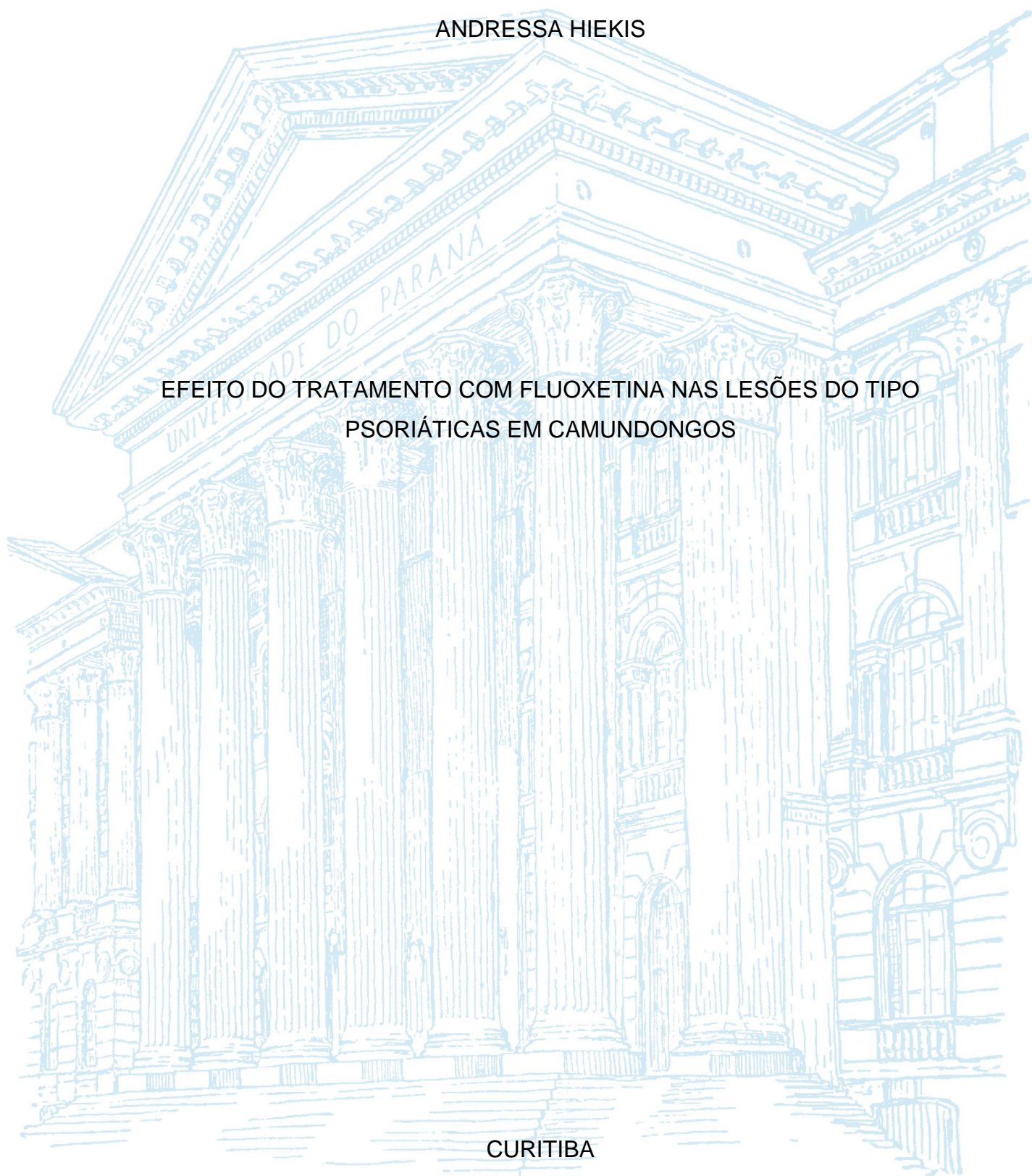
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRESSA HIEKIS

EFEITO DO TRATAMENTO COM FLUOXETINA NAS LESÕES DO TIPO
PSORIÁTICAS EM CAMUNDONGOS

CURITIBA

2019



ANDRESSA HIEKIS

EFEITO DO TRATAMENTO COM FLUOXETINA NAS LESÕES DO TIPO
PSORIÁTICAS EM CAMUNDONGOS

TCC apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Cabrini
Coorientadora: Priscila Lúcia Pawloski

CURITIBA

2019

“Tente entender o que você vê e pense sobre o que faz o universo existir.
Seja curioso, e por mais difícil que a vida possa parecer, sempre há algo que você
pode fazer e ter sucesso. É importante que você não desista”

-Stephen Hawking

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me proporcionado a chegar até aqui.

A minha família, minha mãe Soeli Hiekis, meu pai Rogério Hiekis, minha irmã Andrielly Hiekis de Alcântara e meu cunhado Murilo Carzino de Alcântara pelo incentivo e força ao longo desses anos.

Aos meus amigos que me acompanharam ao longo da jornada.

A minha orientadora Daniela de Almeida Cabrini e coorientadora Priscila Pawloski por todo apoio e suporte durante e após a realização do projeto.

A todos do laboratório Laffpel que contribuíram de alguma forma com a realização do projeto, em especial a Margareth Brandenburg, Fernanda Grillo Rocha e Juliana Ferreira.

E finalmente a muitas pessoas que conheci ao longo desse período que contribuíram muito para o meu desenvolvimento com palavras de apoio e carinho.

RESUMO

A psoríase é uma doença inflamatória crônica da pele, não contagiosa e que causa lesões avermelhadas e descamativas na pele. Fatores ambientais estão altamente ligados ao desenvolvimento da doença, tais como estresse, tabagismo, alcoolismo. Devido ao grande estigma social causada pela visibilidade das lesões cutâneas muitos pacientes podem ainda apresentar distúrbios neuropsiquiátricos, depressão, ansiedade, estresse pós traumático e até mesmo comportamento suicida sendo indicado nesses casos a prescrição médica de antidepressivos, majoritariamente da classe de Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (ISRS). O tratamento padrão referente as lesões é a utilização de glicocorticoides e imunossuppressores que por sua vez, possuem muitos efeitos colaterais indesejáveis ao paciente. Dessa forma o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da fluoxetina em modelo de psoríase induzido por TPA em camundongos. Os resultados sugerem que a fluoxetina diluída em acetona foi capaz de reduzir o edema, a migração de leucócitos e a espessura da epiderme na pele de camundongos. Porém a incorporação da fluoxetina em creme, assim como o tratamento por via oral não causou alteração nos parâmetros inflamatórios induzidos pela aplicação repetida de TPA na pele. Portanto, podemos concluir que a fluoxetina apresenta efeito anti-inflamatório quando aplicado diretamente na pele, mas não o tratamento sistêmico. Novos estudos devem ser conduzidos para avaliar melhor essa atividade.

Palavras-chave: Psoríase 1. Fluoxetina 2. Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (ISRS) 3. Inflamação 4. Pele 5.

ABSTRACT

Psoriasis is a chronic non-contagious skin inflammatory disease that causes red and scaly lesions on the skin. Environmental factors are highly linked to the development of the disease, such as stress, smoking, alcoholism. Due to the great social stigma caused by the visibility of cutaneous lesions many patients may still present neuropsychiatric disorders, depression, anxiety, post traumatic stress and even suicidal behavior, being indicated in these cases the medical prescription of antidepressants, mainly of the class of Selective Inhibitors of the Recaptation of Serotonin (SSRI). The standard treatment for lesions is the use of glucocorticoids and immunosuppressants which in turn have many undesirable side effects to the patient. Thus, the present study aimed to evaluate the effects of fluoxetine in a model of TPA-induced psoriasis in mice. The results suggest that fluoxetine diluted in acetone was able to reduce edema, leukocyte migration and epidermal thickness in the skin of mice. However, the incorporation of fluoxetine in cream as well as oral treatment did not cause changes in the inflammatory parameters induced by the repeated application of TPA to the skin. Therefore, we can conclude that fluoxetine has an anti-inflammatory effect when applied directly to the skin, but not the systemic treatment. Further studies should be conducted to better evaluate this activity.

Key words: Psoriasis 1. Fluoxetine 2. Selective Serotonin Reuptake Inhibitors (SSRIs) 3. Inflammation 4. Skin 5.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Mecanismos envolvidos na patogênese da psoríase	05
FIGURA 2 – Vias inflamatórias envolvidas na patogênese da psoríase	06
FIGURA 3 – Protocolo da inflamação cutânea crônica induzida por múltiplas aplicações de TPA	12
FIGURA 4 – Efeito do tratamento tópico com fluoxetina no modelo de aplicações repetidas de TPA	15
FIGURA 5 – Avaliação da fluoxetina no aumento da Espessura da Epiderme no modelo de TPA repetido	16
FIGURA 6 – Análise da Espessura epidérmica induzida por TPA	17
FIGURA 7 – Avaliação do tratamento com fluoxetina no Infiltrado celular na pele submetida ao modelo de tratamentos repetidos com TPA	18
FIGURA 8 – Avaliação do Edema no Modelo de Inflamação Cutânea induzida por TPA	19
FIGURA 9 - Efeito da Fluoxetina via oral na atividade das enzimas MPO e NAG induzidas pela aplicação múltipla de TPA	20
FIGURA 10 – Avaliação da Espessura da Epiderme das amostras obtidas do Modelo de Inflamação Cutânea induzida por TPA	21
FIGURA 11 - Avaliação da Espessura e de Inflamação Cutânea induzida por TPA.....	23
FIGURA 12 – Efeito do creme de Flouxetina no Edema induzido por aplicações repetidas de TPA	25
FIGURA 13 – Efeito do creme de Fluoxetina na atividade das enzimas MPO e NAG induzidas pela aplicação múltipla de TPA	26
FIGURA 14 – Avaliação da Espessura da Epiderme das amostras obtidas do Modelo de Inflamação Cutânea induzida por TPA	27
FIGURA 15 – Avaliação da Espessura de Inflamação Cutânea induzida por TPA.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

5-HT	- Serotonina
5-HT1 /5-HT1R	- Receptor de serotonina tipo 1
5-HT7/5-HT7R	- Receptor de serotonina tipo 7
5-HT2AR	- Subtipo de receptor de serotonina tipo 2
DHFR-	- Dihidrofolato redutase
AMPc	- Adenosina monofosfato cíclico
HTAB	- Hexadeciltrimetilamônio
HPLC	- <i>High performance liquid chromatography</i>
IL (n)	- Interleucina (tipo da interleucina)
MAO	- Inibidores da monoamina oxidase
IMQ	- Imiquimode
IRND	- Inibidores de receptação de noradrenalina-dopamina
ISRS/SSRI	- Inibidores Seletivos de Receptação de Serotonina
K (n)	- Queratina (tipo da queratina)
MPO	- Mieloperoxidase
MRP-8	- Fator inibidor da migração
NAG	- N-acetylglucosaminidase
NK	- Célula <i>Natural Killer</i>
NK κ B	- Fator nuclear kappa B
SKALP	- Antileucoproteinase derivada da pele
STAT 1 e 3	- <i>Signal transducer and activator of transcription 1 e 3</i>
TCD4+	- Célula T diferenciada do tipo CD4
TCD8+	- Célula T diferenciada do tipo CD8
TGF- β	- <i>Transforming growth factor tipe beta</i>
TGase K	- transglutaminase tipo I
Th1	- Célula T do tipo <i>The Helper 1</i>
Th2	- Célula T do tipo <i>The Helper 2</i>
TNF	- Tumor necrosis fator (Fator de necrose tumoral)
TPA	- 12-O-tetradecanoilforbol- 13-acetato

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. JUSTIFICATIVA	02
3. OBJETIVOS	03
3.1 OBJETIVO GERAL	03
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	03
4. REVISÃO DE LITERATURA	04
4.1 PSORÍASE.....	04
4.2 DEPRESSÃO E PSORÍASE	08
4.3 FÁRMACOS INIBIDORES DA RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA (ISRS).....	10
5. MATERIAIS E MÉTODOS	11
5.1 ANIMAIS	11
5.2 MODELO ANIMAL DE INFLAMAÇÃO CUTÂNEA INDUZIDA POR TPA	11
5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA MPO E DA NAG	12
5.4 AVALIAÇÃO DO TECIDO CUTÂNEO ATRAVÉS DE ANÁLISE HISTOLÓGICA	13
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	14
6. RESULTADOS	15
6.1 EFEITO DO TRATAMENTO TÓPICO COM FLUOXETINA NO MODELO DE INFLAMAÇÃO CUTÂNEA INDUZIDA POR MÚLTIPLAS APLICAÇÕES DE TPA..	15
6.2 EFEITOS DO TRATAMENTO COM FLUOXETINA VIA ORAL NO MODELO DE INFLAMAÇÃO CUTÂNEA INDUZIDA POR MÚLTIPLAS APLICAÇÕES DE TPA	19
6.3 EFEITOS DO TRATAMENTO COM CREME DE FLUOXETINA NO MODELO DE INFLAMAÇÃO CUTÂNEA INDUZIDA POR MÚLTIPLAS APLICAÇÕES DE TPA	24
7. DISCUSSÃO	30
8. CONCLUSÃO	33
9. REFERÊNCIAS	34

1. INTRODUÇÃO

A psoríase é uma doença inflamatória crônica que acomete a pele, eventualmente atingindo as articulações (Ogawa et al., 2019) Pode ser associada à rápida e intensa proliferação epidérmica, caracterizando-se clinicamente por lesões eritematosas e descamativas, levando ao fenótipo de placas acinzentadas na pele (Blauvelt, 2007). Já é elucidado que fatores genéticos estão diretamente ligados com a maior propensão de desenvolvimento da doença (Suzuki, et al. 2014), assim como distúrbios neuropsiquiátricos como depressão, ansiedade, distúrbios pós traumáticos e até comportamento suicida (Arruda et al., 2011). Em geral, pacientes com psoríase possuem uma redução na sua qualidade de vida, devido ao grande impacto social causado pelo fenótipo que a doença apresenta, tornando-se assim comum prescrições de antidepressivos no tratamento dos distúrbios dermatológicos e neurológicos, por estarem de alguma forma correlacionados (Rieder e Tausk, 2012; Kimball, A.B. et al, 2012; Dowlatshahi, et al, 2013)

Recentemente, existem pesquisas evidenciando a presença e ação da serotonina na pele, porém ainda não se tem conhecimento sobre o papel desse neurotransmissor em patologias de pele, como por exemplo a psoríase. Na intenção de buscar novos alvos terapêuticos para o tratamento da psoríase, e devido à falta de maiores conhecimentos sobre o papel da serotonina na pele psoriática, o sistema serotoninérgico torna-se uma interessante ferramenta na busca de novos agentes terapêuticos para doenças inflamatórias crônicas.

2. JUSTIFICATIVA

A psoríase traz ao paciente um certo estigma já que as lesões geralmente aparecem em locais visíveis. Sendo assim, além do tratamento com corticoides ou imunossupressores, muitos pacientes precisam de um suporte psiquiátrico. Nesses casos a administração de antidepressivos é muito comum, sendo o mais utilizado da classe de inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) (Cassano, et al. 2009). Estudos mostram que o sistema de serotonina está presente na pele e pode, de alguma forma, estar regulando negativamente o processo inflamatório e a hiperproliferação de queratinócitos (Wu, et al. 2018).

Dessa forma buscamos uma melhor compreensão das funções que a serotonina pode ter nas lesões de pele, especificamente na pele psoriática, podendo representar um possível alvo terapêutico no tratamento dessa patologia.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito da fluoxetina em modelo de inflamação cutânea induzido pelo TPA.

3.2. Objetivos Específicos

- Verificar o efeito do tratamento com Fluoxetina em inflamação cutânea induzida por TPA em camundongos swiss;
- Realizar análise histológica de amostras de pele de animais submetidos ao modelo de TPA;
- Avaliar a atividade das enzimas MPO e NAG de amostras epidérmicas;

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Psoríase

A psoríase é uma doença inflamatória crônica da pele e das articulações, não contagiosa (Ogawa et al., 2019) que atinge de 2-3% da população mundial e acomete igualmente ambos os sexos, principalmente entre a segunda e a quarta décadas de vida (Wu et al., 2018) Em relação a prevalência de cor de pele, a doença parece estar presente em 76% dos casos, em indivíduos de pele branca (Silveira, et al., 2017). Estudos descobriram que a maioria do início da psoríase ocorre durante a adolescência, descrita como um aumento linear ao longo da infância ou como um pico de início nos jovens de 16 a 22 anos de idade (Gonzalez, et al., 2016)

Já é de consenso literário que a doença possui intensa atividade do sistema imunológico além do relevante fator genético associado a um alto grau de polimorfismo genético (Silveira, et al. 2017). Seu fenótipo consiste na presença de lesões avermelhadas descamativas e placas acinzentadas preeminentes nos cotovelos, joelhos, pés, mãos, região sacra e couro cabeludo (Rodrigues e Teixeira, 2009) , entretanto eventualmente podem estar distribuídas por uma extensa área corporal (Aparecida e Reis, 2017). Essas exacerbações estão associadas à alta taxa de proliferação dos queratinócitos, infiltrado leucocitário presentes na epiderme, expansão vascular e alteração na produção de citocinas na derme, exacerbando assim ainda mais a resposta inflamatória na pele. (Rodrigues e Teixeira, 2009)

A patogênese da psoríase estudada em modelos murinos, mostram que o estresse celular somados a fatores genéticos causam a morte de queratinócitos e a liberação do auto-DNA, que são capazes de se ligarem a LL-37, que por sua vez ativa células dendríticas (DCs) presentes de derme e libera citocinas pró-inflamatórias. As DCs ativadas migram para o linfonodo, que drena a pele e células T maduras para Th1 e Th17. Células T ativadas migram para o local de inflamação e secretam citocinas derivadas de Th17 para ativar os queratinócitos a liberarem citocinas e quimiocinas. Essas, por sua vez, resgatam neutrófilos e invadem a epiderme. Os queratinócitos também produzem fatores de crescimento que irão levar ao processo de angiogênese. Devido a ativação de fibroblastos, células T infiltradas e queratinócitos epidérmicos, a inflamação se exacerba levando ao espessamento epidérmico, desregulação do estrato córneo, papilas dérmicas

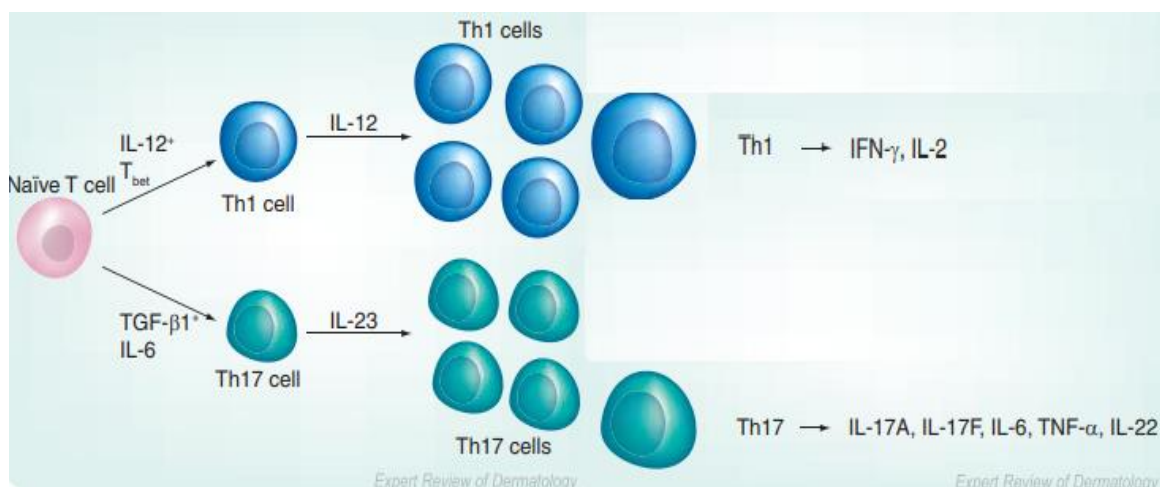


FIGURA 2: Vias inflamatórias envolvidas na psoríase. (FONTE: BLAUVELT A., 2007)

Em análise de lesões psoriáticas foram encontrados quantidades expressivas de subunidades proteicas presentes na IL-23, sugerindo que a via Th-17 é mais expressiva na fisiopatogenia da doença (Carvalho, et al. 2012). A IL-17, produzida pela célula Th-17, neutrófilos e células TCD4+ (Chen, F. et al., 2016) (Thom, V. et al., 2016) atua no recrutamento de neutrófilos, CD e células T naive, amplificando assim ainda mais o sinal inflamatório (Blauvelt, 2007), por outro lado o mediador responsável pela hiperproliferação dos queratinócitos é o TGF-β, produzido pelo linfócito T naive (Huang, J. et al, 2004).

Além de todos os mediadores já mencionados, estudos recentes mostram que o TNF atuam como ativadores de fator de transcrição (STAT-1, STAT-3, NFKB) que são fundamentais na transcrição de genes codificadores de mediadores inflamatórios presentes na psoríase, baseado em modelos que fazem o bloqueio do TNF-α inativando parcialmente a maturação de células dendríticas, linfócitos, quimiocinas, fatores de crescimento e queratinócitos (Gottlieb et al., 2005; Lowes et al., 2008)

Outro fator importante e que está alterado é a presença de queratina, que é uma proteína heteropoliméricas, referente a organização estrutural do filamento intermediário em células epiteliais (Corden, et al. 1996). Na psoríase a hiperproliferação dos queratinócitos na camada basal da pele promove o espessamento epidêmico devido a alta taxa proliferativa, dificultando assim a diferenciação celular (Rodrigues e Teixeira, 2009). Local em que é observado

expressão predominante de queratina 14, 6 e 16 (K14, K6, K16) (MCKAY, IA. 1995), queratina 17 (K17) e uma redução na expressão de K1 e K10, diferente do padrão observado em pele saudável (Leigh et al., 1995). K1 e K10 são marcadores para diferenciação e só são expressos em bem-diferenciados (Leigh et al., 1995 ; Leask, Rosenberg, Vassar e Fuchs, 1991).

A atual conduta médica no tratamento das lesões é a administração de glicocorticoides e imunossupressores. O imunossupressor de uso majoritário na clínica é o metotrexato, um antagonista de ácido fólico que possui capacidade imunossupressora e citotóxica. Seu mecanismo de ação consiste na inibição irreversível da enzima diidrofolato redutase (DHFR), responsável pela catálise de diidrofolato em tetraidrofolado, fundamental na síntese de purinas e timidilato (Verberne, et al. 2019). Devido a esse efeito do metotrexato, a síntese do DNA e replicação celular, torna-se deficiente, tornando-se um alvo terapêutico na psoríase por atingir diretamente tecidos com alta taxa de proliferação celular (Verberne et al., 2019). Adicionalmente a isso há inibição de células TCD4+, que impedem a maturação dos linfócitos para uma resposta específica e a consequente liberação de citocinas inflamatórias causada pela ativação de macrófagos (Cronstein, 1997) Sendo assim, células atuantes na psoríase (por exemplo fibroblastos e queratinócitos) não estarão sendo estimuladas de maneira desordenada como ocorre na psoríase, amenizando assim lesões cutâneas e articulares. Embora esse fármaco seja superior a muitos outros em termos de eficácia o tratamento deve ser rigorosamente monitorado em razão de distúrbios homeostáticos do sangue, cirrose hepática, efeitos teratogênicos, náuseas, problemas gástricos além de fibrose pulmonar (Kerkhoe, et al, 1994) (Wang, et al. 2018) (Verberne et al., 2019)

A psoríase e a depressão estão comumente associadas, uma vez que o transtorno depressivo afeta diretamente os pacientes atuando na piora das lesões e na diminuição da adesão do tratamento da doença (Abraham, et al. 2015). Para esses pacientes a conduta médica, além do tratamento prescrito para as lesões psoriáticas, é a prescrição de medicamentos antidepressivos. Uma das possíveis escolhas e bastante comum é a prescrição de inibidores da recaptação de serotonina. A serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT) é um importante neurotransmissor do sistema nervoso central (SNC), também atua nos tecidos periféricos e sobretudo o sistema imunológico (Wu, et al. 2018). A 5-HT induz a síntese de DNA e intensifica a mitose do fator de crescimento derivado de

plaquetas-BB. Os efeitos da proliferação mediada pela 5-HT possivelmente envolvem a fosforilação de proteínas ativadoras de GTPase, uma vez que a inibição da GTPase bloqueia respostas migratórias e proliferativas (Liu, et al, 2010) (Azmitia, 2001). Dessa forma a serotonina parece ter também um impacto na migração e proliferação celular podendo representar uma importante ferramenta no entendimento da fisiopatologia da psoríase (Thorslund e Nordlind, 2007).

4.2. Depressão e psoríase

Devido aos processos mencionados anteriormente, é estabelecido um quadro de aparecimento de lesões róseas recobertas de escamas na pele, que podem se alternar em períodos agudos com fases de melhora e piora. Apesar de sua causa ainda não ser totalmente elucidada, sabe-se que fatores emocionais estão frequentemente relacionados com o surgimento ou até mesmo o agravamento dessas lesões cutâneas (Arruda et al., 2011). Diversos estudos já mostraram que pacientes com psoríase possuem maior probabilidade no desenvolvimento de obesidade, resistência à insulina, dislipidemia, diabetes tipo II, hipertensão, síndrome metabólicas e doença cardiovascular (Mallbris et al., 2004; Glynn, et al 2009).

Devido a visibilidade e prejuízo estético causados pela presença das lesões a autoimagem do paciente, autoestima e sensação de bem estar, são afetadas negativamente, dificultando as atividades diárias e o contato social (Wasel et al., 2009) (Parletta, 2018). Consequentemente um dos fatores amplamente observados nesses pacientes é o aparecimento de doenças neuropsiquiátricas, ansiedade, depressão e comportamento suicida, sendo um gatilho a maior propensão de consumo excessivo de álcool e drogas (Kirby et al., 2008) (Naldi et al., 2005) (Gupta, et al. 1993). Estudos em modelos animais mais recentes realizados na China, mostraram que há um predomínio ao desenvolvimento de ansiedade e depressão em pacientes com psoríase comparado com a população geral. Sendo que, após a administração de medicamentos ansiolíticos e antidepressivos, as lesões desses pacientes reduziram significativamente - porém o mecanismo envolvido ainda é desconhecido (Jiawen,W. et al, 2018). Em um levantamento de caso, foram analisadas diferentes classes de antidepressivos em doenças de pele, incluindo a psoríase. As classes analisadas foram: Inibidores da monoamina oxidase

(IMAO), Inibidores de receptação de noradrenalina (IRND) – bupropiona, Inibidores seletivos de receptação da serotonina (ISRS) – paroxetina, Inibidores de TNF- α – escitalopram. Todos os grupos tratados obtiveram melhora, porém algumas análises foram feitas somente em relação a extensão das lesões, excluindo as análises de espessamento epidérmico e intensidade. Além disso, os pacientes tratados com paroxetina foram os únicos que apresentaram retorno das lesões depois de 1 anos (D'Erme, et al. 2012). Há demais estudos que sugerem a eficácia do escitalopram na melhora das lesões psoriáticas (D'Erme, et al., 2012)

Em contrapartida um relato de caso realizado em Singapura identificou que além das drogas comumente usadas em consultórios psiquiátricos, já conhecidas por provocar a exacerbação da psoríase (Lítio) houve novos relatos de drogas da classe ISRS podem desencadear e até mesmo desenvolver a psoríase em pacientes pré-dispostos a doença e sem histórico familiar, respectivamente. Dois casos foram relatados após o uso de paroxetina e outros dois durante o tratamento com fluoxetina (Lin, et al. 2010). Porém são números relativamente pequenos para uma afirmação conclusiva.

Devido ao prejuízo social e psicológico que doença traz a conduta médica aliada ao tratamento para a melhora das lesões, muitas vezes passa a ser a prescrição de medicamentos antidepressivos que tem como finalidade a melhora neuropsiquiátrica do paciente. No entanto, muitas vezes a administração desses medicamentos parece melhorar as lesões, mas como os pacientes também fazem uso de fármacos imunossupressores e/ou anti-inflamatórios, ainda fica a dúvida sobre a ação do antidepressivo. Estaria o antidepressivo interferindo somente no controle emocional, na depressão e ansiedade ou ele também teria alguma ação direta sobre o processo inflamatório? Dessa forma este trabalho procurou elucidar o possível efeito anti-inflamatório nas lesões de pele de um dos antidepressivos mais usados, a fluoxetina, através de um modelo de inflamação cutânea.

4.3. Fármacos inibidores seletivos da recaptção da serotonina ISRS

Os fármacos inibidores da receptação de serotonina (ISRS) acabam por aumentar a transmissão de 5-HT e são amplamente prescritos no tratamento de

transtornos depressivos e estresse crônico (Thorslund, et al, 2013). São cinco fármacos pertencentes a essa classe: fluoxetina, fluvoxamina, paroxetina, sertralina e citalopram. As propriedades farmacocinéticas de cada fármaco é variável (Hiemke e Härtter, 2000).

O papel do sistema serotoninérgico é amplamente conhecido pela intensa relação com respostas de estresse, apetite, sono, desejo sexual memória e comportamento, indicando sua importante atividade reguladora da homeostase (Gudmundsdottir, et al. 1999). Também é bem estabelecido na literatura que as alterações na neurotransmissão de 5-HT possui ligação fisiopatológica com comorbidades psiquiátricas, principalmente a depressão (Tohid, et al. 2016). Além da sua atividade sobre o sistema límbico, a 5-HT parece ter ação vasoativa sobre o sistema cardiovascular, músculo liso e agregação plaquetária (Clerck, et al. 1994).

Em um estudo de avaliação dos efeitos anti-inflamatórios de antidepressivos, a fluoxetina foi capaz de reduzir o edema de pata em ratos, suprimindo a inflamação em 14,6, 15,8 e 24,6% (Abdel, et al. 2003). Porém a atividade da sertralina foi oposta, exacerbando ainda mais a inflamação. De acordo com esses dados a modulação de neurotransmissão serotoninérgica nas propriedades anti-inflamatórias seria improvável, sugerindo assim que outros mecanismos além da modulação de 5-HT podem estar envolvidos em efeitos anti-inflamatórios, visto que nos ratos tratados com ISRS a concentração de substância P e PGE2 reduziram (Abdel, et al. 2003).

Em contrapartida, há resultados provenientes de modelos *in vivo* e *in vitro* que mostram a atividade imunoreguladora negativa dos ISRS, por suprimir a taxa de produção de IFN- γ , IL-10 e TNF α (Kubera, et al 2001; Kenis e Maes, 2002)

Dessa forma fármacos, como a fluoxetina, que possuem propriedades de inibir a recaptação de 5-HT e aumentar seus níveis, podem ser um importante alvo terapêutico devidos seus possíveis potenciais efeitos anti-inflamatórios.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos Swiss fêmeas (25-35 g) provenientes do Biotério Setorial do Setor de Ciências Biológicas. Os animais foram mantidos em condições de temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), respeitando uma fase de ciclo claro/escuro de 12 horas e com livre acesso a água e ração comercial. Os experimentos foram realizados na sala destinada para esse fim, sem interferência sonora e olfativa. Todos os protocolos experimentais seguiram as diretrizes ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná, sob o número 1047.

5.2. Modelo animal de Inflamação Cutânea induzida por TPA

Esse modelo é induzido pela aplicação de 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) na orelha dos camundongos. O TPA é um éster de forbol que atua na exacerbação da proliferação celular, ativação de respostas inflamatórias cutâneas devido ao aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação (Tubaro et al., 1986).

O TPA foi aplicado topicamente na orelha direita de cada camundongo (2,5 μg /orelha em 20 μL de acetona) em dias alternados, durante 9 dias. O tratamento com Fluoxetina (diluída em acetona, creme e via oral) teve início a partir do quinto dia do experimento, a cada 12 horas. A espessura da orelha foi avaliada diariamente com o auxílio de um micrômetro digital (Eletronic Outsidsse Micrometer 0-25 mm 0.001 mm, Digimess). No 9º dia de experimento os animais foram eutanasiados e biópsias (6 mm) da pele das orelhas foram coletadas, pesadas e submetidas a análise histológica.

Os grupos experimentais foram: Naive (não obteve nenhuma intervenção), Controle (somente aplicações de TPA 2,5 μg /orelha), Fluoxetina diluída em acetona (1mg/orelha), Fluoxetina em creme 5%, Fluoxetina via oral (10 mg/kg) e controle positivo, dexametasona em acetona (0,1 mg/orelha), em creme (0,1%) e via oral (3mg/kg). A aplicação do TPA foi 1x por dia em dias alternados, iniciando no

primeiro dia de experimento e finalizando no 9° e último dia de experimento, conforme Figura 3.

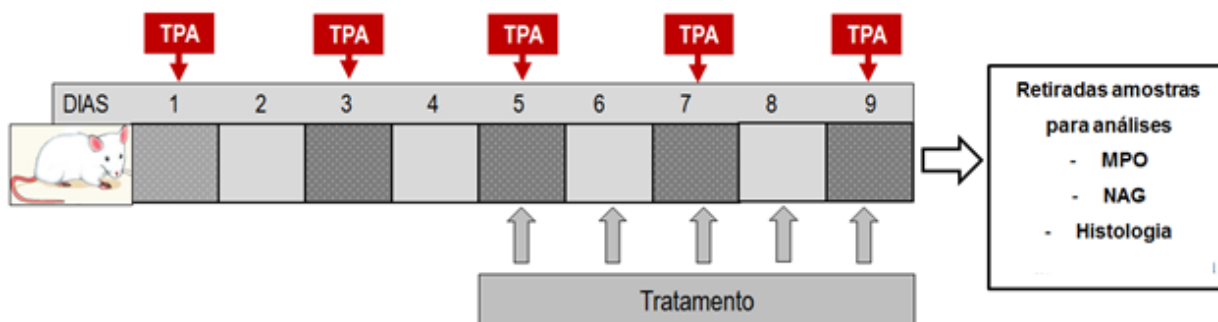


FIGURA 3: Protocolo da Inflamação Cutânea Crônica induzida por múltiplas aplicações de TPA. Fonte: O autor.

5.3. Avaliação da Atividade Enzimática da MPO e da NAG

A mieloperoxidase (MPO) é uma importante enzima metabolizadora atuante nas respostas de estresse oxidativo, expressa diante da ativação leucocitária e da degranulação de células polimorfonucleares, sendo um fundamental indicativo e biomarcador da presença de inflamação (Esporcatte, et al. 2007) (Roman, et al. 2007). Para a avaliação da atividade enzimática da MPO foi utilizado um protocolo já estabelecido (Bradley, et al. 1982). No modelo de edema de orelha com múltiplas aplicações de TPA, as amostras de tecido (6mm) da orelha dos camundongos foram coletadas no sétimo dia de experimento. Uma quantidade de 0,75 mL de tampão fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4) foram adicionadas em cada amostra, juntamente com 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) e homogeneizadas por 45 segundos em temperatura de 0°C. E ao tecido centrifugado (homogenato) foram adicionados 0,75 mL de tampão fosfato.

As amostras foram centrifugadas a 4°C durante 20 minutos e posteriormente foram feitas triplicatas de 30µl com o sobrenadante, do qual foi colocado em uma placa contendo 96 poços e em seguida adicionando 200 µl de uma mistura (que contém 100 µl de tampão fosfato de sódio 80mM + 85 µl de PBS 0,22 M) + 15 µl de peróxido de hidrogênio 0,017%) em um dos 96 poços.

Para iniciar a reação é necessário a adição de uma mistura contendo tetrametilformamida dissolvida em dimetilformamida 8%, incubada a 37°C por 3 minutos, após esse tempo deve-se adicionar 30 µL de acetato de sódio para que a reação seja interrompida. A atividade enzimática da MPO foi determinada através da análise de absorbância a 620 nm medida pelo leitor Bio-Tek Multi-Mode Microplate reader, Synergy HT).

Também foi avaliada a atividade enzimática da NAG, utilizada como marcador de macrófagos e indicativo de inflamação (Coelho, et al. 2013; Pinto et al., 1990). A atividade da NAG foi avaliada seguindo protocolo pré estabelecido (Sanches & Moreno, 1999). As amostras de tecido (6mm) da orelha direita dos camundongos submetidos a aplicação do TPA foram submetidas a protocolo semelhante ao descrito acima, adicionando 100 µl de tampão citrato 50mM, e a reação foi iniciada pela adição de 25 µl de p-nitrofenil-acetamida-µ-D-glicopiranosídeo (2,24 mM) dissolvido em água. Em seguida a placa foi incubada a 37°C por 60 minutos e foi adicionado 30 µl de tampão glicina 200nM em cada poço, para interromper a reação. A atividade enzimática da NAG foi determinada através da análise de absorbância a 450 nm medida pelo leitor Bio-Tek Multi-Mode Microplate reader, Synergy HT).

5.4. Avaliação do tecido cutâneo através de análise histológica

As amostras do tecido foram coletadas do camundongo, no modelo do TPA foi feita a coleta da orelha direita. Essas amostras foram fixadas em 85 mL de ALFAC 80%, 10 mL de formol 40% e 5 mL de ácido acético glacial) durante 16 horas. Posteriormente as amostras foram colocadas em solução alcoólica 70% até o processo de desidratação ter iniciado. Após a desidratação das amostras, essas foram emblocadas em parafina, cortadas no micrótomo e por fim coradas com HE. A infiltração leucocitária foi avaliada com aumento de 200x e a quantificação através da contagem de migração celular com auxílio do programa *Image J*.

5.5. Análise Estatística

Os resultados serão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de múltipla comparação de Newman-Keuls ou de duas vias seguida do teste Bonferroni conforme a necessidade. Valores de P menores do que 0,05 ($P < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância. Os cálculos serão realizados utilizando o Software estatístico GraphPad Prism versão 6.00, San Diego Califórnia, EUA.

6. RESULTADOS

6.1. Efeito do tratamento tópico com fluoxetina no modelo de inflamação cutânea induzida por múltiplas aplicações de TPA

A aplicação tópica de TPA (2,5 µg/orelha) promoveu a formação de edema conforme verificado pelo aumento da espessura da orelha na Figura 4. O grupo que recebeu TPA e tratamento tópico com fluoxetina mostrou uma redução do edema em $28,59 \pm 0,8\%$ no 7º e $38,18 \pm 1,01\%$ no 9º dia. O controle positivo, dexametasona 0,1%, foi capaz de reduzir o edema a partir do 5º dia, com redução de $77,5 \pm 1,01\%$ no 9º dia.

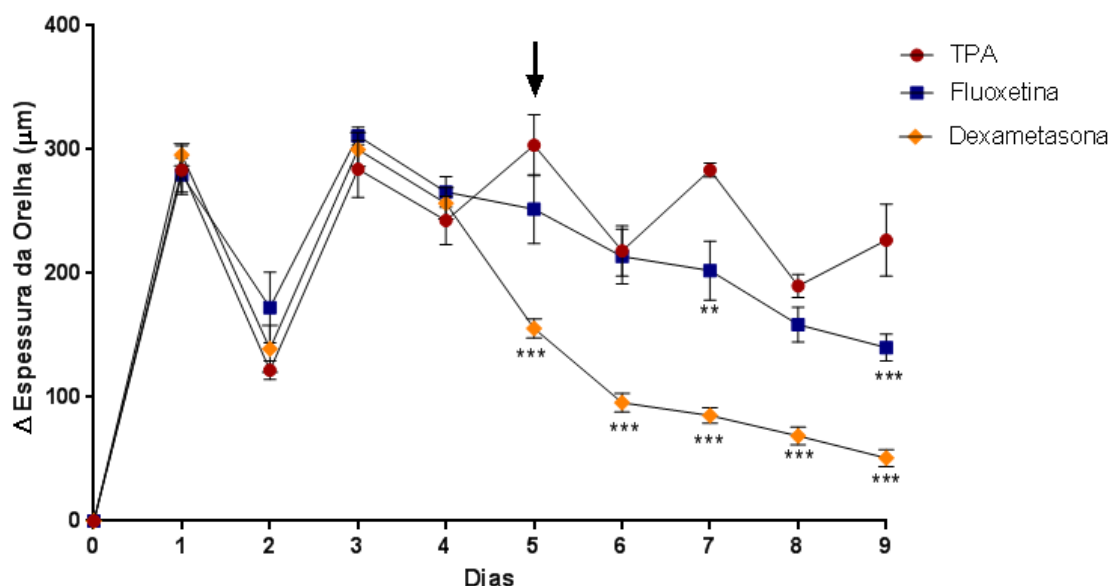


FIGURA 4: Efeito do tratamento tópico com fluoxetina no modelo de aplicações repetidas de TPA. O processo inflamatório crônico foi induzido com a aplicação tópica de TPA em dias alternados durante 9 dias. A Fluoxetina (1,0 mg/orelha) e a dexametasona (0,1 mg/orelha) foram aplicados topicamente durante 4 dias, duas vezes ao dia (12/12 h) a partir do quinto dia de experimento e a espessura da orelha medida diariamente. Os valores estão expressos como média \pm EPM ($n=5-8$). Os símbolos representam o nível de significância em relação ao controle (C). *** $P < 0,001$ e ** $P < 0,01$. A seta indica o início do tratamento.

Com as biópsias coletadas das orelhas dos animais, foi possível verificar através da histologia, o espessamento epidérmico e a migração de células

inflamatórias. Na Figura 5, estão fotos representativas dos grupos (A) Naive, (B) TPA e (C) TPA + Fluoxetina em acetona.

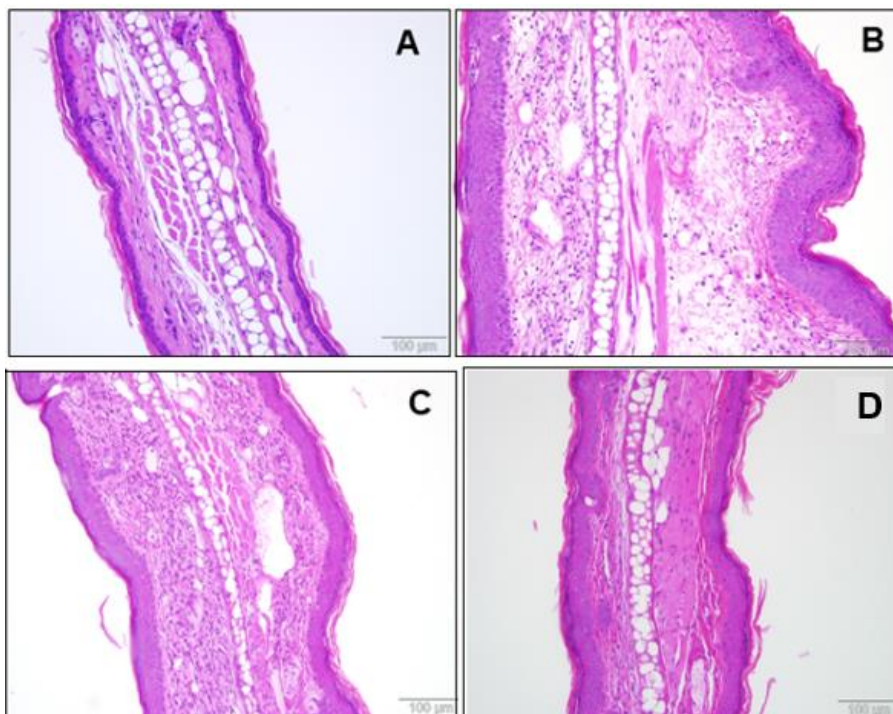


FIGURA 5: Avaliação da fluoxetina tópica no aumento da Espessura da Epiderme no modelo de TPA repetido. Fotos representativas de cortes histológicos das orelhas dos camundongos submetidos ao modelo de edema de orelha induzido por TPA corados com HE, aumento de 200x, escala de 100 µm. Sendo representados os grupos naive (A), que não recebeu nenhum tratamento; controle (B) que recebeu TPA; (C) Fluoxetina 1 mg/orelha (em acetona) e (D) Dexametasona em acetona (0,1 mg/orelha). Análise da espessura da epiderme. As barras verticais representam a média \pm EPM (n=3). Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle (TPA), ****P<0,001.

Na Figura 6, o resultado da avaliação da espessura da epiderme demonstra o aumento obtido com a aplicação de TPA e a redução significativa no grupo tratado com TPA + fluoxetina acetona de $20,62 \pm 3,47\%$, assim como no grupo tratado com TPA + dexametasona que também apresentou redução significativa.

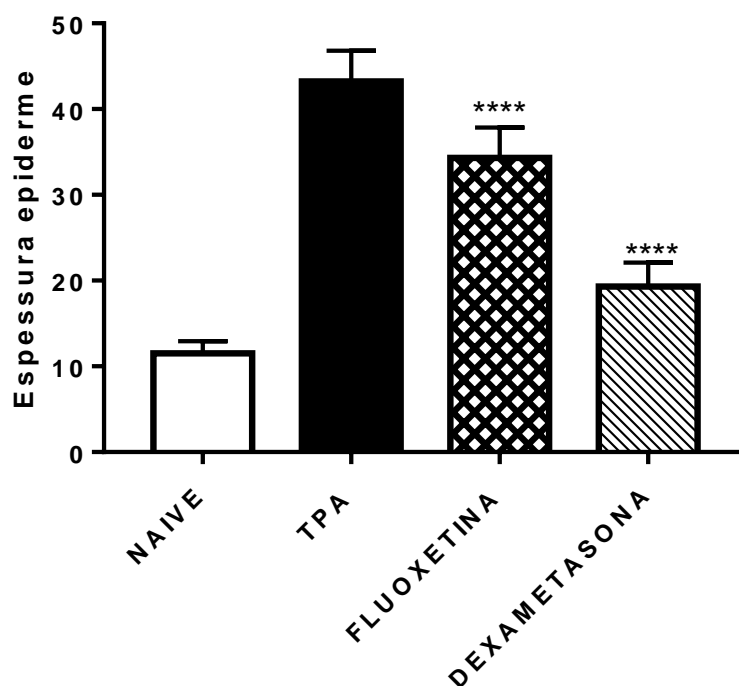


Figura 6: Análise da Espessura epidérmica induzida por TPA. Efeito do tratamento tópico com Fluoxetina em acetona e da dexametasona sobre a migração leucocitária induzida pela aplicação múltipla de TPA. A Fluoxetina em acetona (1mg/orelha) e a dexametasona (0,1mg/orelha) foram administrados durante 4 dias, duas vezes ao dia (12/12 h) a partir do quinto dia de experimento. As barras verticais representam a média \pm EPM (n=9). Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle (TPA), ****P<0,001.

As análises dos cortes histológicos também demonstram que o grupo que recebeu somente o TPA obteve um aumento no infiltrado celular no tecido das orelhas dos camundongos (Figura 5). O tratamento tópico com fluoxetina diluída em acetona foi capaz de reduzir de modo significativo o infiltrado celular, quando comparado com o grupo controle em $12,43 \pm 0,9\%$. O grupo dexametasona também reduziu de modo significativo $72,31 \pm 0,9\%$ (Figura 7).

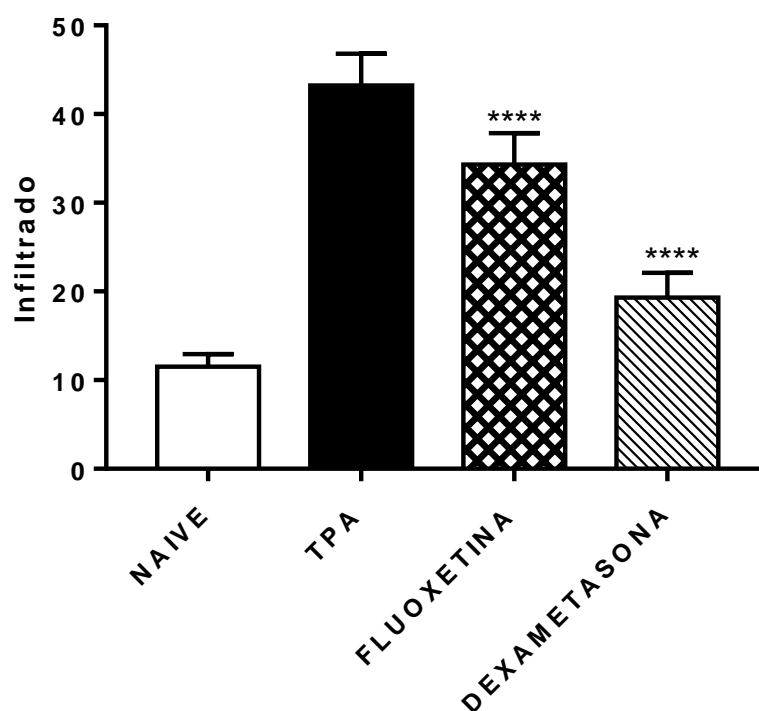


FIGURA 7: Avaliação do tratamento com fluoxetina no Infiltrado celular na pele submetida ao modelo de tratamentos repetidos com TPA. Efeito do tratamento tópico com Fluoxetina (1,0 mg/orelha) e da dexametasona (0,1 mg/orelha) sobre a migração leucocitária induzida pela aplicação múltipla de TPA. A quantificação foi realizada através da contagem do número de células na derme, com aumento de 400x em cinco campos distintos de três cortes histológicos diferentes de três animais de cada grupo. As barras verticais representam a média \pm EPM (n=3). Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle (TPA), ****P<0,001.

6.2. Efeitos do tratamento com Fluoxetina por via oral no modelo de inflamação cutânea induzida por aplicações múltiplas de TPA

Como a fluoxetina apresentou efeito quando aplicado por via tópica diluída em acetona, apresentando efeito local, o próximo passo foi testar a fluoxetina via oral no modelo de inflamação através de múltiplas aplicações de TPA. Os resultados mostram que o tratamento com a fluoxetina via oral (10 mg/kg) não reduziu o edema induzido pelo TPA, enquanto a grupo tratado com dexametasona via oral foi capaz de reverter o edema em $81,92 \pm 1,01\%$ no dia 9 (Figura 8).

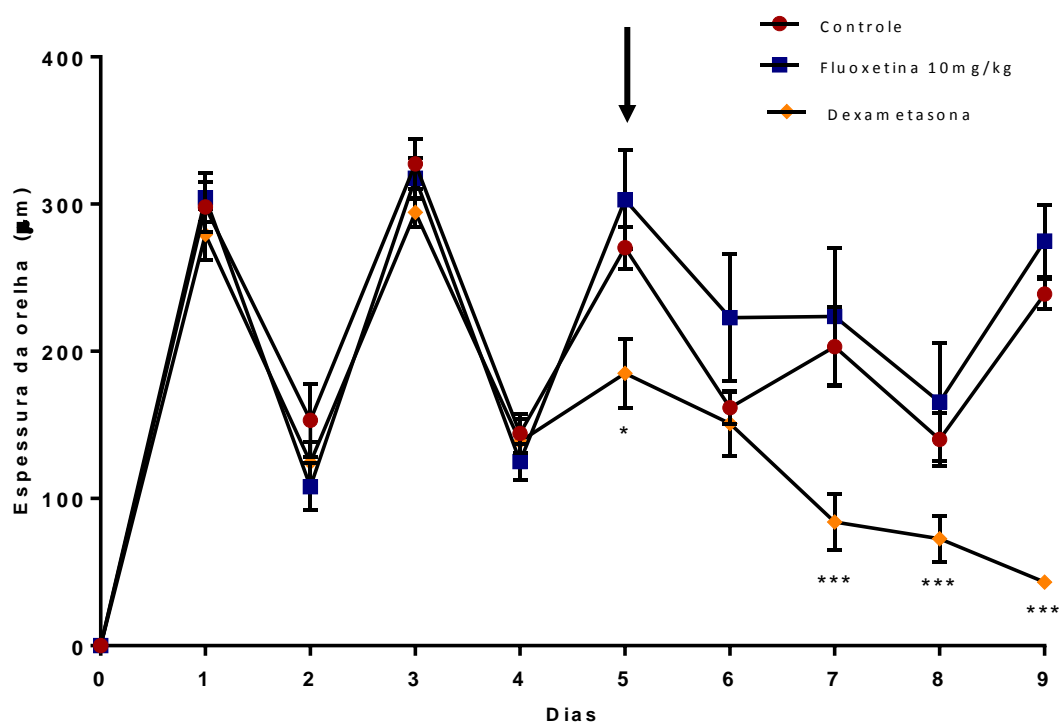


FIGURA 8: Avaliação do Edema no Modelo de Inflamação Cutânea induzida por TPA.

O processo inflamatório crônico foi induzido com a aplicação tópica de TPA em dias alternados durante 9 dias. A Fluoxetina (10mg/kg) e a dexametasona (3mg/kg) foram administrados durante 4 dias, duas vezes ao dia (12/12 h) a partir do quinto dia de experimento e a espessura da orelha medida diariamente. Os valores estão expressos como média \pm EPM ($n=4-6$). Os símbolos representam o nível de significância em relação ao controle (TPA). *** $P < 0,001$ e * $P < 0,05$. A seta indica o início do tratamento.

Na Figura 9, a aplicação tópica de TPA na orelha dos camundongos produziu um aumento da atividade das enzimas MPO (Figura 9A) e NAG (Figura 9B). Novamente o tratamento com creme de fluoxetina não foi capaz de modificar o aumento na atividade das enzimas. Já o controle positivo, dexametasona, promoveu a redução da atividade enzimática MPO em $91,7 \pm 0,1\%$ e da NAG em $43,9 \pm 0,6\%$.

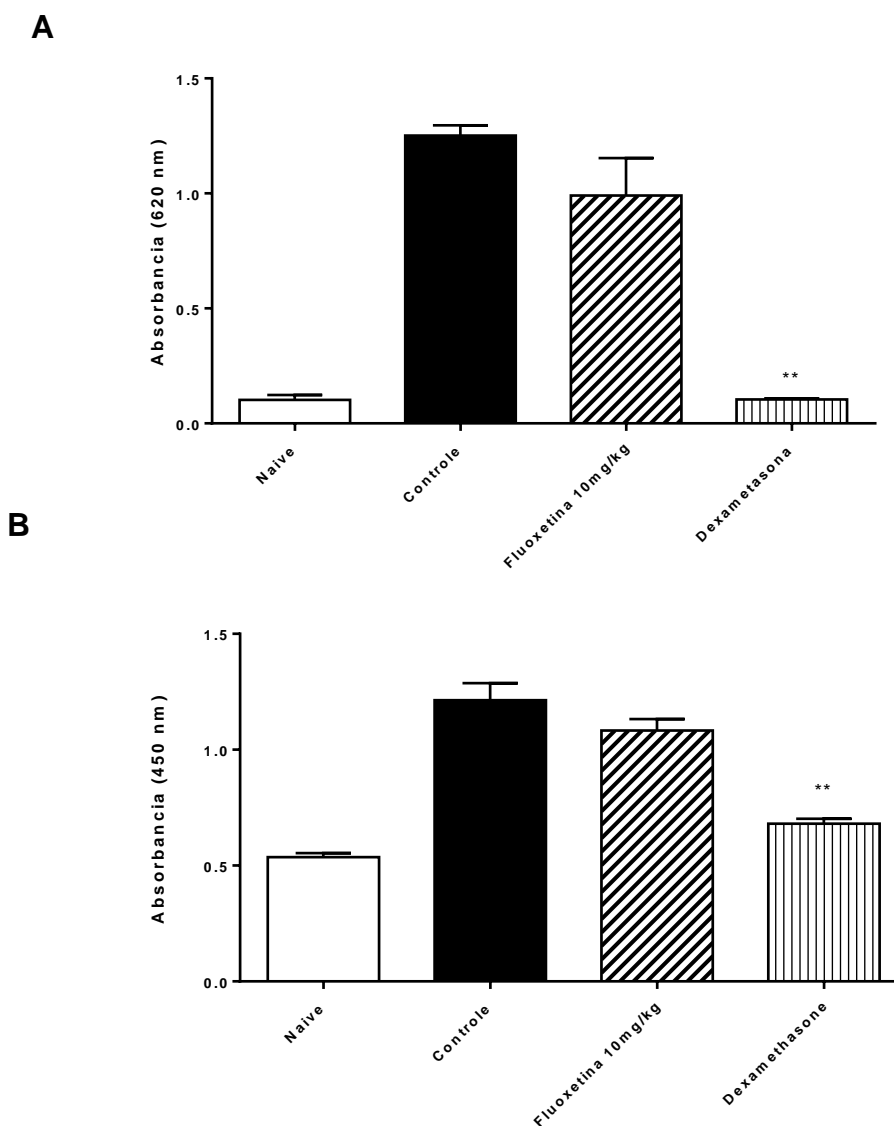


FIGURA 9: Efeito da Fluoxetina via tópica na atividade das enzimas MPO e NAG induzidas pela aplicação múltipla de TPA. O processo inflamatório crônico foi induzido com a aplicação tópica de TPA em dias alternados durante 9 dias. A Fluoxetina via oral (10 mg/kg) e a dexametasona via oral (3 m/kg) foram administrados durante 4 dias, duas vezes ao dia (12/12 h) a partir do quinto dia de experimento. O processo inflamatório crônico foi induzido com a aplicação tópica de TPA em dias alternados durante 9 dias. No último dia de

tratamento amostras das orelhas foram coletadas e submetidas à análise da atividade da MPO (A) e da NAG (B). As barras verticais representam a média \pm EPM (n=3). Os símbolos representam o nível de significância em relação ao controle (C) ou veiculo (V), respectivamente. **P<0,01.

Com as biópsias coletadas das orelhas dos animais, foi possível verificar através da histologia, o espessamento epidérmico e a migração de células inflamatórias. Na Figura 10, estão fotos representativas dos grupos Grupos (A) Naive (B) Controle (C) Fluoxetina via oral (10 mg/kg) e (D) Dexametasona via oral. Na Figura 11A, o resultado da avaliação da espessura da epiderme demonstra o aumento obtido com a aplicação de TPA e a redução significativa no grupo tratado com TPA + dexametasona com ($55,31 \pm 0,6\%$). A aplicação tópica de TPA promoveu um aumento expressivo na migração celular e não foi possível observar diferença estatística no efeito da fluoxetina via oral (10 mg/kg) (Figura 11B). O controle positivo, dexametasona via oral foi capaz de reduzir a migração em de $31,68 \pm 0,5\%$ em relação ao grupo controle (TPA).

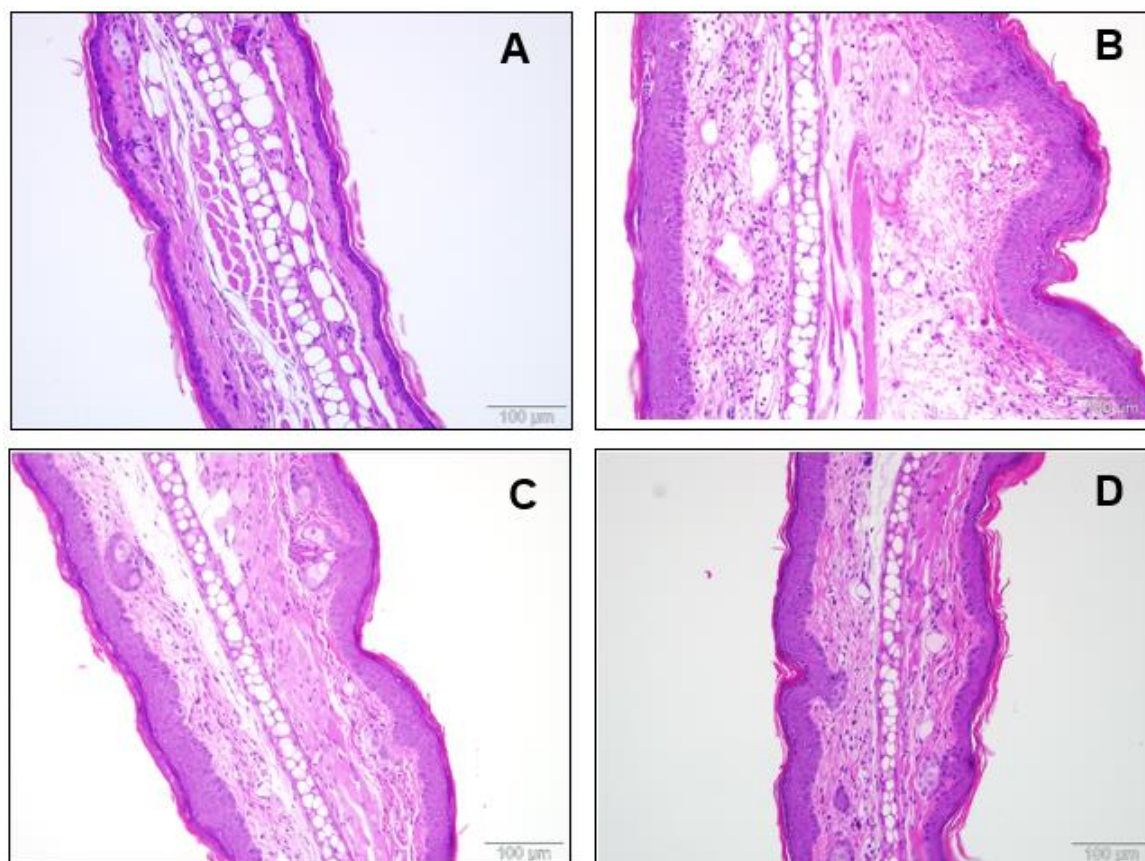


FIGURA 10: Avaliação da Espessura da Epiderme das amostras obtidas do Modelo de Inflamação Cutânea induzida por TPA. Fotos representativas de cortes histológicos das orelhas dos camundongos submetidos ao modelo de edema de orelha induzido por TPA corados com HE, aumento de 200x, escala de 100 μm . Sendo representados, o grupo (A) Naive (B), Controle (C) Fluoxetina via oral (10 mg/kg) (D) Dexametasona via oral (3 mg/kg). Análise da espessura da epiderme. As barras verticais representam a média \pm EPM (n=3). Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle (TPA), ****P<0,001.

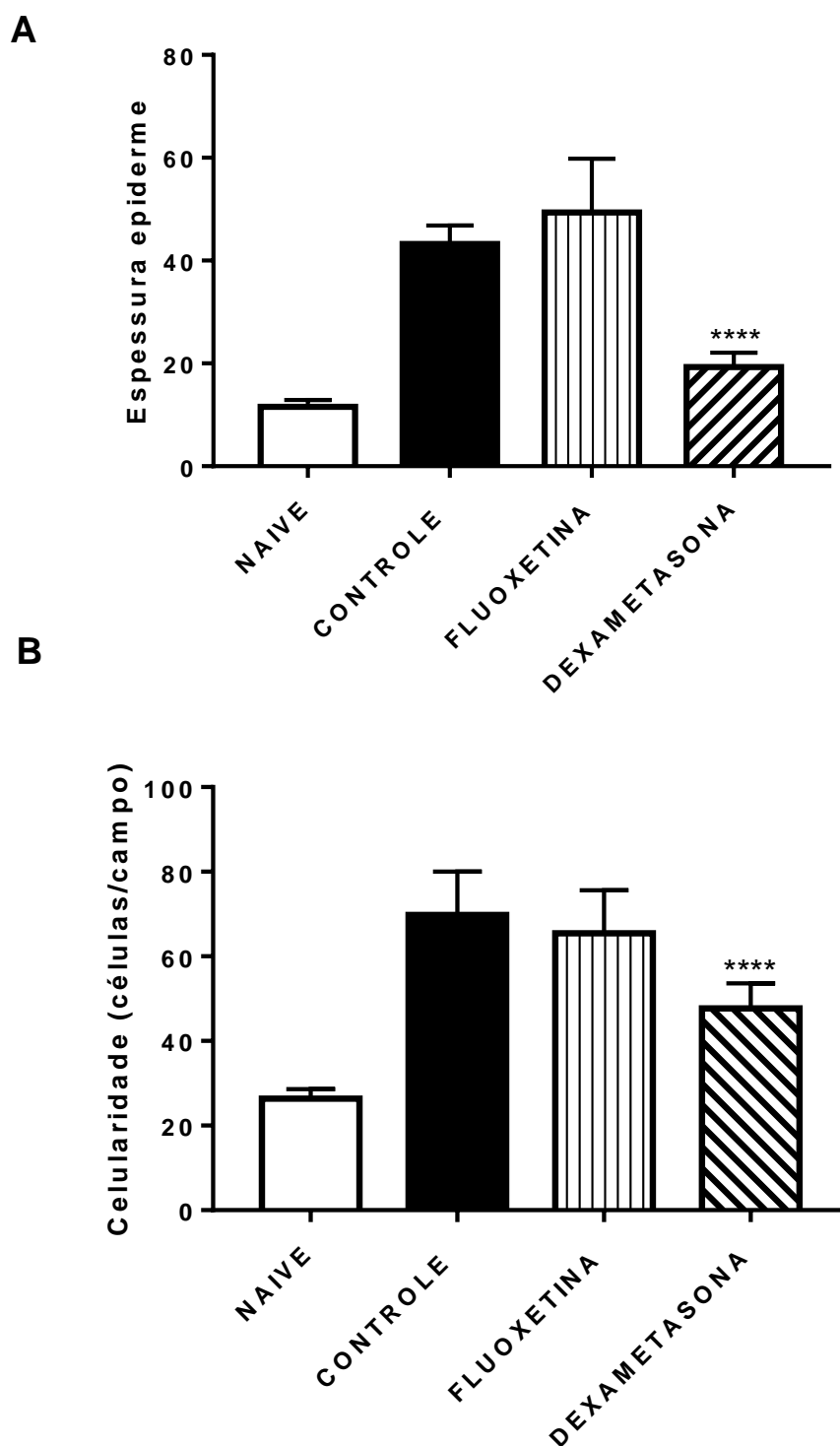


Figura 11: Avaliação da Espessura e de Inflamação Cutânea induzida por TPA. Efeito do tratamento com Fluoxetina (10 mg/kg) e da Dexametasona (3 mg/kg) sobre a migração leucocitária e espessamento epidérmico induzida pela aplicação múltipla de TPA. A Fluoxetina e a dexametasona foram administrados durante 4 dias, duas vezes ao dia (12/12 h) a partir do quinto dia de experimento. Em (A) a análise da espessura das epidermes e

em (B) a quantificação realizada através da contagem do número de células na derme, com aumento de 400x em cinco campos distintos de três cortes histológicos diferentes de três animais de cada grupo. As barras verticais representam a média \pm EPM (n=3). Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle (TPA), ****P<0,001.

6.3. Efeitos do tratamento com creme de Fluoxetina no modelo de inflamação cutânea induzida por aplicações múltiplas de TPA

Como a fluoxetina apresentou efeito quando aplicado por via tópica diluída em acetona, apresentando efeito local, e após testar a fluoxetina via oral no modelo de inflamação através de múltiplas aplicações de TPA, foi testado posteriormente a fluoxetina via tópica. Os resultados mostraram que o tratamento com a fluoxetina (creme 5%) não foi capaz de alterar o edema causado pela aplicação repetida de TPA na orelha. Já o controle positivo, dexametasona creme 0,1% foi capaz de reverter o edema em $81,92 \pm 0,9\%$ no 9º dia (Figura 12).

Conforme ilustrado na Figura 13, a aplicação tópica de TPA na orelha dos camundongos produziu um aumento da atividade das enzimas MPO (Figura 13A) e NAG (Figura 13B). Novamente o tratamento com creme de fluoxetina não foi capaz de modificar o aumento na atividade das enzimas. Já o controle positivo, dexametasona, promoveu a redução da atividade enzimática MPO em $91,7 \pm 0,6\%$ e da NAG em $43,9 \pm 0,5\%$.

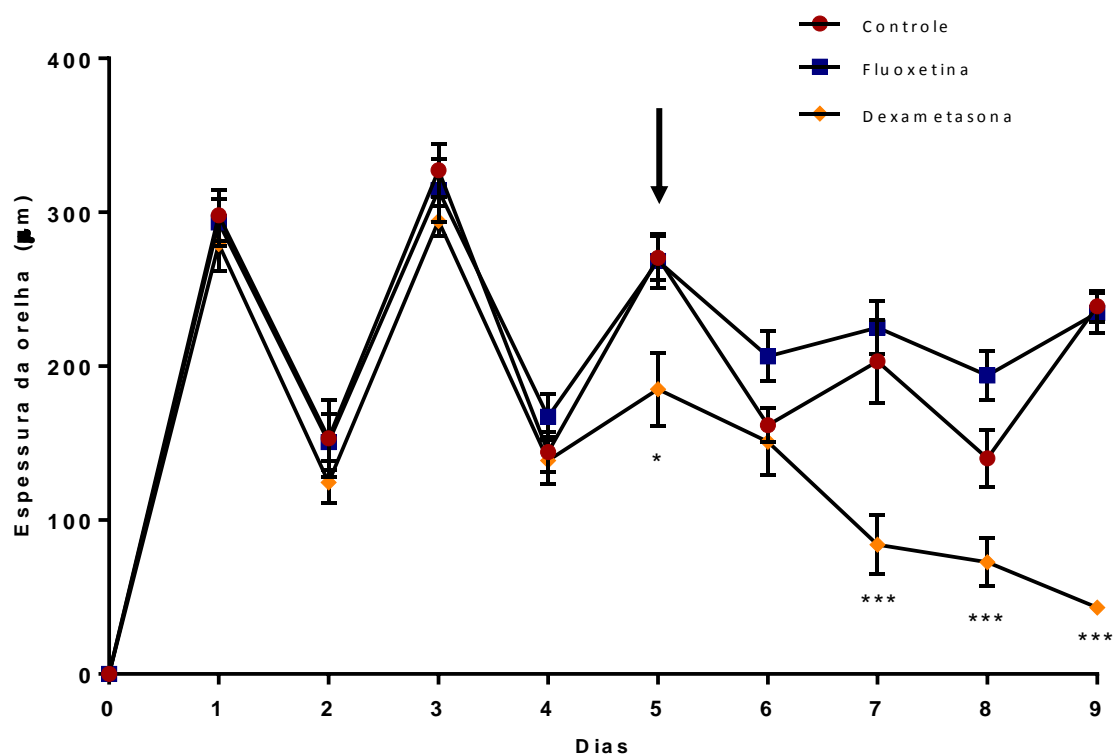
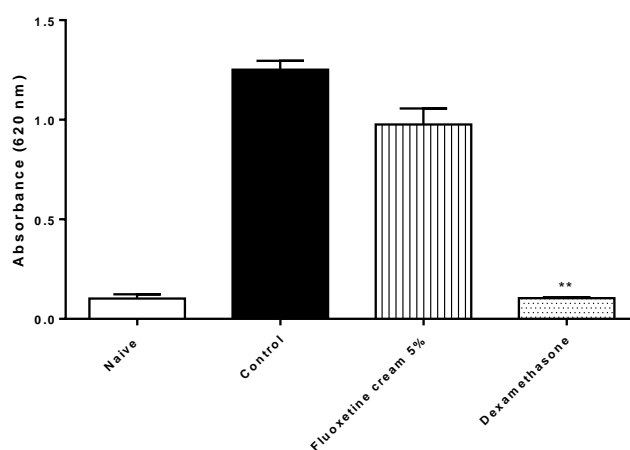


Figura 12: Efeito do creme de Fluoxetina no Edema induzido por aplicações repetidas de TPA. O processo inflamatório crônico foi induzido com a aplicação tópica de TPA em dias alternados durante 9 dias. A Fluoxetina (tópica - creme 5%; e a dexametasona (tópica - creme 0,1%) foram aplicados topicamente durante 4 dias, duas vezes ao dia (12/12 h) a partir do quinto dia de experimento e a espessura da orelha medida diariamente. Os valores estão expressos como média \pm EPM ($n=4-6$). Os símbolos representam o nível de significância em relação ao controle (TPA). *** $P < 0,001$ e * $P < 0,05$. A seta indica o início do tratamento.

A



B

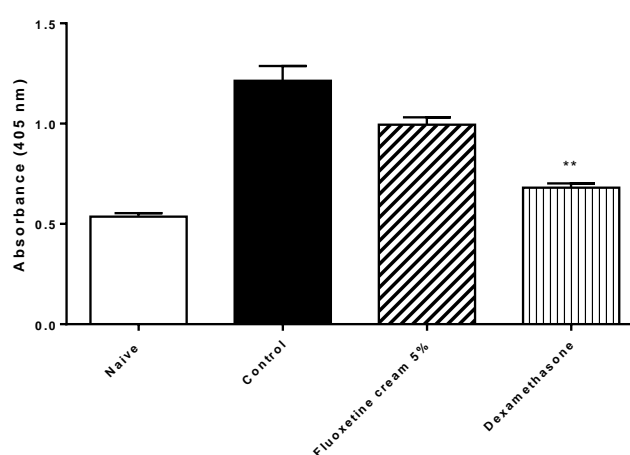


Figura 13: Efeito do creme de Fluoxetina na atividade das enzimas MPO e NAG induzidas pela aplicação múltipla de TPA. O processo inflamatório crônico foi induzido com a aplicação tópica de TPA em dias alternados durante 9 dias. A Fluoxetina (tópica - creme 5%; e a dexametasona (tópica - creme 0,1%) foram administrados durante 4 dias, duas vezes ao dia (12/12 h) a partir do quinto dia de experimento. O processo inflamatório crônico foi induzido com a aplicação tópica de TPA em dias alternados durante 9 dias. No último dia de tratamento amostras das orelhas foram coletadas e submetidas à análise da atividade da MPO (A) e da NAG (B). As barras verticais representam a média \pm EPM (n=3). Os símbolos representam o nível de significância em relação ao controle (C) ou veiculo (V), respectivamente. **P<0,01.

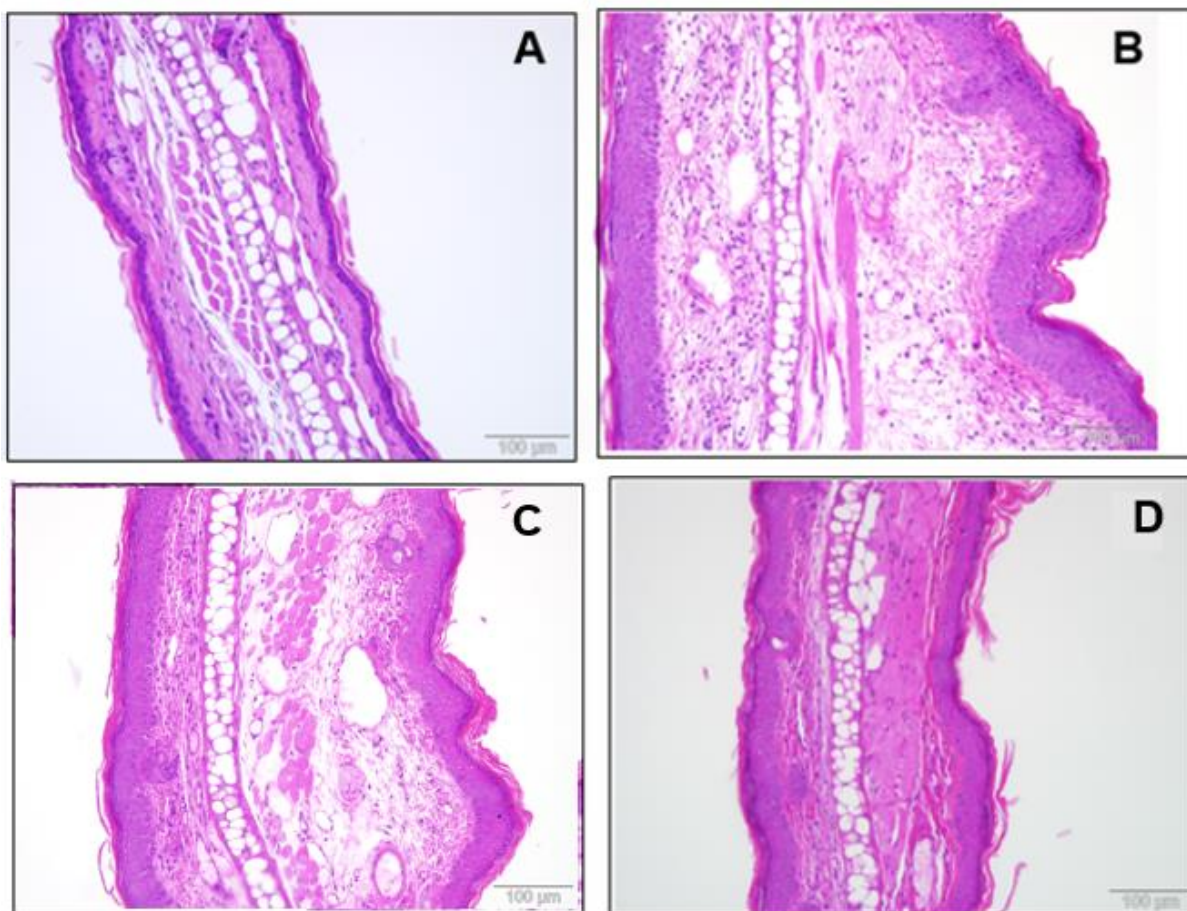


Figura 14: Avaliação da Espessura da Epiderme das amostras obtidas do Modelo de Inflamação Cutânea induzida por TPA. Fotos representativas de cortes histológicos das orelhas dos camundongos submetidos ao modelo de edema de orelha induzido por TPA corados com HE, aumento de 200x, escala de 100 µm. Sendo representados, o grupo (A) Naive (B), Controle (C) Fluoxetina creme 5% (D) Dexametasona creme (0,1%). Análise da espessura da epiderme. As barras verticais representam a média \pm EPM (n=3). Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle (TPA), ****P<0,001

Com as biópsias coletadas das orelhas dos animais, foi possível verificar através da histologia, o espessamento epidérmico e a migração de células inflamatórias. Na Figura 14, estão fotos representativas dos grupos Grupos (A) Naive (B) Controle (C) Fluoxetina creme 5% (D) Dexametasona creme 0,1 % . Na Figura 15A, o resultado da avaliação da espessura da epiderme demonstra o aumento obtido com a aplicação de TPA e a redução significativa no grupo tratado com TPA + dexametasona com ($39,1 \pm 0,7\%$). A aplicação tópica de TPA promoveu um aumento expressivo na migração celular de $62,2 \pm 0,5\%$. Não foi possível

observar diferença estatística no efeito do creme de fluoxetina em relação ao grupo controle (Figura 15B). O controle positivo, dexametasona em creme foi capaz de reduzir a migração em de $46,4 \pm 0,5\%$ em relação ao grupo controle (TPA).

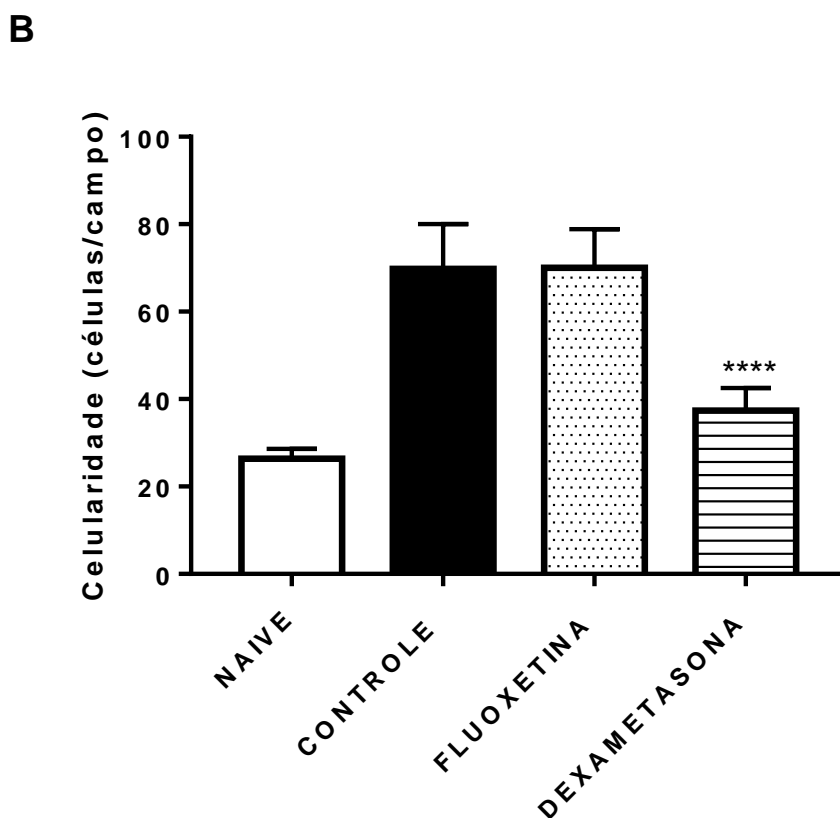
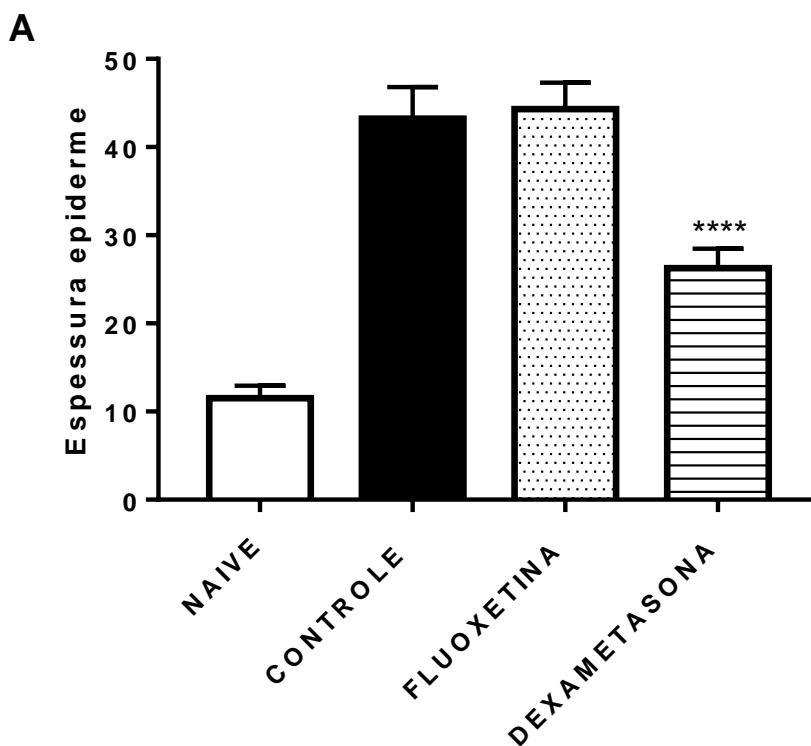


Figura 15: Avaliação da Espessura de Inflamação Cutânea induzida por TPA. Efeito do tratamento tópico com Fluoxetina (1,0 mg/orelha) e da dexametasona (0,1 mg/orelha) sobre a migração leucocitária induzida pela aplicação múltipla de TPA. A Fluoxetina via oral (10mg/kg) e a dexametasona (tópica - creme 0,1%) foram administrados durante 4 dias, duas vezes ao dia (12/12 h) a partir do quinto dia de experimento. Em (A) a análise da espessura das epidermes e em (B) a quantificação realizada através da contagem do número de células na derme, com aumento de 400x em cinco campos distintos de três cortes histológicos diferentes de três animais de cada grupo. As barras verticais representam a média \pm EPM (n=3). Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle (TPA), ****P<0,001. Em (A) Análise da espessura da epiderme. As barras verticais representam a média \pm EPM (n=3). Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle (TPA), ****P<0,001.

7. DISCUSSÃO

A psoríase é uma doença de pele com caráter inflamatório e imune e o aparecimento dos sintomas são alvo de desconforto para o paciente. Além da dor e coceira, outra comorbidade que vem se tornando muito comum nesses pacientes é associação com a depressão. No Reino Unido, foram registrados mais de 10.400 diagnósticos de depressão, 7100 diagnósticos de ansiedade e 350 diagnósticos de probabilidade de suicídio atribuíveis à psoríase por ano (Schmid et al 2010). Os efeitos da administração de antidepressivos em pacientes com doenças de pele, entre elas a psoríase, mostraram-se positivos em relação a melhora do bem estar social do paciente, porém nada foi relatado em relação às lesões. Sendo que após a avaliação do score de ansiedade e depressão, foi de 67.2% de melhora da depressão contra 18.8% de piora; já quando analisado a ansiedade o score foi de 67.5% de melhora e 20.3% de piora da ansiedade. Esses dados foram coletados após 2 semanas de tratamento com antidepressivo da classe ISRS (Lebwohl, et al. 2017). Dessa forma sabendo-se da presença de receptores de serotonina na pele (Nordlind, Azmitia, & Slominski, 2007) buscamos a correlação entre uma possível melhora das lesões psoriáticas associadas ao uso do antidepressivo fluoxetina, pertencente a classe de inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS).

Já se sabe que a utilização oral da fluoxetina promove o aumento da neurotransmissão serotoninérgica através da inibição seletiva da recaptção neuronal da serotonina (Lin, et al. 2009). Não há evidências bibliográficas que abordem o mecanismo de ação por administração da fluoxetina via tópica. Porém, em 2012 um estudo realizado com crianças da unidade psiquiátrica infantil do hospital da Colúmbia Britânica testou a administração tópica de fluoxetina nos pulsos das crianças (Elbe, et al. 2014). Neste trabalho decidimos avaliar os possíveis efeitos do tratamento com fluoxetina, tanto por via tópica como por via oral, no modelo de inflamação cutânea induzida por TPA. Com o objetivo de separar os efeitos entre sistêmico e local do tratamento com fluoxetina, testamos as vias oral e tópica para verificar a influência desse antidepressivo no processo inflamatório semelhante à psoríase.

Ao testar no modelo de indução da inflamação cutânea com TPA, a fluoxetina diluída em acetona e aplicada por via tópica demonstrou melhora em relação ao grupo TPA, em todos os parâmetros avaliados (edema, infiltrado celular e espessura da epiderme). Entretanto não houve o mesmo resultado com a fluoxetina em creme 5% aplicada topicamente, nem na administração via oral a 10 mg/kg durante 5 dias. Em que em ambos casos não houve nenhuma alteração no processo inflamatório ou na hiperproliferação epidermal.

De modo complementar, foram realizadas as avaliações da atividade enzimática das enzimas MPO e NAG com as amostras coletadas dos testes com fluoxetina creme e por via oral. Novamente este resultado mostrou que o tratamento com a fluoxetina em creme e por via oral não foram capazes de reduzir a atividade enzimática de modo significativo, indicando que não houve redução da presença de células marcadoras de inflamação (neutrófilos e células polimorfonucleares), diferente do observado no tratamento com dexametasona.

A resposta inflamatória produzida pelo TPA, que é um éster de forbol, consiste em provocar um efeito irritativo súbito e eficiente na pele devido a ativação direta da proteína quinase C, promovendo a ativação de MAPKs capazes de ativar a transcrição de fatores nucleares como NF- κ B e AP-1, promovendo a liberação de diversas proteínas pró-inflamatórias (Denning, 2010). Neste processo, a ativação da PKC também leva a ativação da enzima fosfolipase A₂ que promove o metabolismo do AA em prostaglandinas e leucotrienos. De modo continuado, a aplicação do TPA e a ativação constante dessa via, causa aumento na proliferação de queratinócitos gerando a hiperplasia epidermal, semelhante ao observado na pele psoriática (Lowe, et al. 2012). Nossos resultados mostraram que a fluoxetina quando aplicada direta na pele foi capaz de reduzir todo o processo inflamatório da pele causado pelo TPA. Esse efeito da fluoxetina foi importante de modo a reduzir o edema, a migração leucocitária e a hiperplasia epidermal. Esse efeito da fluoxetina sugere que ela apresenta atividade anti-inflamatória com ação local. Além disso, o composto tem atividade, portanto esta permeando a pele. Somente drogas como os glicocorticoides possuem ação semelhante neste modelo, como o controle positivo utilizado a dexametasona. As principais drogas tópicas utilizadas no tratamento da psoríase é o calcipotriol e os corticosteróides são os medicamentos tópicos mais frequentemente prescritos devido a sua ação de agir em vias anti-inflamatórias,

antiproliferativa e imunossupressoras, afetando a expressão gênica. Porém a ação dos corticoides na psoríase ainda não é totalmente elucidado (Arndt, et al. 2016)

Entretanto há outras opções de tratamento tópico empregados no tratamento, por exemplo a utilização de emolientes, agentes queratolíticos, alcatrão de carvão, antralina, metotrexato, ciclosporina, etretinado, vitamina D, calcipotriol aliada com betametasona, tazaroteno, (Psoriasis, 1995; Arndt, et al. 2016) Além disso foi visto que o veículo a qual a droga é incorporada pode ser crucial para a eficácia do tratamento (Arndt, et al. 2016)

Infelizmente, a formulação de creme de fluoxetina não apresentou o mesmo resultado da aplicação com acetona. Provavelmente a incorporação da droga no creme não iônico usado como veículo alterou a permeação da fluoxetina, de modo a impedir sua ação. No entanto, para confirmarmos esta observação novos testes são necessários. Para ser eficaz os agentes tópicos devem ser capazes de atravessar as camadas mais profundas da pele e o tipo de veículo é capaz de controlar grande parte da entrada da droga na pele. Dentre os veículos já avaliados em estudos anteriores a espuma se mostrou mais eficaz devido a maior penetração na pele sem alterar o medicamento associado (Arndt et al., 2016) Para viabilizar o uso da fluoxetina por via tópica, outros veículos precisam ser testados.

Para confirmar o efeito da fluoxetina, utilizamos a via mais comum para seu uso clínico, ou seja, a via oral. Novamente, com o protocolo de 5 dias de tratamento não pudemos detectar qualquer efeito anti-inflamatório da fluoxetina sobre a inflamação crônica na pele. A fluoxetina é um fármaco utilizado para tratar transtornos como depressão. Seu uso por via oral é inicialmente de 20 mg/kg e a concentração sérica é estabilizada a partir de 4 semanas de uso contínuo do medicamento. Adicionalmente após o início do tratamento com fluoxetina foram observados que nas primeiras 5 semanas a concentração do fármaco no cérebro é maior, necessitando de pelo menos 1 mês de tratamento contínuo para que os benefícios do tratamento possam ser notados (Zoric, et al. 2018)

Na combinação desses resultados, podemos indicar que novos protocolos e outras doses da fluoxetina devem ser investigados, com a intenção de confirmar o efeito obtido com a aplicação tópica em acetona.

Uma vez que sabe-se que a fluoxetina é um antidepressivo pertencente a classe de inibidores seletivos da recaptção da serotonina (ISRS) (Lebwohl et al., 2017) buscamos investigar um possível aumento e interação de serotonina na pele

com os receptores desse importante neurotransmissor existentes na pele (Nordlind et al., 2007) (Clerck et al., 1994) afim de levar a uma possível melhora das lesões presentes na pele. Nesse modelo em questão, após o tratamento com fluoxetina em creme e via oral, não houve melhora nas lesões do dorso dos animais e nem alteração nos parâmetros inflamatórios analisados, diferente do observado com a administração da dexametasona em creme e oral, capaz de promover a melhora das lesões, reduzir o infiltrado celular e a atividade enzimática, porém deixando os animais bastante debilitados. Por mais que haja efetividade há uma grande incidências de efeitos colaterais com o uso de dexametasona, sendo os mais graves úlcera fatal com hemorragia, sangramento retal e perfuração gastrointestinal de origens idiopática além perfuração do cólon sigmoide (Heimdal, et al. 1998)

A importância de novos estudos referente ao desenvolvimento de novas potenciais drogas no tratamento da psoríase, deve-se ao riscos e graves efeitos colaterais existentes no atual tratamento utilizado, por exemplo, com imunossupressores (Menting, et al.2016)

O presente estudo foi pioneiro ao estudar os possíveis efeitos do tratamento com fluoxetina em diferentes vias de administração em um modelo de inflamação cutânea. Assim, mostramos que a fluoxetina tem efeito por via tópica na inflamação da pele e este efeito é importante para iniciar o entendimento sobre a um possível efeito anti-inflamatorio/antiproliferativo da fluoxetina, dos inibidores da recaptação de serotonina ou ainda da participação da serotonina na psoríase. São necessárias avaliações futuras mais aprofundadas para conseguir elucidar estas questões.

8. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que a fluoxetina apresenta efeito anti-inflamatório quando utilizada por via tópica, mas somente quando preparada em acetona. Novos protocolos para testar o efeito da fluoxetina na inflamação da pele devem ser desenvolvidos. Além disso, outra questão a ser verificada é se é a fluoxetina que possui esse efeito, ou se é o seu mecanismo de ação que pode estar correlacionado com a ação antipsoriática, ou seja, outros fármacos antidepressivos também devem ser testados assim como o sistema da serotonina.

9. REFERÊNCIAS

- Abdel-salam, O. M. E., Nofal, S. M., & El-shenawy, S. M. Evaluation of the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of different antidepressants in the rat. *Pharmacological Research*. (2003)
- Abraham M. Korman BS, Dane Hill MD, Ali Alikhan MD & Steven R. Feldman MD. Impact and management of depression in psoriasis patients, *Expert Opinion on Pharmacotherapy* (2015)
- Andrade, B., Vilac, A., Uemura, G., Lopes, A., & Canc, W. N -acetylglucosaminidase , myeloperoxidase and vascular endothelial growth factor serum levels in breast cancer patients. *ScienceDirect Biomedicine & Pharmacotherapy*. (2014)
- Aparecida, A., & Reis, D. O. S. Aspectos de comprometimento articular em relação com os aspectos alexandra aparecida dos reis psoríase: aspectos de comprometimento articular em relação com os aspectos (2017)
- Arndt, K. A., Leboit, P. E., Wintroub, B. U., & Gold, L. F. S. Topical Therapies for Psoriasis : Improving Management Strategies and Patient Adherence. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*. (2016)
- Arruda, S., Oliveira, S. De, Pereira, R., Rosa, C., Silva, A., & Mary, R. *Revista Brasileira de Enfermagem*. (2011).
- Azmitia, E. C. Modern views on an ancient chemical: Serotonin effects on cell proliferation , maturation , and apoptosis. *Brain Research Bulletin* (2001)
- Benfield, P., Heel, R. C., & Lewis, S. P. A Review of Its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties , and Therapeutic Efficacy in Depressive Illness Fluoxetine (1986)
- Bradley, P.P. Measurement of Cutaneous Inflammation: Estimation of Neutrophil Content with an Enzyme Marker. *The journal of investigative dermatology* (1982)
- Blauvelt, A.. New concepts in the pathogenesis and treatment of psoriasis : key roles for IL-23 , IL-17A and TGF- β . *Expert Rev. Dermatol* (2007)
- Carvalho, S., Torres, T., & Selores, M. Artigo de Revisão TRATAMENTO DA PSORÍASE COM AGENTES BIOLÓGICOS: PARA ALÉM DOS INIBIDORES DO TNF α – O PRESENTE E O FUTURO. *Revista SPDV*. (2012)
- Cassano N, Mastrandrea V, Vestita M, Vena GA. An overview of delayed pressure urticaria with special emphasis on pathogenesis and treatment. *Dermatol Ther* 2009;
- Chen, F, et al. mTOR Mediates IL-23 Induction of Neutrophil IL-17 and IL-22. *The Journal of Immunology*. (2016)
- Chuang, S., Lin, C., Sung, C. T., & Fang, J. (2018). Murine models of psoriasis and their usefulness for drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*. (2018)
- Clerck, F., David, J. L., e Janssen, P. A. J. Inhibition of 5-hydroxytryptamine-induced and-amplified human platelet aggregation by ketanserin (R 41 468), a selective 5-HT₂-receptor antagonist. *Agents and Actions*. (1994)
- Coelho, B.A. et al. N-acetylglucosaminidase, myeloperoxidase and vascular endothelial growth factor serum levels in breast cancer patients. *ScienceDirect*. (2013)
- Corden, L.D e Whi, M. Human keratin diseases: Hereditary fragility of specific epithelial tissues. *Exp Dermatol*. (1996)
- Cronstein, B. N. The mechanism of action of methotrexate. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. (1997)
- D'Erme, A.M. et al. Therapeutic implications of adding the psychotropic drug

- escitalopram in the treatment of patients suffering from moderate–severe psoriasis and psychiatric comorbidity: a retrospective study. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* . (2012)
- Denning, M. F. Protein Kinase C / Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Keratinocyte Differentiation Control. *Journal of Investigative Dermatology*. (2010)
- Dowlatshahi, E. A., Wakkee, M., Herings, R. M. C., Hollestein, L. M., & Nijsten, T. Increased Antidepressant Drug Exposure in Psoriasis Patients: A Longitudinal Population-based Cohort Study.(2013)
- Elbe, D., Wicholas, L., & Frçp, C. Lack of Detectable Serum Levels Following Topical Fluoxetine Administration in a Child. *Journal of child and adolescent psychopharmacology*. (2014)
- Eskerland,S. et al. Antidepressants have Anti-inflammatory Effects that may be Relevant to Dermatology: A Systematic Review. *Acta Derm Venereol* (2017)
- Esporcatte, R. et al. Valor Preditivo da Mieloperoxidase na Identificação de Pacientes de Alto Risco Admitidos por Dor Torácica Aguda. *Arq Bras Cardiol* (2007)
- Flutter, B e Nestle, F.O. TLRs to cytokines: Mechanistic insights from the imiquimod mouse model of psoriasis. *Eur. J. Immunol.* (2013)
- Glynn, R. J., MacFadyen, J. G., & Ridker, P. M. Tracking of high-sensitivity C-reactive protein after an initially elevated concentration: The JUPITER study. *Clinical Chemistry*. (2009)
- Gonzalez, J., Cunningham, K., Perlmutter, J., & Gottlieb, A. Systematic Review of Health-Related Quality of Life in Adolescents with Psoriasis. *Dermatology* (2016)
- Gottlieb, A. B., Chamian, F., Masud, S., Cardinale, I., Abello, M. V., Lowes, M. A., ... Krueger, J. G. TNF Inhibition Rapidly Down-Regulates Multiple Proinflammatory Pathways in Psoriasis Plaques. *The Journal of Immunology*, (2005)
- Gudmundsdottir, A. S., Sigmundsdottir, H., & Sigurgeirsson, B. (1999). Is an epitope on keratin 17 a major target for autoreactive T lymphocytes in psoriasis? *Clin Exp Immunol.* (1999)
- Gupta, M. A. et al. Suicidal ideation in psoriasis. *International Journal of Dermatology*. (1993)
- Heimdal, K., et al. High incidence of serious side effects of high-dose dexamethasone treatment in patients with epidural spinal cord compression. *Journal of Neuro-Oncology*. (1992)
- Hiemke, C. e Härtter, S. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors, *Pharmacology & Therapeutics*. (2000)
- Huang, J., Li, G., Xiang, J., Yin, D., & Chi, R. Immunohistochemical study of serotonin in lesions of psoriasis. *The International Society of Dermatology* (2004)
- Jiawen, W., Hong, S., Shengxiang, X., & Jing, L. Depression- and anxiety-like behaviour is related to BDNF / TrkB signalling in a mouse model of psoriasis. *Clinical and Experimental Dermatology*. (2018)
- Kenis, G., & Maes, M. Effects of antidepressants on the production of cytokines. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. (2002)
- Kerkhoe, P. C. Methotrexate revisited: effects of long-term treatment in psoriasis. *British Journal of Dermatology*. (1994)
- Kimball, A. B., Wu, E. Q., Gu, A., Yu, A. P., & Tsaneva, M. Patients with psoriasis. *J. AM ACAD DERMATOL* (2012)

- Kirby, B., Richards, H. L., Mason, D. L., Fortune, D. G., Main, C. J., & Griffiths, C. E. M. Alcohol consumption and psychological distress in patients with psoriasis. *British Journal of Dermatology*. (2008)
- Kubera, M. et al. Anti-Inflammatory Effects of Antidepressants Through Suppression of the Interferon- α /Interleukin-10 Production Ratio. *Journal of Clinical Psychopharmacology*. (2001)
- Kurd, S.K. et al. The Risk of Depression, Anxiety, and Suicidality in Patients With Psoriasis. *Arch Dermatol*. (2010)
- Leask, A., Rosenberg, M., Vassar, R., & Fuchs, E. Regulation of a human epidermal keratin gene: sequences and nuclear factors involved in keratinocyte-specific transcription. Cold Spring Harbor Laboratory Press Leask (1998)
- Lebwohl, M. G., Papp, K. A., & Marangell, L. B. Psychiatric adverse events during treatment with brodalumab: Analysis of psoriasis clinical trials. *Journal of American Dermatology*. (2017)
- Leigh, I. M., Navsaria, H., Purkis, P. E., McKay, I. A., Bowden, P. E., & Riddle, P. N. Keratins (K16 and K17) as markers of keratinocyte hyperproliferation in psoriasis in vivo and in vitro. *British Journal of Dermatology*. (1995)
- Liu, Y., Wei, L., Laskin, D. L., & Fanburg, B. L. Role of Protein Transamidation in Serotonin-Induced Proliferation and Migration of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*.(2010)
- Lowes, M. A., Kikuchi, T., Fuentes-duculan, J., Cardinale, I., Zaba, L. C., Haider, A. S., ... Krueger, J. G. Psoriasis Vulgaris Lesions Contain Discrete Populations of Th1 and Th17 T Cells. (2008)
- Lowes, M. A., Russell, C. B., Martin, D. A., Towne, J. E., & Krueger, J. G. The IL-23 / T17 pathogenic axis in psoriasis is amplified by keratinocyte responses. *Trends in Immunology*. (2012)
- Mallbris, L., Akre, O., Granath, F., Yin, L., Lindelo, B., Ekbom, A., & Sta, M. . Increased risk for cardiovascular mortality in psoriasis inpatients but not in outpatients. *European Journal of Epidemiology*. (2004)
- Naldi, L., et al. Cigarette Smoking, Body Mass Index, and Stressful Life Events as Risk Factors for Psoriasis: Results from an Italian Case–Control Study. *The Society for Investigative Dermatology*. (2005).
- Nordlind, K., Azmitia, E. C., & Slominski, A. The skin as a mirror of the soul: exploring the possible roles of serotonin. *Experimental Dermatology* (2008)
- Ogawa, K., Henry, J., Cy, H., Haftek, M., Nachat, R., Hd, K. Schmitt, D. A Transethnic Mendelian Randomization Study Identifies Causality of Obesity on Risk of Psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*. (2019)
- Parletta, N. *The Gut-Brain-Microbe Interaction: Relevance in Inflammation and Depression. Inflammation and Immunity in Depression*. Elsevier Inc (2018)
- Paula, A., & Sanchez, G. Immunopathogenesis of psoriasis. *An Bras Dermatol* (2010)
- Pinto, C., Monteiro, E., Marques, C., Azevedo, M., & Manso, C. (1990). ESTUDO DA ACTIVIDADE DA / 3-N- HEPÁTICA CRÓNICA ALCOÓLICA, 75–79.
- Rieder, E., & Tausk, F. Psoriasis, a model of dermatologic psychosomatic disease: psychiatric implications and treatments (2012)
- Risco, A., & Torácica, D. Artigo Original Valor Preditivo da Mieloperoxidase na Identificação de Pacientes de.
- Roenigk, H. et al. Methotrexate in psoriasis: Revised guidelines. *Journal of the American Academy of Dermatology*. (1988)
- Rodrigues AP, Teixeira RM. Desvendando a psoríase. *Rev Bras Anal Clin*. (2009)

- Silveira, m.E.B, et al. Epidemiological profile and quality of life in psoriasis. *Rev Soc Bras Clin Med.* (2017)
- Roman,R.M. et al. Mieloperoxidase e Doença Arterial Coronariana: da Pesquisa à Prática Clínica. *Arq Bras Cardiol.* (2007)
- Schmid, S. et al. IL-17 production byCSF lymphocytes as a biomarker for cerebral vasculitis. *American Academy of Neurology.* (2016)
- Suzuki, K. We are IntechOpen , the world ' s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 % Control of a Proportional Hydraulic System. *Intech Open.* (2014)
- Tan, L., Lin, P., Psych, M. M., Kwek, S. K., & Psych, M. M. Onset of psoriasis during therapy with fluoxetine. *General Hospital Psychiatry.* (2010)
- Thom, V., Gelderblom, M., Keminer, O., Pleß, O., Bernreuther, C., Glatzel, M., ... Tolosa, E. IL-17 production by CSF lymphocytes as a biomarker for cerebral vasculitis. *American Academy of Neurology.* (2016)
- Thorslund, K., Svensson, T., Nordlind, K., Ekbom, A., & Fored, C. M. Use of serotonin reuptake inhibitors in patients with psoriasis is associated with a decreased need for systemic psoriasis treatment: a population-based cohort study. *The Association for the Publication of the Journal of Internal Medicine* (2013)
- Tohid, H., Aleem, D., & Jackson, C. Major Depression and Psoriasis: A Psychodermatological Phenomenon. *Skin Pharmacology and Physiology.* (2016)
- Van der Fits, L., Mourits, S., Voerman, J. S. A., Kant, M., Boon, L., Laman, J. D., ... Lubberts, E. Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice Is Mediated via the IL-23/IL-17 Axis. *The Journal of Immunology* (2009)
- Van, I. R. K. Anti-Inflammatory Effects of Antidepressants Through. *Journal of Clinical Psychopharmacology* (2001)
- Vassar R. Fuchs E. Transgenic mice provide new insights into the role of TGF- α during epidermal development and differentiation. *Genes Development.* (1991)
- Verberne, E. A., Haan, E. De, Tintelen, J. P. Van, Haelst, M. M. Van, & Lindhout, D. Fetal methotrexate syndrome: A systematic review of case reports. *Reproductive Toxicology.* (2019)
- Wang, W., Zhou, H., & Liu, L. SC. Side effects of methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: A systematic review *European Journal of Medicinal Chemistry.*(2018)
- Wasel, N., Poulin, Y., Andrew, R., Chan, D., Fraquelli, E., & Papp, K. A Canadian Self-Administered Online Survey to Evaluate the Impact of Moderate-to-Severe Psoriasis among Patients. 294 *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery.* (2009)
- Wu, H., Denna, T. H., Storkersen, J. N., & Gerriets, V. A. Beyond a neurotransmitter: The role of serotonin in inflammation and immunity. *Pharmacological Research.* (2018)
- Zoric, B., Jankovic, L., Kuzmanovic, J., Milija, J. Z., & Dragan, M. The efficacy of fluoxetine in BMS. *Gerodontology* (2018)