

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA DE CASSIA PINTO FERREIRA

ANÁLISE DA DESPIGMENTAÇÃO DA PELE CAUSADA POR
MONOBENZONA EM CAMUNDONGOS NOCAUTES PARA OS
RECEPTORES DAS CININAS

CURITIBA

2021

JULIANA DE CASSIA PINTO FERREIRA

ANÁLISE DA DESPIGMENTAÇÃO DA PELE CAUSADA POR
MONOBENZONA EM CAMUNDONGOS NOCAUTES PARA OS
RECEPTORES DAS CININAS

Dissertação desenvolvida no Departamento de Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná durante o Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa Dra Daniela de Almeida
Cabriní

Co-orientador: Prof. Dr. Michel Fleith Otuki

Curitiba

2021

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Ferreira, Juliana de Cassia Pinto.

Análise da despigmentação da pele causada por monobenzona em camundongos nocautes para os receptores das cininas. Juliana de Cassia Pinto Ferreira. – Curitiba, 2021.

1 recurso on-line : PDF.

Orientadora: Daniela de Almeida Cabrini.

Coorientador: Michel Fleith Otuki.

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

1. Cininas. 2. Melanina. 3. Pele – Doenças. 4. Pigmentação da Pele. I. Título. II. Cabrini, Daniela de Almeida. III. Otuki, Michel Fleith. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.



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 FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **JULIANA DE CASSIA PINTO FERREIRA** intitulada: **Análise da despigmentação da pele causada por monobenzona em camundongos nocautes para os receptores das cininas.**, sob orientação da Profa. Dra. DANIELA DE ALMEIDA CABRINI, 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 mestra 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, 30 de Novembro de 2021.

Assinatura Eletrônica

07/12/2021 11:26:59.0

DANIELA DE ALMEIDA CABRINI

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

13/12/2021 15:50:30.0

CAMILA GUIMARAES MOREIRA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

07/12/2021 13:02:18.0

EUNICE ANDRÉ

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531990 - Tel: (0xx41)3361-1693 - E-mail: pgfarmacologia@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 133206

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 133206

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores Prof. Dra. Daniela Cabrini e Prof. Dr. Michel Otuki, pela oportunidade e por me aceitarem em seu laboratório por todos esses anos, permitindo que eu me aperfeiçoasse profissionalmente.

Aos amigos de laboratório, Fernanda, Margareth, Fernando, Kaue, Kelly, Gabrielle, Priscila, pela amizade, por todos os momentos compartilhados e por mesmo distantes terem me socorrido ou me escutado quando precisava.

À Bruna Soley, por toda ajuda e paciência ao me ensinar as técnicas, pela companhia no momento da pandemia e nos experimentos, pelos almoços e conversas.

A Mayara Amorim, por ter sido uma amiga tão querida e importante nesses anos, por todos os momentos compartilhados, pelo companheirismo e por ter tido paciência em me ouvir reclamar quando nada dava certo.

Ao Prof. Dr. João Bosco Pesquero por disponibilizar os animais nocautes utilizados para o desenvolvimento do trabalho.

Aos servidores do Departamento e todo o pessoal do biotério, por serem sempre compreensivos comigo.

Aos meus pais Patricia e Marcelo, por tudo. Tudo o que sou devo a vocês, vocês são a minha inspiração e a minha força. Essa conquista é de vocês também!

Aos meus amigos e meu namorado, por todo apoio e paciência que tiveram nesses anos. Foram inúmeros fins de semana indo ao laboratório ou estudando

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

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana”.

Carl G. Jung

RESUMO

As alterações na pigmentação da pele podem ser o resultado de anormalidades em um determinado estágio da formação da melanina, destruição dos melanócitos ou degradação defeituosa da melanina. Estudos anteriores demonstraram que todos os constituintes do sistema das cininas são expressos constitutivamente na pele normal e patológica, sugerindo que os peptídeos cininas podem estar envolvidos em importantes funções primárias da pele e eventos patológicos. No entanto, não há estudos relatando a participação dos receptores de cininas no processo de despigmentação da pele. Neste contexto, o presente estudo foi desenhado com o objetivo de determinar o papel dos receptores das cininas no modelo do vitiligo induzido por monobenzona. Os resultados obtidos mostraram que camundongos knockout para os receptores de cininas B1 e B2, assim como os camundongos knockout para os receptores duplos de cininas, apresentaram despigmentação local da pele maior do que o tipo selvagem (WT) após aplicação tópica diária de creme de monobenzona a 40% (MBZ) por 50 dias. Da mesma forma, foi observado nível mais baixo de conteúdo de melanina na epiderme de camundongos knockout para o receptor B1 ou B2 tratados com MBZ. Digno de nota, os camundongos KOB1B2R exibiram níveis diminuídos de melanina na pele normal, e o tratamento com MBZ não alterou isso. Comparativamente, a ablação genética dos receptores de cininas B1 e B2 levou à redução da geração de EROs em animais tratados com MBZ. Novamente, os camundongos KOB1B2R apresentaram níveis mais baixos de EROs em condições fisiológicas da pele. A deficiência dos receptores de cinina B1 e B2 mostrou aumento do infiltrado de células dérmicas na pele com vitiligo. Da mesma forma, a ausência do receptor B1 foi associada ao maior acúmulo de IL-4, IL-6 e IL-17 em animais tratados com MBZ. Relevantemente, a ausência de ambos os receptores B1 e B2 foi associada a um efeito protetor, pois preveniu o aumento nos níveis de citocinas induzido pelo tratamento com MBZ.

Palavras-chave

Cininas; Receptor B1; Receptor B2; Melanina; Monobenzona; pigmentação; pele

ABSTRACT

Changes in skin pigmentation can be the result of abnormalities at a certain stage of melanin formation, destruction of melanocytes or a defective degradation of melanin. Previous studies have shown that all kinin system constituents are constitutively expressed in the normal and pathological skin, suggesting that kinin peptides may be involved in important primary function of the skin and pathological events. However, there are no studies reporting the participation of the kinin receptors in skin depigmentation process. In this context, the present study was designed in order to determine the role of kinin receptors in the monobenzone-induced vitiligo-like model. The obtained results showed that kinin B1 and B2 receptor knockout mice, as well as double kinin receptors knockout mice presented higher local skin depigmentation than wild type (WT) after daily topical application of 40% monobenzone (MBZ) cream over 50 days. Similarly, was observed lower level of melanin content in epidermis of B1 receptor or B2 receptor knockout mice treated with MBZ. Of note, KOB1B2R mice displayed decreased levels of melanin in the normal skin, and MBZ treatment did not change it. Comparably, the genetic ablation of B1 and B2-kinin receptors leads to reduced ROS generation in animals MBZ-treated. Again, the KOB1B2R mice presented lower ROS levels in physiological skin conditions. Both kinin B1 and B2 receptor deficiency showed increased dermal cell infiltrate in vitiligo skin. In the same way, lack of the B1 receptor was associated with greater accumulation of IL-4, IL-6 and IL-17 in animals treated with MBZ. Relevantly, the absence of both B1 and B2 receptors was associated with a protective effect, as it prevented the increase in cytokine levels induced by MBZ treatment.

KEYWORDS

kinins; B1 receptor; B2 receptor; Melanin; Monobenzone; pigmentation; skin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vias da síntese de melanina	12
Figura 2: Desenho esquemático demonstrando o mecanismo da Melanogênese.....	14
Figura 3: Tipos de vitiligo.....	18
Figura 4: Repigmentação da pele.	22
Figura 5: Representação da via de formação das cininas BK e LBK e seus metabólitos ativos, des-Arg9-BK e des-Arg9-LBK, assim como, o mecanismo de ativação dos receptores cininérgicos (B1 e B2).	25
Figura 6: Delineamento experimental do modelo animal de vitiligo induzido por múltiplas aplicações de MBZ.....	32
Figura 7: Fotos representativas das lesões de vitiligo induzidas pela MBZ.	37
Figura 8: Índice de pontuação de vitiligo induzido por MBZ em camundongos nocautes para receptores de cininas.....	38
Figura 9: Efeitos da porcentagem de despigmentação da pele após o tratamento com MBZ.....	39
Figura 10: Efeitos dos níveis de melanina em animais nocaute para os receptores de cininas	40
Figura 11: Fotos representativas da coloração Fontana-Masson.....	42
Figura 12: Efeitos dos níveis de melanina em animais nocaute para os receptores de cininas na coloração de Fontana Masson	43
Figura 13: Efeitos da produção de espécies reativas de oxigênio em animais nocaute para os receptores de cininas.....	44
Figura 14: Fotos representativas da coloração H&E da pele de animais tratados múltiplas vezes com MBZ.....	45
Figura 15: Efeito da deleção dos receptores de cininas no infiltrado celular nas lesões cutâneas de vitiligo induzidas por MBZ.....	45
Figura 16: Efeitos dos níveis de citocinas em animais submetidos ao modelo de vitiligo induzido por MBZ.	48

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. A PELE	9
1.2. MELANOGÊNESE	11
1.3. VITILIGO	15
1.3.1. CLASSIFICAÇÃO	16
1.3.2. ETIOPATOGENIA	18
1.3.3. TRATAMENTO	20
1.4. CININAS	23
2. JUSTIFICATIVA	28
3. OBJETIVOS	29
3.1. OBJETIVO PRINCIPAL	29
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS	30
4.2. MODELO ANIMAL DE VITILIGO INDUZIDO PELA APLICAÇÃO REPETIDA DE MBZ	31
4.3. DETERMINAÇÃO DO ESCORE E DISSEMINAÇÃO DE VITILIGO	32
4.4. DETERMINAÇÃO DA DESPIGMENTAÇÃO	33
4.5. DETERMINAÇÃO DE EROs EM TECIDOS	32
4.6. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS EPIDERMIS DE MELANINA	33
4.7. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS	33
4.8. ANÁLISE HISTOLÓGICA PELA COLORAÇÃO HEMATOXILINA E EOSINA	34
4.9. ANÁLISE HISTOLÓGICA PELA COLORAÇÃO DE FONTANA-MASSON	34
4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
5. RESULTADOS	35
5.1. AUSÊNCIA DOS RECEPTORES DE CININAS NO SCORE DE DESPIGMENTAÇÃO DA PELE	35
5.2. NÍVEIS DE MELANINA EM ANIMAIS NOCAUTES	38
5.3. COLORAÇÃO FONTANA MASSON NA PELE TRATADA COM MBZ	40

5.4. PRODUÇÃO DE EROs NA PELE DE ANIMAIS NOCAUTES	43
5.5. AVALIAÇÃO DO INFILTRADO CELULAR NA PELE TRATADA COM MBZ .	44
5.6. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NA PELE DE ANIMAIS NOCAUTES.....	46
6. DISCUSSÃO.....	49
7. CONCLUSÃO	57
8. REFERÊNCIAS	57

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Pele

A pele é a primeira barreira em contato com o meio externo, tendo dessa forma, uma importante função de manutenção e defesa do organismo, protegendo-o contra lesões, infecções e perda de água. Para isso, ela conta com diversas estruturas e tecidos que se inter-relacionam, de maneira harmônica, para desempenhar suas funções (Alberts et al., 2010; Bouwstra, 2006).

A pele é composta por duas camadas morfológicamente distintas: a epiderme, a camada superior e mais externa, e a derme, a camada inferior e mais espessa. A derme é formada por tecido conectivo que varia de 0,5 a 5 mm de espessura, dependendo da região do corpo. O tipo celular predominante são os fibroblastos, que produzem as fibras de colágeno e de elastina, responsáveis por conferir resistência e elasticidade ao tecido, respectivamente, evitando rompimentos. Também conta com a presença de mastócitos (responsáveis pela secreção de quimiotransmissores) e células do sistema imune (linfócitos e macrófagos). Além disso, há também a presença de vasos sanguíneos, canais linfáticos, nervos sensoriais e glândulas sudoríparas (Alberts et al, 2017; Lai-Cheong e McGrath, 2017). A derme é composta por duas camadas: papilar, fina e solta, e reticular, espessa e densa. A derme papilar se localiza logo abaixo da membrana basal, composta por tecido conjuntivo frouxo e colágeno, fibras elásticas e vasos sanguíneos. Já a derme reticular, logo abaixo, é composta por tecido conjuntivo denso e um conjunto mais denso de colágeno, vasos sanguíneos, terminações nervosas e vasos linfáticos (Losquadro, 2017).

A epiderme funciona como uma barreira impermeável contra o meio externo, que se autorrepara e se renova continuamente. É constituída por um epitélio estratificado e seu principal tipo celular são os queratinócitos, responsáveis por sintetizar queratina, que fornece à epiderme sua capacidade impermeabilizante (Alberts, 2017; Luxenburg e Zaidel-Bar, 2019). Contém quatro camadas principais: camada (ou estrato) basal, estrato espinhoso, estrato granuloso e estrato córneo. A camada basal, mais interna, consiste em

uma camada contínua de queratinócitos indiferenciados de formato cuboide que se aderem à lâmina basal e iniciam sua proliferação. Acima dessa camada, tem-se o estrato espinhoso, em que os queratinócitos começam a se diferenciar e os filamentos de queratina são produzidos (Luxenburg e Zaidel-Bar, 2019; Bouwstra e Ponec, 2006). É chamada assim devido aos numerosos desmossomos, que ao microscópio são visualizados como espinhos próximos às células (Alberts et al., 2017).

A próxima camada, o estrato granuloso, é assim chamada devido aos grânulos de queratohialina. Há a formação da filagrina, proteína responsável pela manutenção da integridade da barreira cutânea, dentro desses grânulos e também a agregação dos filamentos de queratina por meio dessa proteína (Losquadro, 2017). Já na camada mais externa da epiderme, o chamado estrato córneo, os queratinócitos se transformam em células mortas achatadas, sem núcleo ou organelas citoplasmáticas — os corneócitos, densamente envolvidas por queratina (Luxenburg e Zaidel-Bar, 2019). A progressão da diferenciação celular das camadas mais inferiores para as superiores e, conseqüentemente, sua renovação celular leva cerca de 30 dias (Blanpain, Horsley e Fuchs, 2007; Bouwstra e Ponec, 2006).

Além dos queratinócitos, há a presença das células de Langerhans, responsáveis por apresentar antígenos e estimular a resposta de células T, células de Merkel, responsáveis pelo sensorimento, e os melanócitos, responsáveis pela pigmentação (Losquadro, 2017).

Separando a epiderme da derme, tem-se um tipo especializado de matriz extracelular — a lâmina basal (ou membrana basal), que atua como um suporte de todo o epitélio. É uma camada extremamente fina, de 40 a 120 nm, composta principalmente de laminina e colágeno que, além de separar os tecidos epiteliais, os mantêm ligados um ao outro. Também influencia o metabolismo celular, promove a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular e serve de via para a migração celular, auxiliando na regeneração tecidual (Alberts et al., 2017).

1.2 Melanogênese

Os melanócitos são células dendríticas originárias da crista neural, presentes na lâmina basal da epiderme que apresentam estruturas complexas e com capacidade oxidativa, responsáveis por fornecer pigmentação aos queratinócitos vizinhos, através da síntese de melanina em seus melanossomos (Alberts et al., 2017; Li, Knapp e Iden, 2020). Nos mamíferos, eles residem nos folículos pilosos, derme e epiderme basal (D'Orazio et al., 2013).

Cada melanócito produz melanina para aproximadamente 30 queratinócitos periféricos, transportando-a até eles dentro dos melanossomos com o auxílio das extensões dendríticas (Lai-Cheong e McGrath, 2017). Os melanossomos são organelas intracelulares que sintetizam e armazenam a melanina e liberam o pigmento por exocitose no espaço extracelular da epiderme. Esse pigmento é então capturado pelos queratinócitos, que fagocitam algumas porções de dendritos carregados de melanina, onde exercerá sua função protetora (Raposo e Marks, 2007).

A melanina está presente no organismo sob duas formas químicas: a eumelanina, um pigmento marrom ou preto que está presente em abundância na pele de indivíduos altamente pigmentados, e a feomelanina, que é amarela ou vermelha, devido à incorporação de cisteína em sua composição (Rees 2003). Diferenças na coloração de pele/cabelos entre as pessoas resultam das variações de quantidade, distribuição e tipo de melanina, enquanto o número de melanócitos permanece praticamente o mesmo (Lin e Fisher, 2007).

A melanina tem como função proteger o corpo da radiação ultravioleta (UV), eliminando radicais livres reativos e oxidantes, o que além de ter um papel protetor contra o câncer de pele, também previne contra o fotoenvelhecimento (Shoenfeld, Amital e Shoenfeld, 2009). Ela também afeta a síntese de 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25[OH]₂D₃) - a forma ativa da vitamina D-, uma vez que essa é dependente da luz ultravioleta B (UVB), por isso que peles com um número maior de melanina apresentam uma deficiência na síntese de 1,25(OH)₂D₃ induzida por UV (Hameed e Akhtar, 2019; Shoenfeld, Amital e Shoenfeld, 2009).

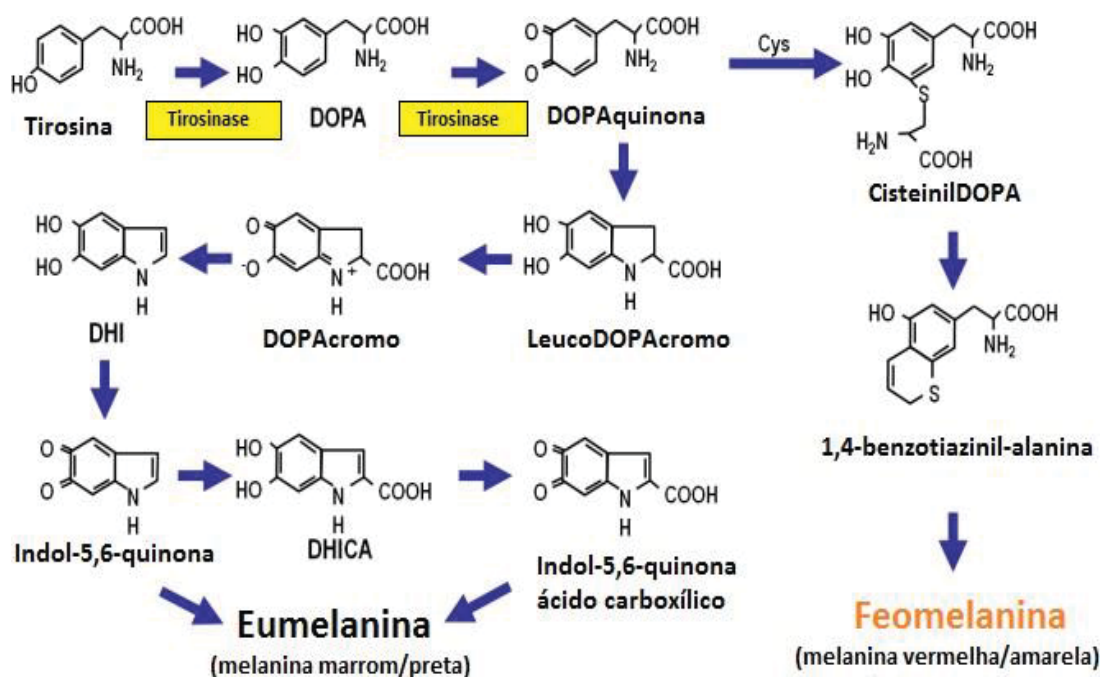


Figura 1: Vias da síntese de melanina.

Fonte: Adaptado de D'orazio et al. (2013)

Na epiderme, a síntese e a distribuição da melanina requerem vários estágios: transcrição de proteínas melanogênicas, biogênese de melanossomo, arranjo das proteínas melanogênicas dentro dos melanossomos, deslocamento dos melanossomos para os dendritos de melanócitos e, por fim, transferência para os queratinócitos (Park et al., 2009). Essas etapas e o comportamento do melanócito são influenciados negativa e positivamente pelos queratinócitos vizinhos e por fibroblastos, através de sinalização celular, bem como por fatores externos, como a radiação UV (Wang et al., 2017). A oxidação da tirosina em L-Dopa e L-Dopa em dopaquinona pela enzima tirosinase dá início à síntese pela chamada via Raper-Mason (FIGURA 1). Essa conversão da tirosina em L-DOPA é considerada a etapa mais importante e limitante da biossíntese de melanina, pois a inibição desta reação invalida a síntese de melanina (Park et al., 2009). A dopaquinona se transforma espontaneamente através do intermediário leucodopacromo em dopacromo, que gera 5,6-

dihidroxiindol (DHI) e ácido 5,6-di-hidroxiindol-2-carboxílico (DHICA). Ambos sofrem oxidação e geram indolequinonas correspondentes, 5,6- indolequinona (IQ) e (ácido indol-5,6-quinona carboxílico (IQCA) e essas formas reagem formando o pigmento eumelanina (Pillaiyar et al., 2017; Serre et al., 2018).

A tirosinase é uma glicoproteína localizada na membrana do melanossomo, dependente de cobre. É uma metaloenzima produzida exclusivamente apenas por células melanocíticas, cujo sítio ativo é altamente conservado com dois íons de cobre complexados com seis resíduos de histidina. Após sua biossíntese e consequente processamento no retículo endoplasmático e no Golgi, é transferida para os melanossomos, onde a melanina é produzida (Pillaiyar et al., 2017). Além disso, duas proteínas formam um complexo com a enzima tirosinase, proteína 1 relacionada à tirosinase (TRP-1) e proteína 2 relacionada à tirosinase (TRP-2). Ambas residem no melanossoma e, embora suas funções não estejam bem esclarecidas, sabe-se que a TRP-1 exerce um papel na ativação e/ou estabilização da enzima, além de aumentar a razão eumelanina: feomelanina, e que a TRP-2 participa das últimas etapas da biossíntese de melanina. A formação desse complexo ocorre após a PKC- β ser ativada pelo diacilglicerol (DAG). A PKC- β então se liga ao receptor para C-quinase-I ativada (RACK-I) e se transloca para a membrana melanossomal para fosforilar a tirosinase. Essa fosforilação leva à formação do complexo com a TRP-1, o que estabiliza e aumenta a atividade da enzima (PARK et al., 2009; D'Mello et al., 2016).

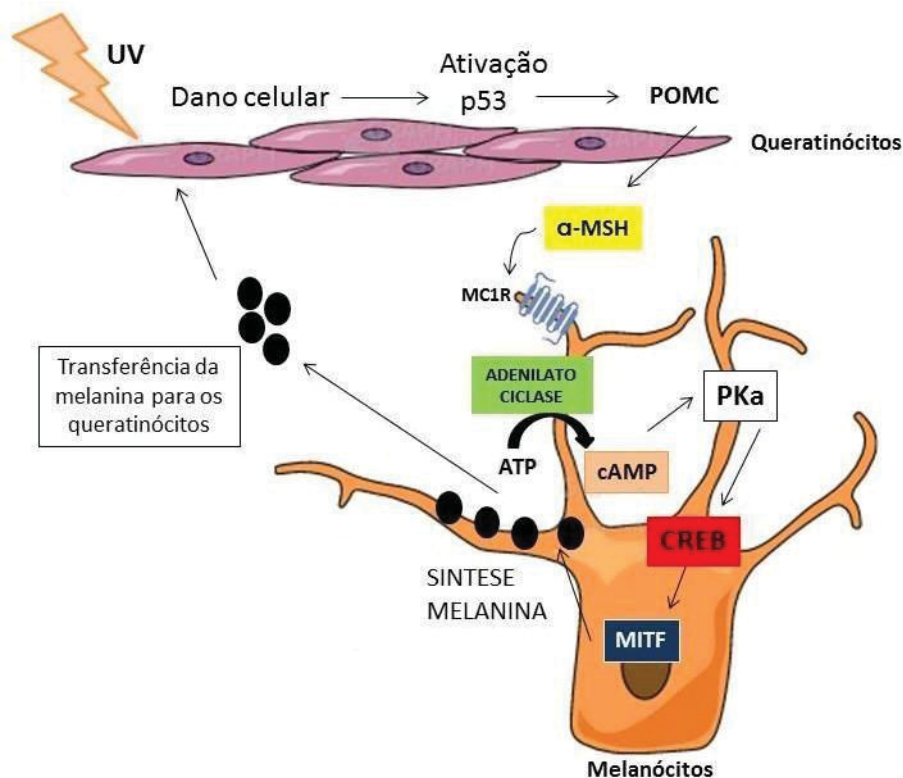


Figura 2: Desenho esquemático demonstrando o mecanismo da Melanogênese.

Fonte: O Autor

Outra via que estimula a síntese da melanina é iniciada por várias etapas de sinalização, cujo principal fator é a sinalização do receptor de melanocortina-1 (MC1R) pelos peptídeos hormônio alfa estimulador de melanócito (α-MSH) e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), o que resulta em um aumento da produção de eumelanina (Park et al., 2009; D'Mello et al., 2016). Após o queratinócito ser exposto à radiação UV e sofrer um dano, há a ativação de p53 que regula a transcrição da proteína pró-opiomelanocortina (POMC) e sua respectiva clivagem em α-MSH. α-MSH se liga ao MC1R na superfície celular do melanócito e ativa a adenilato ciclase, o que aumenta a concentração de cAMP intracelular, a partir do ATP e aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} , e ativa a proteína quinase A (PKa), resultando na fosforilação de CREB e estimulação do fator de transcrição associado à microftalmia (MITF) (D'Mello et al., 2016; D'Orazio et al., 2013). Já o MITF está envolvido na diferenciação, dendricidade, proliferação e apoptose dos melanócitos, regulando a melanogênese ao regular a expressão de

tirosinase, TRP-1, TRP-2 e PKC- β , além de outras proteínas-chave envolvidas na melanogênese (Wang et al., 2017) (FIGURA 2). A melanogênese é regulada negativamente por ERK, que quando ativado, desencadeia a expressão de MITF levando à sua degradação (Pillaiyar et al., 2017).

Já a via bioquímica que se sucede na formação da feomelanina está relacionada com a presença de compostos sulfidrilas como a L-cisteína, que reage com dopaquinona formando a cisteinil dopa (D'Mello et al., 2016). Sua posterior oxidação leva à formação de feomelanina por meio de intermediários de benzotiazina (Serre et al., 2018). Mutações na tirosinase, danos no transporte de organelas em melanócitos e mutações nos genes responsáveis pela adesão celular têm sido associados a distúrbios de hipopigmentação, como por exemplo, albinismo e vitiligo (Li, Knapp e Iden, 2020).

1.3 Vitiligo

Vitiligo é uma doença de pele crônica adquirida, em que há despigmentação progressiva da pele, ocasionada pela perda dos melanócitos presentes nas áreas afetadas, além de sensibilidade ao UV aumentada nas áreas despigmentadas. Essa enfermidade atinge entre 1% e 2% da população mundial, tendo uma prevalência maior em determinados países como Índia (8,8%), México (2,6 — 4%) e Japão (1,68%), sem distinção de gênero, apesar das mulheres apresentarem uma maior busca por tratamento (Ezzedine et al., 2015; Krüger e Schallreuter, 2012; Taïeb e Picardo, 2009).

Acredita-se que o nome da doença venha do latim *vitium*, que significa defeito ou mancha, uma vez que as lesões clássicas são caracterizadas como manchas brancas não escamosas e com margens bem definidas que tendem a aumentar de tamanho e forma com o passar do tempo, além de se desenvolverem em sua maioria antes dos 20 anos, sendo que 25% das crianças manifestam a doença antes dos 10 anos de idade (Koranne and Sachdeva, 1988; Amer et al., 2015).

Um aspecto importante da doença que não pode ser ignorado é o psicossocial. Pelo fato de as lesões comumente surgirem em locais visíveis, como face e mãos, afeta a qualidade de vida do paciente, reduzindo sua autoestima pelo estigma social que a doença traz. Em muitas culturas, em que a hanseníase é endêmica, o vitiligo é considerado uma —lepra branca ou sexualmente transmissível, afetando principalmente a vida de mulheres, dificultando sua vida pessoal e profissional. Pacientes com vitiligo podem apresentar uma variedade de problemas psicológicos como depressão, ansiedade, transtornos de ajustamento, irritabilidade, interferência na socialização (afetando até as relações sexuais), pensamentos suicidas, entre outros, sendo necessário em muitos casos intervenções psicossociais, como antidepressivos (Rodrigues et al., 2017; Alikhan et al., 2011; Amer et al., 2015).

Estudos demonstraram que o vitiligo infantil está associado a um prejuízo na qualidade de vida nos pacientes quando maiores, principalmente quando há comprometimento de áreas visualmente expostas e genitais, estando associado a bullying e provocações (Ezzedine e Silverberg, 2016). Marinho e colaboradores (2013) descreveram que 60% das crianças brasileiras avaliadas no estudo relataram problemas psicológicos (Marinho et al., 2013). Além do cuidado com os pacientes, os pais e cuidadores de crianças afetadas também necessitam de um acompanhamento psicológico, uma vez que sua ansiedade em relação à progressão da doença pode afetar o bem-estar da criança. Um estudo realizado por Amer e colaboradores (2015) demonstrou que os familiares de crianças com vitiligo, principalmente as mães, apresentam um maior grau de sintomas psicológicos e emoções negativas (Amer et al., 2015). Já Manzoni e colaboradores (2013) relataram depressão e ansiedade em 26% e 42% dos responsáveis, respectivamente (Manzoni et al., 2013).

1.3.1 Classificação

Apesar de apresentar um curso clínico imprevisível (Speeckaert et al., 2017), a doença pode ser classificada de acordo com suas manifestações clínicas em: vitiligo não segmentar, vitiligo segmentar e formas indeterminadas.

- Vitiligo não segmentar: representa 85 a 90% dos casos gerais. Tem como características: manchas simétricas e bilaterais com bordas bem definidas, início mais tardio e progressivo (entre os 10 e 30 anos), manifestam-se em locais com propensão a traumas, geralmente está associado a um histórico de autoimunidade (Taïeb e Picardo, 2009). É subclassificado em:
 - Acrofacial: pode afetar face, cabeça, mãos e pés, envolvendo extremidades dos dedos e região perioral (Faria et al., 2014).
 - Mucosa: Envolve mucosas orais ou genitais. Pode ocorrer junto com outros tipos, porém se somente essa área for atingida é classificado como indeterminado (Ezzedine et al., 2012).
 - Generalizado: lesões simétricas, que afetam qualquer parte do tegumento, principalmente mãos e áreas expostas a traumas (Faria et al., 2014).
 - Universal: quando há despigmentação completa ou quase completa da pele, podendo ou não incluir pelos (Ezzedine et al., 2012).
 - Mista: Quando há vitiligo segmentar e não segmentar simultaneamente. Geralmente, a forma segmentar antecede a não segmentar (Faria et al., 2014).
- Vitiligo segmentar: apresenta um início precoce, sendo a forma mais comum na infância. Além disso, geralmente ocorre na face e no cabelo, e diferentemente do vitiligo não segmentar, não apresenta associação com doenças autoimunes. É caracterizado por bordas mais irregulares e despigmentação unilateral, todavia há casos de despigmentação de dois ou mais segmentos com distribuição ipsilateral ou contralateral (Taïeb e Picardo, 2009; Nicolaidou et al., 2019).
- Formas indeterminadas:
 - Focal: pequena mancha isolada que não se encaixa na classificação de segmentar e que em um período de 2 anos não evoluiu (Rodrigues et al., 2017).
 - Mucosa: Apenas a área de mucosa é afetada (Farias et al., 2014).



Figura 3: Tipos de vitiligo: (esq.) vitiligo não segmentar e vitiligo segmentar (dir.) (Farias et al., 2014)

1.3.2 Etiologia

A etiologia do vitiligo ainda não foi completamente elucidada, porém há certamente um forte componente genético envolvido, uma vez que há ocorrência familiar positiva em 20% dos pacientes, além de uma natureza poligênica, já que está associada a loci genéticos em diferentes cromossomos, (van den Wijngaard et al., 2001). Entretanto, ao se analisar a taxa de concordância entre gêmeos para confirmar o fator genético, foi encontrado uma taxa de 23%, indicando que, apesar de o fator genético ser importante, outros fatores estão envolvidos na patologia (Alkhateeb et al., 2003).

As teorias sugerem que o vitiligo é uma doença multifatorial que envolve fatores genéticos e ambientais, além disso, diferentes causas podem ser aplicadas para diferentes casos, resultando num mesmo resultado clínico (Ezzedine et al., 2015). Dentre as principais teorias a respeito da causa da morte dos melanócitos nas áreas lesionadas, que não são mutuamente exclusivas, temos:

- 1) Autoimune: O maior fator desencadeante para a patologia é a autoimunidade, baseada na associação clínica de vitiligo com outras doenças

autoimunes, tanto presentes no paciente como em familiares, como tireoidite, diabetes mellitus tipo 1, doença de Addison, lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide e alopecia areata (Hadi et al., 2020) e na produção de autoanticorpos seguida da destruição dos melanócitos, que é a causa da despigmentação. Entre algumas evidências que estabelecem essa como a principal causa, tem-se: presença da imunidade celular e humoral; altos níveis de autoanticorpos circulantes IgG, principalmente anticorpos anti-tirosinase e anticorpos anti-TRP-1 e anti-TRP-2 (Kemp et al, 1998; Kemp et al., 1997; Rezaei et al., 2007); alta frequência de linfócitos T CD8+ específicos paramelanócitos que matam os melanócitos de forma eficiente (Ogg et al., 1998; Palermo et al., 2001; van den Boorn et al., 2009); infiltrado inflamatório com células T CD4+ e CD8+ é encontrado na periferia das lesões ativas (Kostovic e Pasic, 2012; Strassner et al., 2017); concentração sérica de IL-27 reduzida em pacientes com vitiligo (IL-27 inibe a geração de Th17, que contribui na patologia com a produção de IL-17) (Hosseini et al., 2020); elevados níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-2, IL-6, IL-17, IL-22, TNF- α , IL1- α e IFN- γ (Singhet al., 2016; Singh, Singh e Pandey, 2012; Sushama et al., 2018).

2) Oxidativa: Outro fator importante para desencadear ou piorar as lesões é a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Pacientes com vitiligo demonstram um equilíbrio redox desregulado na pele, o que resulta em uma produção excessiva de EROs, além de serem um subproduto da biossíntese da melanina. Esse acúmulo de EROs é citotóxico para a célula, o que pode contribuir para a destruição dos melanócitos (Khan et al., 2009; Tarlé e Mira, 2014). Outro resultado encontrado foi que os níveis de catalase, um dos responsáveis por metabolizar EROs estão reduzidos em toda a epiderme de pacientes com vitiligo (Schallreuter, Wood e Berger, 1991).

3) Já a hipótese neural diz que os níveis de metabólitos de catecolaminas estão aumentados nas terminações nervosas autônomas do microambiente dos melanócitos em áreas afetadas pela doença, que podem levar à vasoconstrição, hipóxia e superprodução de EROs que destroem os

melanócitos, prejudicando a síntese de melanina (Morrone et al., 1992; Mohammed, Gomaa e Al-Dhubaibi, 2015).

Alguns autores acreditam ainda que existam outras teorias que possam explicar a origem da patologia. Dentre elas, temos a teoria do defeito de adesão, em que alguns autores observaram que a proteína tenascina, que interfere na adesão de melanócitos, é super expressa na pele lesional dos pacientes se comparado a pele não lesional dos mesmos pacientes, havendo descolamento de melanócitos após fricção mecânica da pele não lesionada em pacientes com vitiligo generalizado (Le Poole et al., 1997; Gauthier et al., 2003).

1.3.3 Tratamento

O objetivo dos tratamentos é inibir a progressão da doença e estimular a repigmentação. As opções terapêuticas são limitadas, não existindo um tratamento específico, refletindo o pouco conhecimento que ainda se tem da doença (Harris et al., 2015). Apresentam eficácia, mas muitas vezes falham em atingir a completa repigmentação (Speeckaert et al., 2018). O tratamento tópico combinado com a fototerapia é uma opção quando ocorre falha terapêutica ou quando há o acometimento de até 10% da superfície corporal (Dellatorre et al., 2020).

Os corticóides tópicos são o tratamento de primeira linha para a patologia, devido ao seu baixo custo e fácil aplicação. Contudo é limitado pelo risco de efeitos colaterais locais e sistêmicos, como a atrofia cutânea. Para minimizar o risco é utilizado para pequenas áreas como face, cotovelos e joelhos por um período determinado, e após oito semanas de uso, é recomendado que seja feita terapia rotacional com outra forma terapêutica tópica. Caso tenha passado 3 meses sem nenhuma repigmentação, o tratamento é descontinuado. O mecanismo de ação no vitiligo ainda não foi esclarecido, mas sabe-se que reduz o infiltrado de linfócitos T CD4+ e CD8+ (Farias et al., 2014; Dellatorre et al., 2020).

Os inibidores da calcineurina, como tacrolimus e pimecrolimus, são imunossupressores tópicos, que apresentam um mecanismo de ação diferente dos corticóides. Tacrolimus e pimecrolimus, ao inibirem a calcineurina (uma proteína fosfatase dependente de cálcio e calmodulina que atua como um fator de transcrição de citocinas inflamatórias), inibem a ativação e maturação das células T, através da inibição da transcrição de genes de ativação de IL-2, importantes para o crescimento e proliferação de células T citotóxicas, além de inibir a transcrição de IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ e TNF- α . A vantagem é que não há atrofia cutânea, que pode ser observada com os corticóides pela inibição da síntese de colágeno, podendo ser usado a longo prazo. Os efeitos colaterais locais encontrados são coceira, ardor e irritação, que reduzem com o passar do tempo (Kostovic e Pasic, 2012; Dellatorre et al., 2020; Karagaiah et al., 2020).

A fototerapia com radiação ultravioleta B banda estreita (UVB-NB - 311 nm) e a fotoquimioterapia com psoraleno tópico ou oral associado à radiação UVA (PUVA) são indicadas para todos os tipos de vitiligo. Contudo, estudos têm demonstrado uma maior eficácia e segurança com o uso de UVB-NB, considerando-o uma opção de primeira linha, já que não tem os efeitos colaterais do psoraleno (fototoxicidade ocular e cutânea, além de ser mais cancerígeno), além de ser preferível no vitiligo generalizado (Farias et al., 2014; Esmat et al., 2017). Yones e colaboradores (2007) mostraram que 64% dos pacientes do grupo submetido ao UVB-NB alcançaram mais de 50% de repigmentação, em comparação com 36% do grupo submetido a PUVA oral (Yones et al., 2007).

O efeito imunossupressor do UVB-NB reduz a autodestruição dos melanócitos, induzindo a apoptose de células T, a regulação negativa de citocinas inflamatórias, além de regular a tirosinase positivamente, aumentando com isso a biossíntese de melanina. A repigmentação é obtida quando os melanócitos presentes nos folículos capilares se proliferam e migram da bainha externa da raiz até a epiderme (Figura 4) (Hegazy et al., 2014; Zubair e Hamzavi, 2020).

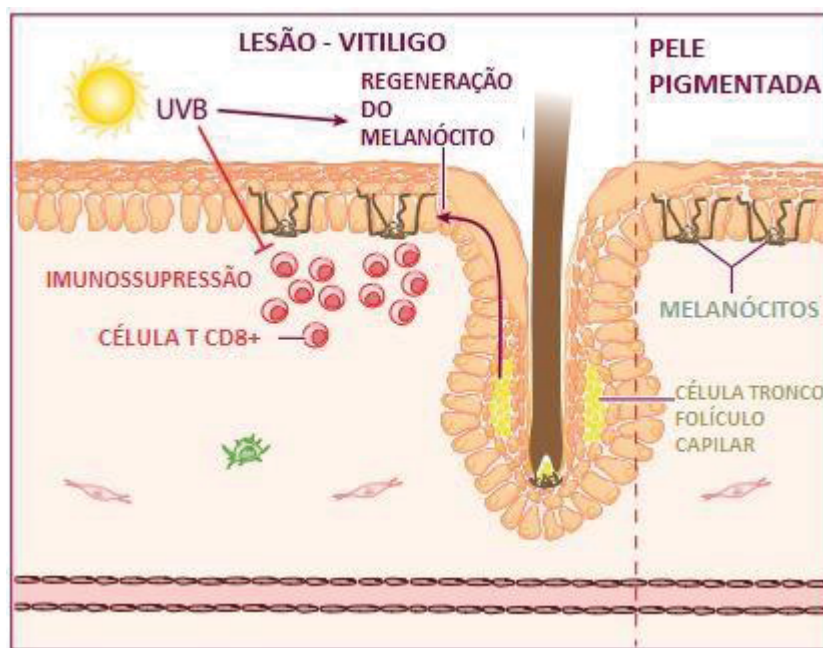


Figura 4: Repigmentação da pele.

Fonte: Adaptado de Frisoli, Essien e Harris (2020).

Já a corticoterapia sistêmica é utilizada quando o paciente apresenta lesões que se disseminam rapidamente, tendo como objetivo estabilizar a doença. Geralmente ele é administrado em minipulsos orais de dexametasona ou betametasona em doses supra farmacológicas para reduzir os efeitos colaterais (Dellatorre et al., 2020). A associação de corticóides sistêmicos juntamente com a fototerapia é uma estratégia comum de tratamento para pacientes com lesões ativas, devido a sua capacidade de interromper a progressão da doença, combinado a capacidade de repigmentação da fototerapia (Rodrigues et al., 2017).

Uma outra opção são as intervenções cirúrgicas, que visam repigmentar a pele através dos melanócitos armazenados nos folículos capilares. Os procedimentos são enxertos de tecido ou celular, através da —colheita— de tecidos viáveis do local com pigmentação normal e transferir o tecido ou a célula para a área receptora lesionada (Karagaiah et al., 2020).

Quando há ocorrência de lesões em mais de 75% da superfície corporal, o tratamento de escolha é a despigmentação corporal uniforme. O éter

monobenzílico de hidroquinona (conhecido como monobenzona - MBZ) é o único agente aprovado e é comumente usado na clínica no tratamento de melasma e vitiligo, atuando induzindo o estresse celular oxidativo e a degradação lisossomal dos melanossomas (Karagaiah et al., 2020).

O modelo de vitiligo induzido por múltiplas aplicações de monobenzona foi o modelo estudado nesse trabalho. A MBZ quando administrado via oral causa hipomelanose nos pelos dos animais (Denton et al., 1952). Hartmann e colaboradores (2008) demonstraram que análises histológicas de pele de tratados com monobenzona apresentaram infiltrado de células TCD8⁺ semelhantes às observadas em pacientes com vitiligo. Isso também foi confirmado por van den Boorn et al (2011), que demonstrou que a exposição de monobenzona em células de melanoma induziu a ativação de células TCD8⁺ após 7 dias de incubação in vitro (van den Boorn et al., 2011). Além disso, Zhu e colaboradores (2013) mostraram a perda de melanócitos epidermais juntamente com acúmulo de células TCD8⁺ quando aplicado monobenzona 40% em camundongos (Zhu et al, 2013), o que torna a despigmentação causada pela MBZ irreversível.

1.4 Cininas

As cininas são um grupo de peptídeos vasoativos de 9-10 aminoácidos incluindo a bradicinina (BK), a calidininina (LBK) e seus metabólitos ativos, des-Arg⁹-BK e des-Arg⁹-LBK (Regoli e Barabe, 1980), pertencentes ao sistema calicreína-cininas, que medeiam respostas fisiológicas e patológicas. Dentre as atividades envolvidas nesse sistema está o controle da pressão arterial, vasodilatação, contração e relaxamento do músculo liso, infecções, dor e resposta inflamatória (Calixto et al., 2000; Dutra, 2017; Talbot et al., 2017). Além disso, auxiliam na proliferação celular e angiogênese, potencializando a migração e o crescimento celular e estimulando a síntese e liberação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Plendl et al., 2000; Bader, 2009; Matus et al., 2020).

A BK foi descrita pela primeira vez em 1949 por Rocha e Silva, após a incubação do plasma contendo veneno da serpente *Bothrops jararaca*. Os pesquisadores observaram que uma nova substância presente ou liberada no plasma canino após injeção do veneno causava um efeito estimulante *in vivo*.

Para essa nova substância, deram o nome de BK (do grego —kininll, que significa movimento; e —brady', indicando lento), devido à contração lenta observada no intestino da cobaia (Rocha e Silva et al., 1949; Hall, 1992). Posteriormente, em 1954, Schachter e Thain denominaram de —cininasll a BK, a LBK e outras substâncias afins (Schachter e Thain, 1954).

Cininas exercem seus efeitos biológicos ao interagirem com duas classes de receptores transmembrana acoplados à proteína G (GPCRs - —G protein-coupled receptorsll, em inglês), conhecidas como receptor tipo 1 de BK (B₁) e receptor tipo 2 de BK (B₂) (Campos, 2006; Wong, 2016; Marceau et al., 2002). O receptor B₂ é expresso constitutivamente, sendo distribuído em diversos tecidos, mediando a maioria dos efeitos fisiológicos das cininas, de maneira predominante, e apresenta maior afinidade pelas cininas BK e LBK. Já o receptor B₁ tem sua expressão rapidamente induzida por tecidos inflamatórios, como áreas de ferida e lesões vasculares, sendo expressos geralmente em baixas concentrações em condições fisiológicas. Apresenta alta afinidade para os metabólitos des-Arg⁹- BK e des-Arg⁹-LBK (Wong, 2016; Calixto, 2004).

As cininas são formadas a partir da clivagem proteolítica do seu precursor, o cininogênio. O cininogênio é uma glicoproteína plasmática formada em sua maioria no fígado (Fonseca e Dellalibera-Joviliano, 2020). Existem dois tipos de cininogênios no plasma de mamíferos, formados a partir do “splicing” de um único gene: cininogênio de alto peso molecular (HMWK- do inglês, “high- molecular-weight kininogen”) e cininogênio de baixo peso molecular (LMWK-do inglês, “low-molecular-weight kininogen”) (Wong, 2016). A clivagem do cininogênio é feita por proteases denominadas calicreínas, que em humanos são apresentadas em dois grupos. A calicreína tecidual forma a LBK, a partir da hidrólise das ligações Met-Lys e Arg-Ser do cininogênio de baixo peso molecular, já a calicreína plasmática forma a BK, a partir do cininogênio de alto peso molecular (Fonseca e Dellalibera-Joviliano, 2020; Bhoola et al., 1920).

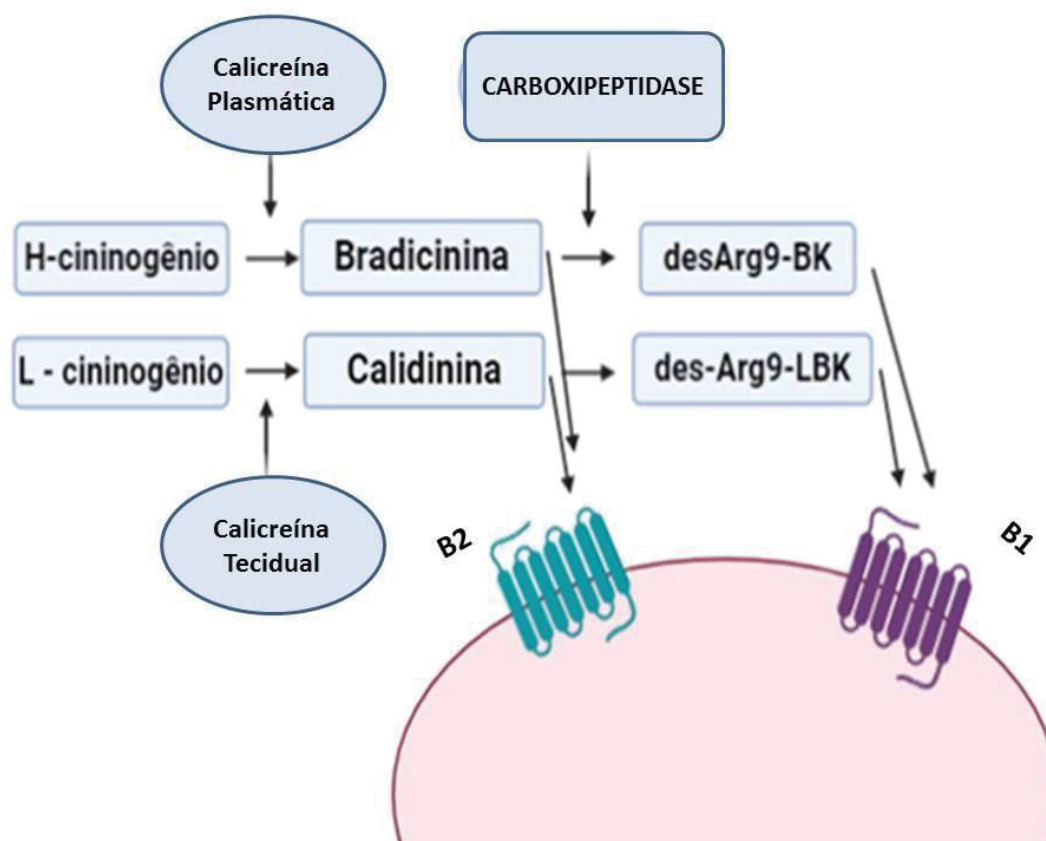


Figura 5: Representação da via de formação das cininas BK e LBK e seus metabólitos ativos, des-Arg⁹-BK e des-Arg⁹-LBK, assim como, o mecanismo de ativação dos receptores cininérgicos (B1 e B2).

Fonte: O autor (2021)

Após sua liberação, as cininas possuem uma meia vida curta (15 a 30 segundos no plasma), por serem degradadas por peptidases conhecidas como cininases, que convertem a BK e a LBK, em seus metabólitos, des-Arg⁹-BK e des-Arg⁹-LBK, respectivamente. Existem 4 cininases responsáveis pela metabolização das cininas: endopeptidase neutra (NEP), carboxipeptidase N (CPN) e carboxipeptidase M (CPM) e a enzima conversora de angiotensina (ECA, cininase II). A ECA é a enzima responsável pela conversão da angiotensina I em angiotensina II no sistema renina angiotensina e também participa da via de inativação de cininas (Bhoola et al., 1992; Kashuba et al., 2013).

Segundo Marceau e Bachvarov (1998), os dois receptores B1 e B2 estão envolvidos com as alterações que ocorrem em distúrbios inflamatórios agudos e crônicos, segundo vários modelos de inflamação, sendo as cininas geradas rapidamente após a lesão do tecido. Após serem ativados pelas cininas, os receptores podem iniciar sinalizar várias vias de transdução, principalmente através da ativação de fosfolipase C (PLC), resultando na formação de inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). A formação desses segundo mensageiros, aumenta a mobilização de cálcio intracelular e ativação da proteína quinase C (PKC), que está envolvida em vários eventos celulares (Golias et al., 2007; Maurer et al., 2011). A BK, via receptor B2, estimula a liberação de ácido araquidônico com posterior liberação de prostaglandinas E₂ (PGE₂) e I₂, o que resulta na formação de cAMP. Da mesma forma, pode ocorrer a ativação do fator nuclear kB (NF-kB), assim como a expressão do gene IL-1b em cultivo de células epiteliais humanas (Pan et al., 1998).

Além disso, a ativação do B2R ocorre no início do processo inflamatório, sendo dessensibilizado após mecanismos autorreguladores, aumentando a expressão do receptor B1 (B1R) em seguida, o que sugere um equilíbrio entre as duas populações de receptores, durante processos inflamatórios. Pelo fato do B1R não sofrer internalização ou dessensibilização como o B2R, e recrutar a mesma via de sinalização por ser expresso nos mesmos tipos celulares, é considerado que apresenta a função de amplificar a resposta de efeito tecidual (Calixto et al., 2000; Maurer et al., 2011).

Na pele, esse sistema medeia respostas cutâneas, como proliferação e diferenciação celular, dor e inflamação (Petrovski et al., 2011; França et al., 2018; Eisenbarth et al., 2004). Está bem estabelecida a presença do B2R das cininas na pele. Em 1987, Yamamoto et al. localizaram cininogênio no espaço do tecido intersticial e no espaço entre os queratinócitos, assim como seus níveis elevados durante doenças inflamatórias da pele, quando há o extravasamento de constituintes plasmáticos em resposta a mediadores inflamatórios, tornando viável a hipótese de que as cininas se formam na pele, sendo favorecida durante algumas doenças inflamatórias da pele (Yamamoto et al., 1987).

Corroborando essa hipótese, Schremmer-Danninger et al. (1999) demonstraram que os dois receptores B1 e B2 estão constitutivamente presentes na pele humana normal, localizados em lugares específicos da camada basal da epiderme, induzindo a proliferação de queratinócitos. São lugares de alta atividade mitótica, sendo sugestivo que a BK possa desempenhar um papel na proliferação das células da pele (Schremmer-Danninger et al., 1995). Ademais, os dois receptores de cininas estão presentes em células de melanoma, com altas concentrações de cininogênio de baixo peso molecular, liberando BK e seus metabólitos, que causam dor espontânea e alodinia mecânica à camundongos inoculados com células de melanoma B16-BL6 (Fujita et al., 2010).

Petrovski e colaboradores (2009) em um estudo utilizando animais nocaute e antagonistas não-peptídicos para os receptores cininérgicos B1 e B2, confirmaram a participação das cininas em processos inflamatórios cutâneos e que a inibição destes receptores contribuem para a inibição do processo inflamatório agudo na pele (Petrovski et al., 2009). Além disso, Petrovski et al. (2011) verificaram que, na ausência do B2R, o B1R está possivelmente envolvido na formação do edema de orelha produzido através da aplicação múltipla de TPA, uma vez que o B2R realiza uma regulação positiva no B1R, além de regular a hiperproliferação celular dos queratinócitos e participar do processo inflamatório crônico (Petrovski et al., 2011).

Na pele normal, observou-se a expressão de B1R em baixas concentrações, contudo o aumento do número de receptores cininérgicos foi observado em biópsias de pacientes com eczema atópico liquenificado e psoríase (Matus et al., 2016). Trabalhos anteriores do grupo de pesquisa já demonstraram que o bloqueio dos receptores de cininas (B1 e B2) melhora o processo inflamatório do tipo psoriático, reduzindo o infiltrado celular e a hiperproliferação dos queratinócitos, sugerindo uma participação do sistema das cininas na patologia (Soley et al., 2020). Além disso, o sistema também participa dos processos de reparação tecidual, sendo sua ausência prejudicial para o fechamento da lesão de feridas, bem como a participação direta do B2R nos processos de proliferação e diferenciação celular da pele (Soley et al., 2016). Concordando com esse resultado, o estudo de Matus et al. (2008) demonstrou que o B1R

regula positivamente a diferenciação celular e aumenta a proliferação celular dos queratinócitos quando aplicado um agonista seletivo por via tópica em modelo animal de ferida, não sendo observado esse resultado *in vitro* (Matus et al., 2008; Matus et al., 2016).

Esses dados favorecem a hipótese de que o sistema das cininas exerce um importante papel na homeostase da pele e em seus estados patológicos. Entretanto, não existem ainda dados científicos que comprovem a atuação desses mediadores no processo melanogênico, tornando pertinente a análise das cininas em modelos de alterações pigmentares.

2. JUSTIFICATIVA

A melanina desempenha um papel crítico na proteção contra danos ao DNA induzidos pelo UV e estresse oxidativo, além de ser o maior determinante de coloração de pele e cabelo. As duas últimas décadas trouxeram um enorme avanço no entendimento de enzimas melanogênicas, melanossomas e suas vias de sinalização intra e extracelular que regulam a pigmentação humana (Dessinioti et al., 2009). Qualquer mudança anormal nos componentes que regulam a coloração normal de pele resulta em alteração na produção de melanina pela pele e estão relacionadas com doenças adquiridas ou de cunho genético (Fistarol e Itin, 2009).

A doença de despigmentação mais comum é o vitiligo (Fistarol e Itin, 2009), uma discromia adquirida da pele, na qual existe a perda de melanócitos da epiderme (Halder et al., 2009). Vários tipos de vitiligo são distinguidos de acordo com a distribuição de lesões acrômicas. Não existe concordância sobre os mecanismos envolvidos no desaparecimento dos melanócitos, porém as três hipóteses mais aceitas são as hipóteses bioquímica, neural e autoimune, sendo esta última a mais popular (Westerhof e D'Ischia, 2007).

A participação das cininas e de seus receptores na regulação do processo inflamatório já foi comprovada por diversos autores. Além disso, estudos indicam a existência de uma associação entre o polimorfismo do gene da ECA e a suscetibilidade ao desenvolvimento de vitiligo em pacientes da

Coreia, Índia do Sul e Egito (Jin et al., 2004; Deeba et al., 2009; Mahmoud , 2014; Badran, Nada e Hassan, 2015). A ECA é responsável por inativar a BK, que possivelmente atua via receptor B2 na ativação do fator nuclear-kB (NF-kB), assim como na expressão do gene da IL-1 β em cultura de células (Pan et al., 1998).

Além disso, resultados preliminares no nosso laboratório mostraram que tanto BK quanto des-Arg⁹-BK aumentam a produção de melanina em melanócitos B16F10 *in vitro*, nos levando a hipotetizar que a ativação dos receptores B1 e B2 leva a um aumento da melanogênese (resultados ainda não publicados).

No entanto, ainda pouco se sabe sobre a atuação das cininas no processo de melanogênese e conseqüentemente, como um possível alvo terapêutico para o tratamento e compreensão de diversas patologias da pele. Esta compreensão pode facilitar o desenvolvimento de novas terapias no direcionamento de desordens de melanogênese. Desta forma, o presente estudo tem como finalidade a elucidação do papel das cininas na despigmentação da pele através do modelo de vitiligo induzido por monobenzona, além de fazer dos receptores das cininas possíveis alvos terapêuticos para o tratamento e/ou controle do vitiligo.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Investigar a participação dos receptores de cininas no processo de despigmentação da pele a partir de modelo de vitiligo *in vivo*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a gravidade da despigmentação induzida por múltiplas administrações de MBZ em animais wild type (WT) e nocautes para os receptores das cininas;

- Analisar alterações na melanina na pele de animais WT e nocautes para os receptores das cininas, submetidos ao modelo de vitiligo induzido por múltiplas administrações de MBZ;
- Analisar alterações histológicas na pele de animais WT e nocautes para os receptores das cininas, submetidos ao modelo de vitiligo induzido por múltiplas administrações de MBZ;
- Verificar a alteração na resposta inflamatória (células e mediadores) na pele de animais WT e nocautes para os receptores das cininas, submetidos ao modelo de vitiligo induzido por múltiplas administrações de MBZ.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 WT e nocautes para os receptores das cininas, gentilmente cedidos pelo professor Dr. João Bosco Pesquero, do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp). A geração de camundongos sem o receptor B1 das cininas (KOB1R), sem os receptores B2 (KOB2R) e os duplos nocautes (KOB1B2R) foram previamente descritas por PESQUERO et al. (2000), BORKOWISKI et al. (1995) e CAYLA et al. (2002), respectivamente (Borkowski et al., 1995; Cayla et al., 2002; Pesquero et al., 2000). Todos os animais foram mantidos em condições de temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), ciclo claro/escuro de 12 horas e com livre acesso à água e ração. Foram mantidos na sala de experimento para adaptação, por pelo menos 48 horas antes da realização dos testes. Os animais utilizados foram divididos aleatoriamente em grupos. Os experimentos foram realizados de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratórios e todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Paraná, sob o número 1355.

4.2 MODELO ANIMAL DE VITILIGO INDUZIDO PELA APLICAÇÃO REPETIDA DE MBZ

Os animais foram divididos, randomicamente, em grupos de 5-8 camundongos por grupo (Tabela 1). Os dorsos dos animais foram tricotomizados 24 horas antes. Uma preparação contendo 40% de MBZ em creme não-iônico (100 mg) foi diariamente aplicada no dorso dos animais. A aplicação foi realizada sempre no mesmo local (dorso na região próxima à cauda), numa área de 2 x 2 cm, massageada até a completa penetração com o auxílio de espátula. Em adição, no grupo veículo foi realizada a administração tópica de creme não iônico. A administração tópica de MBZ (40%) ou creme não iônico (veículo) foi realizada por 50 dias consecutivos. Fotos foram tiradas no início e no final do experimento para avaliação posterior do desenvolvimento da despigmentação. Ao final do protocolo experimental, os animais foram eutanasiados e biópsias de pele foram coletadas com o auxílio de um punch (Figura 6). As amostras foram estocadas em -80°C para ensaios posteriores.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	
WT veículo	WT MBZ
KOB1 veículo	KOB1 MBZ
KOB2 veículo	KOB2 MBZ
KOB1B2 veículo	KOB1B2 MBZ

Tabela 1 – Divisão dos grupos experimentais. Os animais foram divididos em 8 grupos: WT veículo, WT tratado com MBZ, KOB1R veículo, KOB1R tratado com MBZ, KOB2R veículo, KOB2R tratado com MBZ, KOB1B2R veículo e KOB1B2R tratado com MBZ.

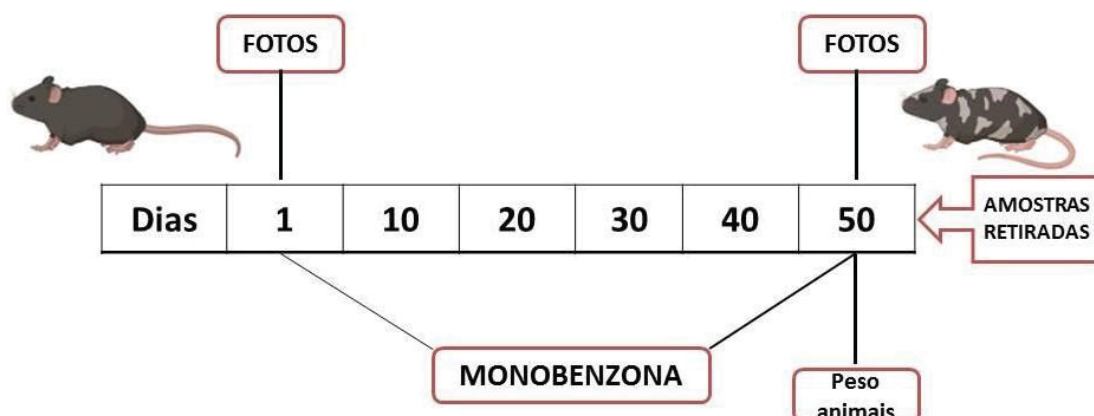


Figura 6 - Delineamento experimental do modelo animal de vitiligo induzido por múltiplas aplicações de MBZ.

4.3 DETERMINAÇÃO DO ESCORE E DISSEMINAÇÃO DE VITILIGO

A extensão da despigmentação dos grupos foi quantificada de maneira “cega” por 2 avaliadores. Foram examinados os locais de despigmentação (estimada como porcentagem dos locais em que surgiram despigmentação) e o escore de despigmentação (Tabela 2) foi definido como a soma dos escores de cada animal/avaliador.

SCORE	% DE DESPIGMENTAÇÃO (DORSO)
0	0%
1	<10%
2	10% - 25%
3	25% - 50%
4	50% - 75%
5	75% - 100%

Tabela 2 — Sistema de Escore do Vitiligo. Uma pontuação de 0 reflete nenhuma evidência de despigmentação e uma pontuação de 5 reflete 100% de

despigmentação naquele local. Para pontuação imparcial de camundongos com vitiligo, dois investigadores cegos pontuaram o score.

4.4 DETERMINAÇÃO DA DESPIGMENTAÇÃO

Fotos dos dorsos foram tiradas (Câmera Canon, modelo T3i, lente EF-S, 18-55 mm) no dia 0 e no dia 50. Conforme descrito por Riding et al. (2018), áreas pré-determinadas foram analisadas para cada animal, convertidas em 8-bit preto e branco e seu limite de brilho foi ajustado, assim todas as áreas pigmentadas eram pretas e as áreas despigmentadas, brancas (ImageJ software). A despigmentação por animal foi gerada através da diferença entre o dia 50 e o dia 0 e a média por grupo foi plotada como gráfico. Os resultados foram expressos como despigmentação da pele.

4.5 DETERMINAÇÃO DE EROs EM TECIDOS

A determinação de EROs foi baseada nos métodos de Hempel et al. (1999), com algumas modificações (Hempel et al., 1999). Este método determina níveis de EROs intracelulares, diretamente a geração de oxigênio na forma de radicais livres usando o composto 2',7'-diclorofluoresceína diacetato. Esse é capaz de se difundir para o interior das células, onde é hidrolisado, por esterases intracelulares, a um produto fluorescente (DCFH). Esse análogo fluoresceína não fluorescente é oxidado pelos oxidantes intracelulares a 2',7'-diclorofluoresceína altamente fluorescente. As amostras teciduais (círculos de 6 mm de pele do dorso dos animais) foram homogeneizadas em 1 mL de tampão PBS, pH 7,2, por 45 segundos a 0 °C. Os homogenatos foram incubados com DCFH-DA (concentração final de 2mM) durante 40 minutos no escuro (37 °C). Em seguida, a conversão de DCFH-DA ao produto DCFH foi medida usando leitor de microplacas (Bio-Tek Ultra Microplate reader EL 808) com excitação em 485 nm e emissão em 530 nm. Os resultados foram expressos em unidade de fluorescência.

4.6 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS EPIDERMIS DE MELANINA

Amostras de pele do dorso dos animais foram submetidas à avaliação dos níveis de melanina, conforme descrito por Hosoi e colaboradores (1985), com modificações (Hosoi et al., 1985). Previamente, a epiderme foi separada da derme com solução de EDTA 20 mM, a 37 °C, overnight. Às amostras foi adicionado tampão RIPA (tampão tris 1M, cloreto de sódio 4M, EDTA 20 mM, triton 1%, dodecil sulfato de sódio 0,1%, desoxicolato de sódio 0,5% e água MilliQ), homogeneizadas e centrifugados a 12000 rpm, por 20 min, a 4 °C. Os sobrenadantes foram retirados e 20% de DMSO em uma solução de NaOH 1N foi adicionada ao pellet e mantida em ebulição até sua dissolução total. Os níveis de melanina foram determinados colorimetricamente usando leitor de microplacas, na absorbância de 470 nm. Uma curva de melanina sintética foi usada como referência. As concentrações foram normalizadas com o peso das epidermes correspondentes. Os resultados foram expressos como concentração de melanina ($\mu\text{g/mL}$)/punch de epiderme.

4.7 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS

Para avaliar a influência dos receptores de cininas na liberação de citocinas na pele causada pela indução de MBZ, amostras de tecido (6 mm) foram homogeneizadas em tampão específico (PBS, 0,05% de Tween 20, 0,1 mM de PMSF e 0,5% de BSA) durante 45 s a 0 °C e o homogenato centrifugado a 3000 xg a 4 °C por 10 min. A determinação dos níveis de citocinas foi realizada por meio de um kit de ensaio imunoenzimático (ELISA) (Ready-Set-Go®, eBioscience). Os respectivos anticorpos de captura para IL-4, IL-5, IL-6, IL-17, TNF- α e IL-1 α foram diluídos para a concentração de uso de acordo com o fabricante do kit, adicionados 100 μL /poço em 96 poços placa e incubados durante a noite. Após a incubação, os poços foram lavados (o conteúdo dos poços foi aspirado e lavado três vezes com 400 μL /poço de tampão de lavagem (PBS, Tween 0,05%)) e a placa foi esvaziada em toalhas de papel, adicionado com 300 μL de tampão de bloqueio (PBS, 1% BSA, 5% sacarose, 0,05 mM NaNO_3) e incubado por 1 h. A placa foi lavada (como descrito acima) e as amostras (100 μL) foram incubadas. Após 2 h, a placa foi lavada e 100 μL de

estreptavidina diluída (1: 200) em PBS + 1% BSA foram adicionados a cada poço e incubados por 20 min no escuro. A placa foi lavada e incubada por 20 min no escuro com 100 µL/poço de substrato de solução (TMB + H₂O₂). A reação foi encerrada com a adição de 50 µL de solução de parada (H₂SO₄ 2 N). A densidade óptica foi determinada em 450 nm e 550 nm, sendo o resultado expresso pela diferença entre a segunda e a primeira leitura. A concentração de proteína de cada amostra no sobrenadante foi verificada usando o método de Bradford.

4.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA PELA COLORAÇÃO HEMATOXILINA E EOSINA

Amostras da pele (6 mm) foram coletadas e fixadas em solução ALFAC (85 mL de álcool a 80%, 10 mL de formol a 40% e 5 mL de ácido acético glacial), por um período de 16 h. Após esse período, as amostras foram desidratadas, embebidas em parafina, seccionadas em micrótomo (5 µm) e montadas em lâminas. As lâminas foram submetidas a banhos de xilol, para desparafinização, e hidratadas com banhos sucessivos em concentrações decrescentes de álcool e, em seguida, coradas com hematoxilina e eosina (H&E). Visando avaliar a celularidade e a espessura da epiderme, as amostras foram fotografadas com aumento de 200x em câmera digital acoplada a um microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão), e analisadas com o software ImageJ® versão 1.48 (National Institute of Health, EUA).

4.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA PELA COLORAÇÃO DE FONTANA-MASSON

Para avaliar a melanina, secções da pele foram coletadas e preparadas como descrito no item anterior (4.8) e coradas com Fontana-Masson. As lâminas foram embebidas em solução de nitrato de prata por 1 h a 56 °C e lavadas com água destilada. Em seguida, as amostras foram submetidas à solução de cloreto de ouro por 10 min e lavados em água destilada. Os cortes foram reduzidos em solução de tiosulfato de sódio 5% por 5 min e lavado com

água destilada. Por fim, os cortes foram mergulhados em solução corante de safranina por 5 min, enxaguados com água destilada e, então, desidratados. Os cortes foram montados com Bálsamo do Canadá e cobertos com lamínula. Por fim, as amostras foram fotografadas com aumento de 200x em câmera digital acoplada a um microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ E.P.M. A significância estatística entre os grupos foi avaliada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. O nível de significância aceito para os testes é de $P \leq 0,05$. Todos os testes foram realizados utilizando o software estatístico GraphPad Prism versão 8, São Diego, Califórnia, EUA.

5. RESULTADOS

5.1 EFEITO DA DELEÇÃO DOS RECEPTORES DE CININAS NA DESPIGMENTAÇÃO INDUZIDA POR MBZ

A fim de verificar a participação das cininas no processo de pigmentação da pele, animais nocautes para os receptores das cininas (KOB1R, KOB2R e KOB1B2R) e animais WT foram submetidos ao modelo de indução de vitiligo através de múltiplas aplicações de MBZ. Conforme apresentado na Figura 6, os animais foram submetidos a administrações tópicas diárias de MBZ por 50 dias consecutivos. Após o final do experimento, fotos foram tiradas e o grau de vitiligo nos animais foi avaliado por dois experimentadores. Como esperado, no final do tratamento com MBZ, pequenas manchas brancas apareceram na área exposta à droga da pele posterior do camundongo, que foi associada ao fenótipo de vitiligo (Figura 7). Nenhum ponto branco foi observado na pele dos animais tratados com veículo (Figura 7).



Figura 7: Fotos representativas das lesões de vitiligo induzidas pela MBZ tiradas no dia 50. No 0º dia e no 50º dia de tratamento, fotos foram tiradas para análise dos animais WT, KOB1R, KOB2R e KOB1B2R. Os animais dos grupos veículo receberam diariamente a aplicação tópica de creme não-iônico, enquanto os grupos MBZ receberam a aplicação tópica de MBZ 40% no dorso. As setas vermelhas indicam as regiões de despigmentação no local de aplicação da MBZ.

De acordo com essas descobertas anteriores, o aumento no score de vitiligo mostrou que a MBZ induziu significativamente lesões semelhantes ao vitiligo em camundongos WT, em comparação com o grupo de veículo WT (Figura 8). Digno de nota, valores mais elevados para o escore em camundongos que não expressaram os receptores B1 ou B2, bem como em camundongos deficientes para ambos os receptores, relacionaram-se com maior gravidade da doença (Figura 8). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados com veículo (Figura 8).

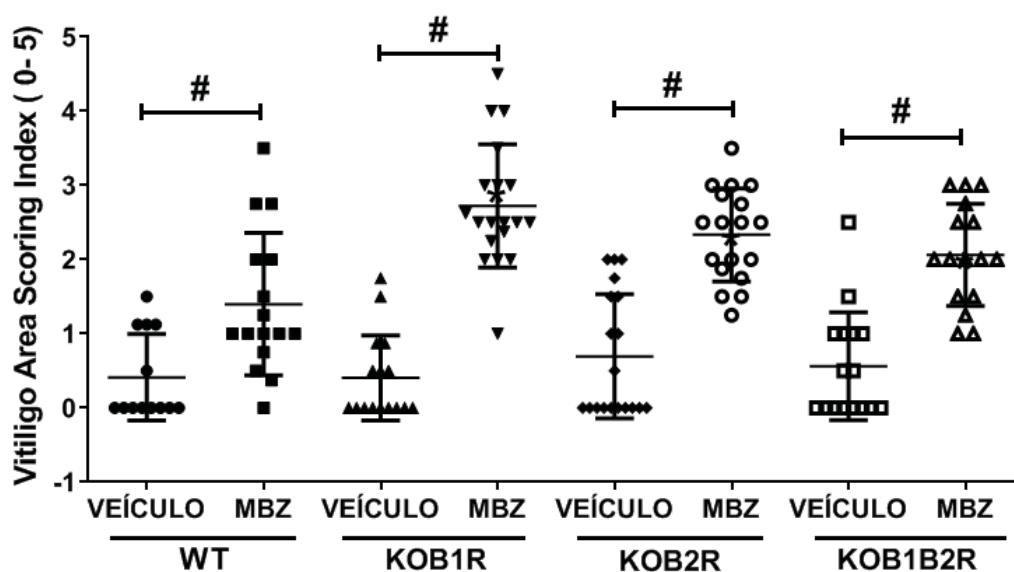


Figura 8: Efeito da deleção dos receptores de cininas na despigmentação induzida por MBZ. O índice de pontuação da área de vitiligo mostra o grau de processo de despigmentação estabelecido na pele de WT e camundongos knockout para receptor de cinina tratados com MBZ. O grupo veículo recebeu apenas um tratamento de creme não iônico. No Dia 50, fotos representativas da pele dorsal dos camundongos foram tiradas. O Índice de Pontuação de Vitiligo foi avaliado às cegas em cada ponto de tempo (Dias 0 e 50) por dois investigadores diferentes e, em seguida, foi calculada a média das pontuações de cada animal e avaliada a comparação entre os grupos. Cada barra representa a média $\pm$ SEM para 5-8 animais. * $P < 0,05$, significativamente diferente do grupo WT MBZ; ANOVA de uma via, com o teste post hoc de Newmann-Keuls. # $P < 0,05$, significativamente diferente de seus respectivos grupos de veículos.

Ainda, com o auxílio do software ImageJ e das fotos tiradas no primeiro e no último dia de experimento, conseguimos analisar a porcentagem de despigmentação dos animais final em relação ao primeiro dia. A extensão e o grau de despigmentação da pele foram mensurados e demonstraram que camundongos nocautes para os receptores das cininas tratados com MBZ apresentaram áreas maiores de perda de pigmento da pele, quando comparados com camundongos WT tratados com MBZ (Figura 9). De fato, o tratamento com MBZ aumenta a despigmentação da pele três a quatro vezes mais em animais com deficiência de receptores de cininas, em comparação com o grupo WT tratado com MBZ (Figura 9).

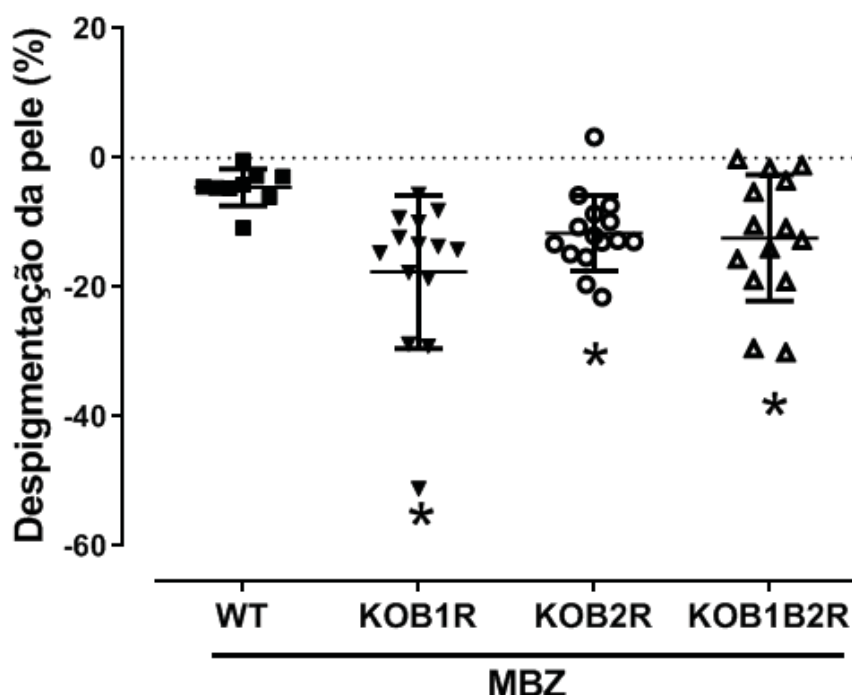


Figura 9: Efeitos da porcentagem de despigmentação da pele após o tratamento com MBZ. Resultados negativos mostram despigmentação e resultados positivos, pigmentação. Cada barra representa a média $\pm$ SEM para 5-8 animais. * $P < 0,05$, significativamente diferente do grupo WT MBZ; ANOVA de uma via, com o teste post hoc de Newmann-Keuls.

5.2 NÍVEIS DE MELANINA EM ANIMAIS NOCAUTES

Foi avaliada participação dos receptores de cininas na pigmentação da pele, para isso o conteúdo de melanina foi determinado na área da pele exposta ao fármaco (Figura 10). Os resultados apresentados na Figura 10 demonstram que a administração tópica de MBZ promoveu despigmentação significativa da pele, reduzindo em $60,6 \pm 3,7\%$ o teor de melanina em camundongos WT quando comparados ao grupo tratado com veículo.

Da mesma forma, camundongos com deleção no receptor de cininas B1 ($54,3 \pm 6,9\%$) ou B2 ($55 \pm 5,5\%$) apresentaram uma diminuição significativa nos níveis de melanina após o tratamento com MBZ, em comparação com o respectivo grupo veículo (Figura 10). É importante ressaltar que, como mostrado na Figura 10, os camundongos KOB1B2R veículo mostraram níveis significativamente mais baixos de melanina no grupo tratado com veículo ($54,4 \pm 5,8\%$), em comparação com o grupo veículo WT. Nesse contexto, os resultados mostraram que os tratamentos repetidos com MBZ não conseguiram reduzir ainda mais a quantidade de melanina em camundongos KOB1B2R (Figura 10).

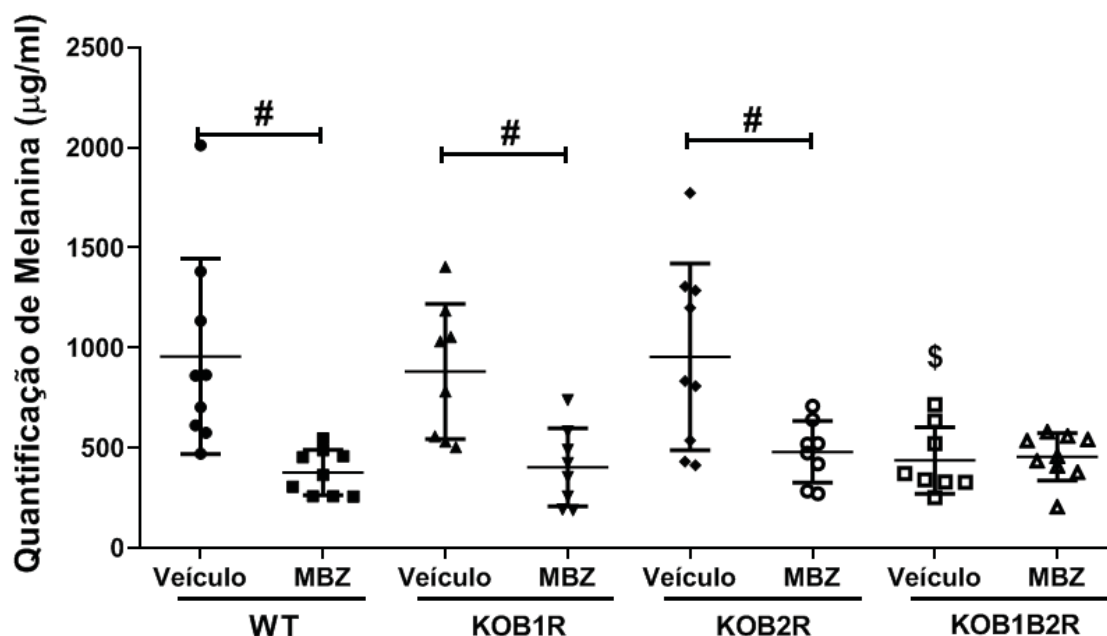


Figura 10: Efeitos dos níveis de melanina em animais nocaute para os receptores de cininas. Quantificação de melanina da pele realizada após 50 dias da aplicação de MBZ em tecidos homogeneizados. Cada barra representa a média $\pm$ SEM para 5-8 animais. # $P < 0,05$, significativamente diferente do grupo veículo; ANOVA de uma via, com o teste post hoc de Newmann-Keuls. \$ $P < 0,05$, significativamente diferente do grupo controle WT; ANOVA de uma via, com o teste post hoc de Newmann-Keuls.

5.3 COLORAÇÃO FONTANA MASSON NA PELE TRATADA COM MBZ

As amostras de pele do dorso dos animais foram submetidas à coloração com Fontana-Masson, cujo objetivo é corar os grânulos de melanina, principalmente evidenciados nas regiões da epiderme e dos folículos pilosos presentes na derme. Como observado nas fotos representativas (Figura 11) e no gráfico (Figura 12), a coloração de Fontana-Masson mostrou que o modelo semelhante ao vitiligo induzido por MBZ promoveu uma redução marcante nas células dérmicas contendo melanina nos camundongos WT (Figura 12).

Além disso, a ablação única do B1R ($43,7 \pm 1,3\%$) ou B2R ($56,6 \pm 1,7\%$) mostrou redução semelhante no conteúdo de melanina epidérmica em camundongos tratados com MBZ, em comparação com seu respectivo grupo de veículo (Figura 12). De relevância, os animais com a deleção de ambos os receptores (veículo KOB1B2R) tratados com MBZ apresentaram níveis mais baixos de melanina na epiderme, com $35,4 \pm 1,9\%$ quando comparados aos camundongos WT veículo (Figura 12). Ainda, o tratamento com MBZ causou perda de pigmento na epiderme de camundongos KOB1B2R ($44,5 \pm 2,3\%$), em comparação com camundongos tratados com veículo KOB1B2R (Figura 12). Camundongos WT tratados com MBZ apresentaram redução significativa de melanina nos folículos, resultando em menor distribuição dérmica de melanina (Figura 11).

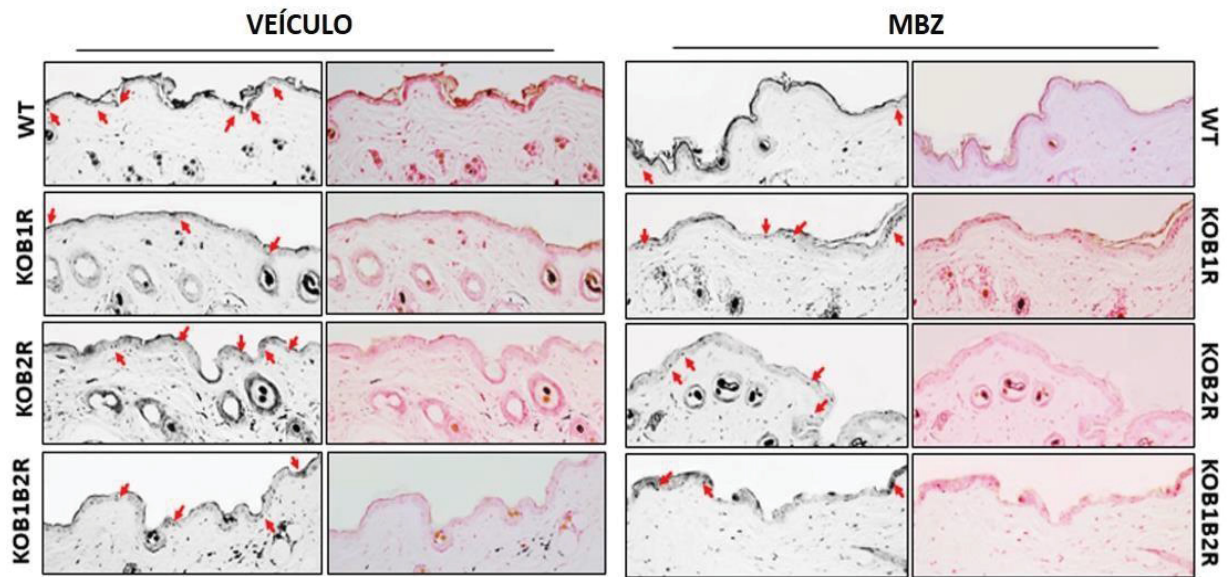


Figura 11: Fotos representativas da coloração Fontana-Masson. Fotos representativas de amostras de tecido para análise das alterações histológicas para marcação de melanina por coloração de Fontana-Masson (em rosa) e fotos representativas dos mesmos cortes histológicos para quantificação no software ImageJ (em preto e branco) para cada grupo animal, 50 dias após o início da indução por MBZ 40% (200x, escala 200 μ m). As setas vermelhas indicam regiões de presença de melanina.

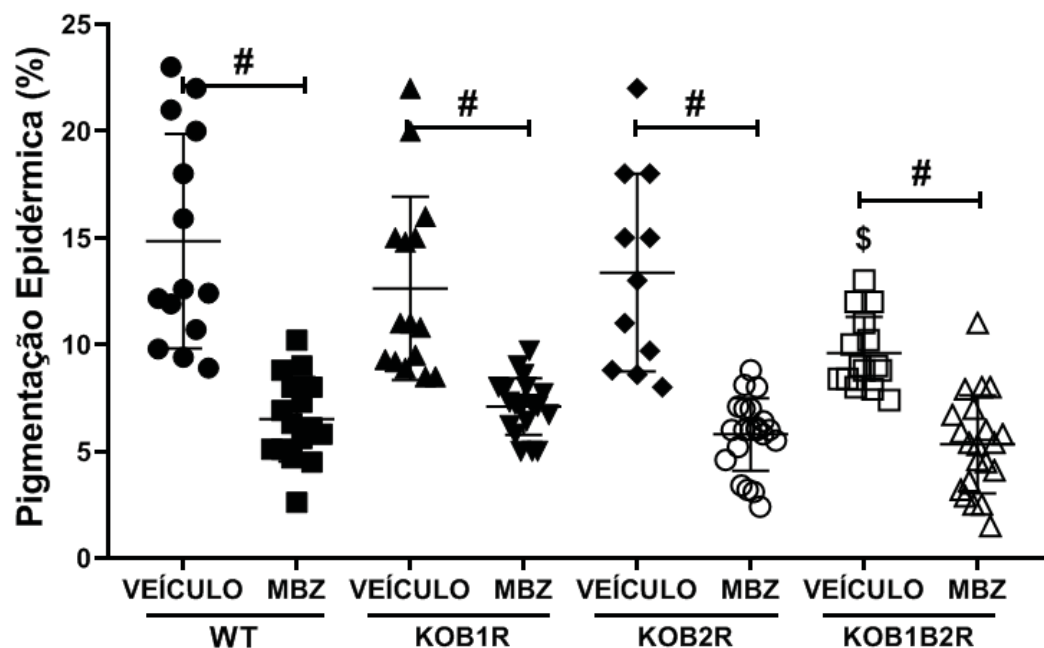


Figura 12: Efeitos dos níveis de melanina em animais nocaute para os receptores de cininas na coloração de Fontana Masson. Quantificação da coloração de melanina na epiderme de camundongos WT ou knockout tratados com veículo ou MBZ. Cada barra representa a média $\pm$ SEM para 5 animais. #P < 0,05, significativamente diferente de seu respectivo grupo de veículo; ANOVA de uma via, com o teste post hoc de Newmann-Keuls. \$P < 0,05, significativamente diferente do grupo controle WT; ANOVA de uma via, com o teste post hoc de Newmann-Keuls.

5.4 PRODUÇÃO DE EROs NA PELE DE ANIMAIS NOCAUTES

As EROs foram detectadas pela sonda fluorescente DCFH-DA. Conforme representado na figura 13, camundongos WT tratados com MBZ apresentaram redução significativa de EROs na pele (Figura 13). Os camundongos KOB1R e KOB2R apresentaram, respectivamente, $68,5 \pm 5,6\%$ e $43,7 \pm 5,4\%$ menos produção de EROs, quando comparados ao seus respectivos grupos veículo (Figura 13). Mais uma vez, camundongos KOB1B2R ($41,2 \pm 5,9\%$) apresentaram níveis de EROs mais baixos na pele normal, quando comparados aos camundongos tratados com veículo WT (Figura 13)

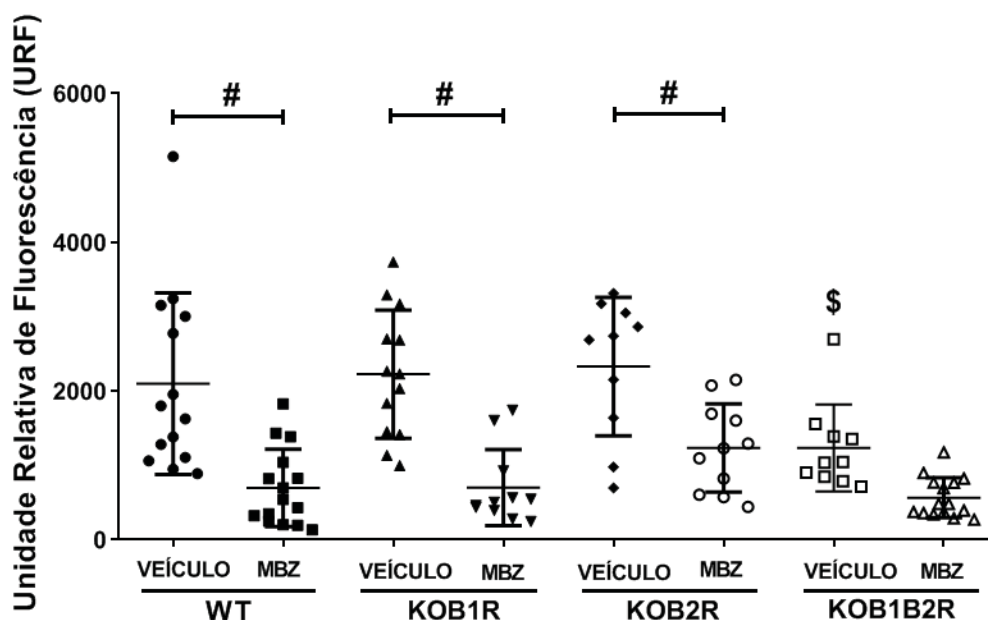


Figura 13: Efeitos da produção de espécies reativas de oxigênio em animais nocaute para os receptores de cininas. Quantificação da produção de EROs realizada após 50 dias da aplicação de MBZ em tecidos homogeneizados. Cada barra representa a média $\pm$ SEM para 5-8 animais. #P <0,05, significativamente diferente do grupo de veículo; ANOVA de uma via, com o teste post hoc de Newmann-Keuls. \$ P <0,05 significativamente diferente do grupo de veículo WT; ANOVA de uma via, com o teste post hoc de Newmann-Keuls.

5.5 AVALIAÇÃO DO INFILTRADO CELULAR NA PELE TRATADA COM MBZ

Em uma tentativa de avaliar a influência dos receptores de cininas na inflamação induzida pela MBZ, foi realizada análise histológica com hematoxilina-eosina, apresentada na figura 14, após coleta das amostras do dorso da pele no último dia do protocolo experimental (Figura 14)

Assim, como mostrado em 14 e 15, os animais WT tratados com MBZ mostraram um aumento no número de núcleos corados na derme, indicando aumento do infiltrado celular, em comparação com camundongos WT tratados com veículo. Além disso, os resultados mostraram que animais com deficiência de receptores das cininas como KOB1R ($82,7 \pm 2,7\%$), KOB2R ($62,6 \pm 3,8\%$) e KOB1B2R ($47,4 \pm 2,1\%$) tratados com MBZ tem um maior número de infiltrado celular, quando comparados com o grupo WT tratado com MBZ (Figura 15). Nenhuma alteração significativa foi observada nos grupos de veículo (Figura 15).

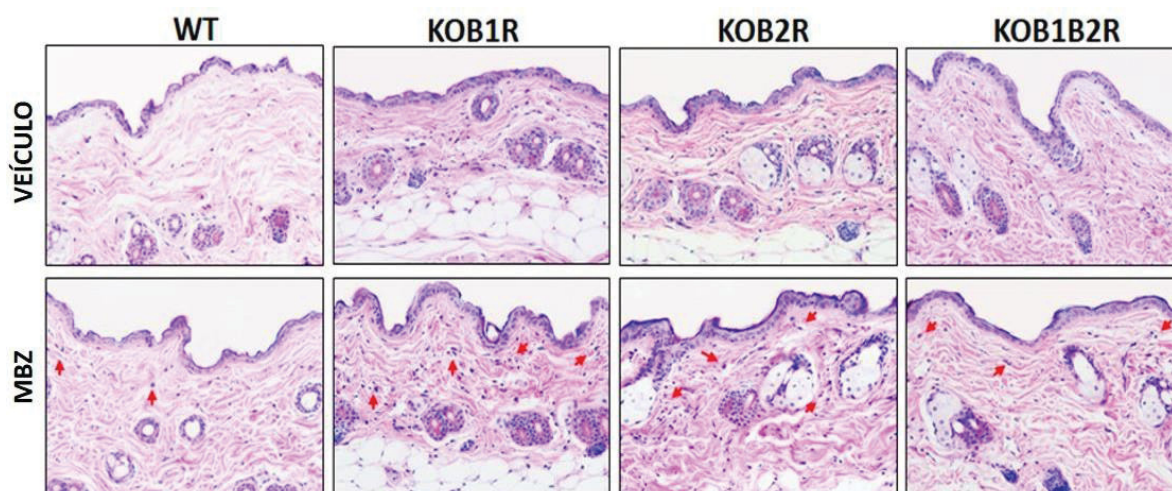


Figura 14: Fotos representativas da coloração H&E da pele de animais tratados múltiplas vezes com MBZ. As amostras teciduais (6 mm) foram coletadas no último dia do protocolo experimental (50º). As imagens foram adquiridas com microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão). Setas vermelhas indicam as regiões em que ocorre intensa celularidade na derme (Aumento de 200x, escala de 200µm).

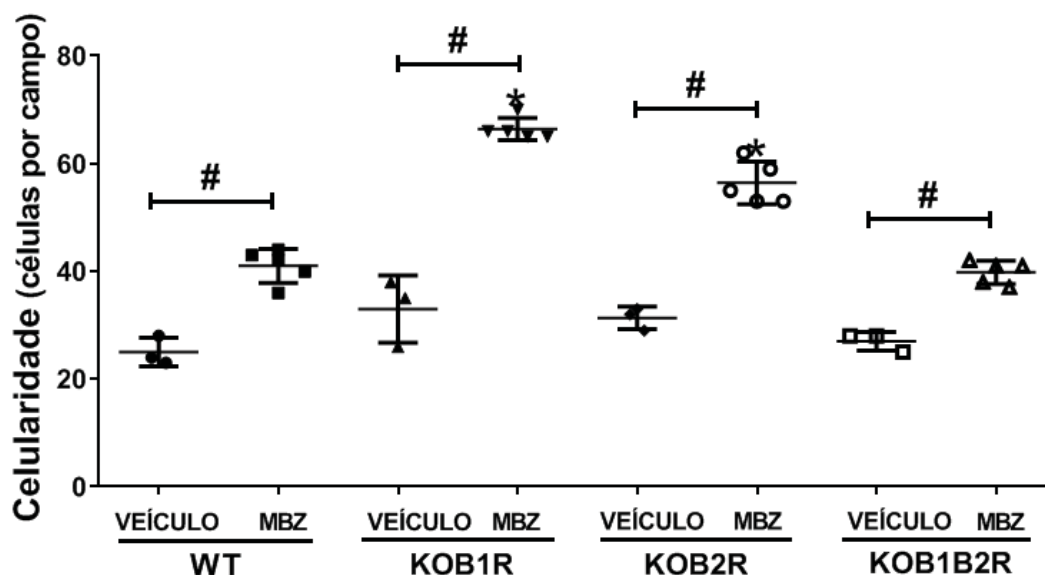


Figura 15: Efeito da deleção dos receptores de cininas no infiltrado celular nas lesões cutâneas de vitiligo induzidas por MBZ. Quantificação celular na pele de camundongos WT e KOB1R, KOB2R e KOB1B2R tratados com veículo ou MBZ. Cada barra representa a média $\pm$ SEM para 5 animais. *P < 0,05, significativamente diferente do grupo WT MBZ; ANOVA de uma via, com o teste post hoc de Newmann-Keuls. #P < 0,05, significativamente diferente de seu respectivo grupo de veículos.

5.6 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NA PELE E PELO DE ANIMAIS NOCAUTES

Para avaliar a importância dos receptores de cininas no equilíbrio entre as citocinas nas lesões de despigmentação, biópsias das áreas despigmentadas da pele foram utilizadas para medir os níveis teciduais de citocinas relacionadas à imunidade (Figura 16). Como esperado, o tratamento com MBZ promoveu um aumento significativo nas citocinas relacionadas à imunidade inata (IL-1 α , IL-6 e TNF- α), citocinas relacionadas a Th2 (IL-4 e IL-5) e citocinas relacionadas a Th17 (IL-17) em camundongos WT quando comparados ao veículo (Figura 16).

Os resultados mostraram que o tratamento com MBZ promoveu aumento semelhante nos níveis teciduais de IL-1 α em animais KOB1R ($40,7 \pm 1,3\%$) e KOB2R ($70,1 \pm 3,1\%$) quando comparados aos WT (Figura 16A). Em contraste, a falta de ambos os receptores de cininas resultou em menor

quantidade de IL-1 α ($24,7 \pm 2,5\%$) em lesões de pele despigmentadas (Figura 16A).

Os camundongos KOB1R tratados com MBZ ($62,2 \pm 2,8\%$) mostraram níveis significativamente mais elevados de IL-6 nas lesões de vitiligo (Figura 16B). Um aumento semelhante na IL-6 tecidual foi encontrado em animais KOB2R ($55,1 \pm 2,7\%$), quando comparados ao grupo WT tratado com MBZ (Figura 16B). Os resultados não mostraram nenhuma diferença significativa nos níveis de IL-6 na pele entre camundongos KOB1B2R tratados com veículo e MBZ (Figura 16B).

MBZ também aumentou os níveis de TNF- α em lesões de vitiligo KOB1R ($67,5 \pm 3,1\%$) e KOB2R ($75,4 \pm 2,3\%$), como observado em camundongos WT tratados com MBZ (Figura 16C). Por outro lado, uma redução considerável nos níveis de TNF- α nos tecidos foi detectada em camundongos KOB1B2R com vitiligo ($45,2 \pm 1,9\%$) (Figura 16C). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os animais KOB1B2R tratados com veículo e MBZ.

Os níveis de IL-4 aumentaram significativamente nas lesões de vitiligo KOB2R ($47,9 \pm 2,3\%$) e KOB1B2R ($38,3 \pm 2,4\%$), semelhante ao observado no grupo WT tratado com MBZ (Figura 16D). Enquanto os camundongos KOB1R ($84,6 \pm 2,7\%$) exibiram níveis mais elevados de IL-4 na pele despigmentada (Figura 16D).

O tratamento com MBZ induziu aumento de IL-5 em camundongos sem B1 ($67,6 \pm 3,7\%$), B2 ($56,76 \pm 1,8\%$), bem como em WT (Figura 16E). Mas nenhuma mudança significativa foi detectada no grupo de animais duplo nocautes tratados com veículo ou MBZ (Figura 16E). Em relação à citocina associada a Th17, conforme apresentado na Figura 5F, a ausência de receptores B1 ($70,40 \pm 7,5\%$) resultou em níveis mais elevados de IL-17 na pele com vitiligo, quando comparada ao WT MBZ (Figura 16F). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os animais KOB2R e KOB1B2R tratados com veículo ou MBZ (Figura 16F).

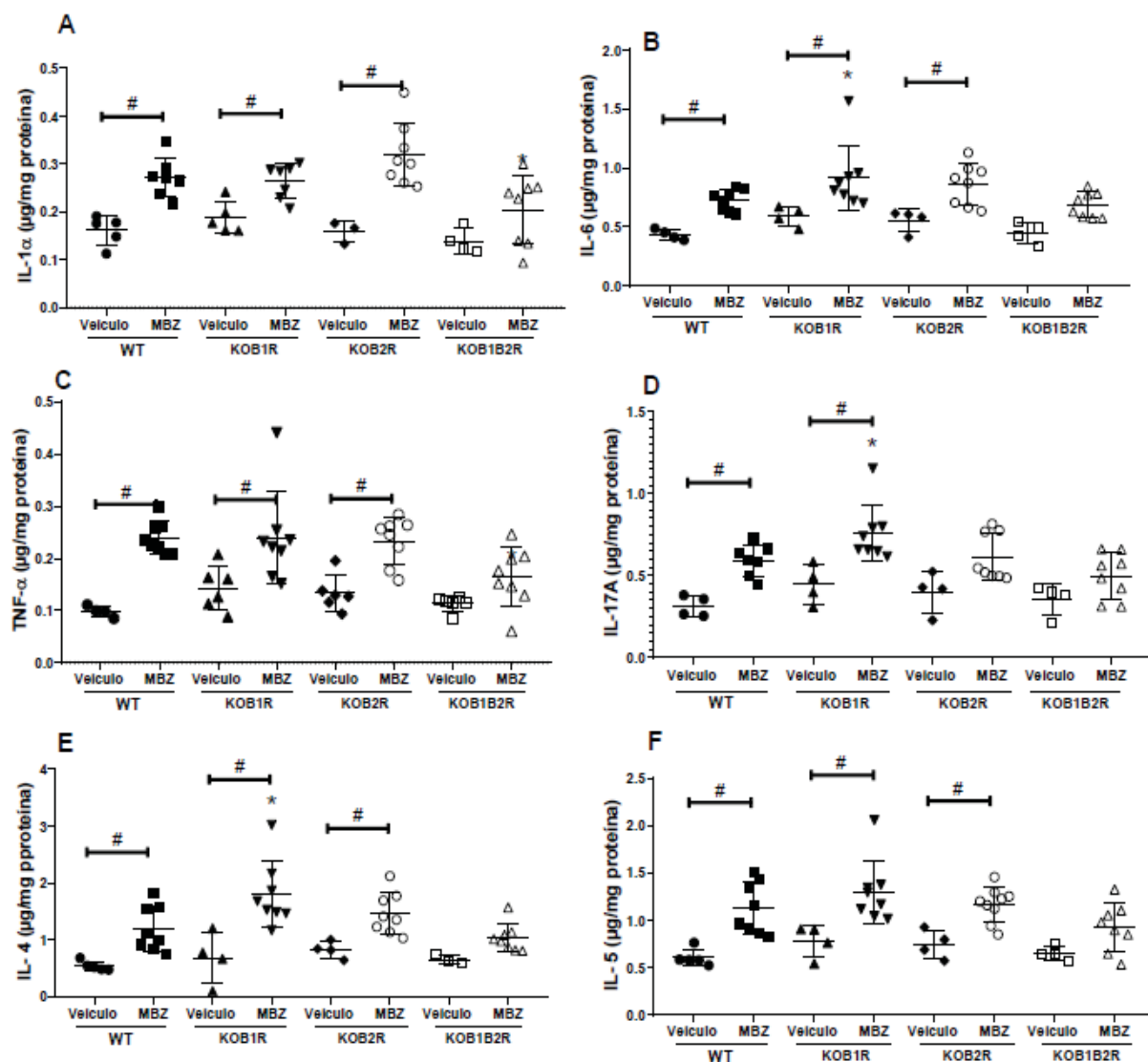


Figura 16: Efeitos dos níveis de citocinas em animais submetidos ao modelo de vitiligo induzido por MBZ. A medição dos níveis de IL-1 α (A), IL-6 (B), TNF- α (C), IL-4 (D), IL-5 (E) e IL-17 (F) foram realizadas no dorso dos animais após 50 dias de tratamento. Cada barra representa a média $\pm$ S.E.M. de 8 animais. * $P < 0,05$, significativamente diferente do grupo veículo (controle); ANOVA de uma via, com o teste post hoc de Newmann-Keuls. # $P < 0,05$, significativamente diferente do grupo de veículos.

6. DISCUSSÃO

Ao longo da história, o vitiligo é uma das doenças despigmentantes mais importantes em todo o mundo, provocando discriminação e segregação em certas culturas (Falabella, 2009; Frisoli, 2017). A etiologia e a patogênese subjacente do vitiligo permanecem pouco conhecidas e sua progressão é imprevisível, resultando na destruição dos melanócitos nas regiões afetadas, além de uma correlação com outras doenças autoimunes (Campanati et al., 2010). Até o momento não há cura para o vitiligo, mas o tratamento atual tenta aumentar ou diminuir a pigmentação (Felsten et al., 2011). Além do uso de corticóides e imunossupressores como tratamento de primeira linha, em alguns casos os tratamentos aplicados são fenóis, lasers, crioterapia e agentes sistêmicos despigmentantes, como imatinibe, imiquimod e MBZ (Rordam et al., 2012).

A MBZ é o agente despigmentante mais eficaz, descoberto em 1939 por Oliver et al., após relatos de leucodermia concomitante ao uso de um certo tipo de luva de borracha por trabalhadores de um curtume (Oliver et al., 1939), e aprovada para uso pelo FDA em 1952 (Rordam et al., 2012). O efeito do MBZ sobre os melanócitos se deve pela inibição da atividade da enzima tirosinase, essencial para a síntese da melanina, por meio da formação de haptenos de quinona e resíduos de cisteína pelo metabólito MBZ, que reduz a enzima e causa sua inibição (van den Boorn et al., 2011). Além da inibição da tirosinase, o MBZ pode levar à destruição de melanócitos mediada por células T e à indução de vitiligo químico. Portanto, é usado clinicamente como agente despigmentante tópico e também pré-estabelecido como um modelo animal de vitiligo, gerando características histológicas semelhantes à patologia, além da despigmentação, aumento do infiltrado celular, aumento do número de citocinas e geração de ROS (Zhu et al., 2013; Grimes e Nashawati, 2017; Erf e Le Poole, 2019).

Conforme mencionado anteriormente, há evidências da relação entre o vitiligo e um polimorfismo da ECA (Mahmound, 2014; Badran, Nada e Hassan, 2015; Campbell, 2003), o que desperta a curiosidade sobre os sistemas relacionados a esta enzima, como o sistema de cininas. Portanto, aqui

estudamos o desenvolvimento de doenças semelhantes ao vitiligo e usamos para isso camundongos nocautes para receptores de cininas. O tratamento com MBZ promoveu uma despigmentação significativa na pele de todos os grupos tratados, com os grupos KOB1R e KOB2R, em particular, apresentando despigmentação maior que 50%, quando comparados ao grupo WT tratado com MBZ e ao grupo duplo nocaute, maior que 40%. Esse resultado inicial indica que tanto B1R quanto B2R podem participar da melanogênese direta ou indiretamente, preservando a produção de melanina ou, ainda, evitando a morte dos melanócitos.

Ao contrário dos humanos, os melanócitos de camundongo estão principalmente presentes nos folículos capilares, restando pouca quantidade para a epiderme dorsal (Ishikawa et al., 2007; Park et al., 2004; Wolnicka-Glubisz et al., 2013). Descobrimos que a exposição prolongada a MBZ foi capaz de reduzir o conteúdo de melanina epidérmica sintetizado dos grupos WT, KOB1R e KOB2R, mas não foi capaz de alterar a quantidade de melanina no duplo nocaute (KOB1B2R). Na verdade, os camundongos KOB1B2R (veículo) apresentaram menor nível de melanina total na pele em condições fisiológicas. Assim, esta é a primeira indicação de que os receptores de cininas provavelmente estão envolvidos na manutenção da síntese de melanina basal na pele e que o processo inflamatório local e de despigmentação causado pela MBZ também é influenciado pelas cininas. Corroborando esses dados, as análises histopatológicas pela coloração de Fontana-Masson, usada para identificar a melanina (Bancroft e Gamble, 2008), revelaram que realmente há redução na concentração de melanina nos animais KOB1B2R. Esses achados interessantes suportam uma associação direta e/ou indireta entre os receptores de cininas e a síntese de melanina basal.

Como citado anteriormente, a síntese de melanina ocorre dentro de organelas chamadas melanossomos, dentro dos melanócitos. Durante a pigmentação da pele, os melanossomas são transferidos por cada melanócito para um agrupamento de queratinócitos ao seu redor (Costin e Hearing, 2007). Consequentemente, a unidade de melanina epidérmica é um complexo funcional e estrutural formado por melanócitos e queratinócitos, e é bem conhecido que o ATP aumenta os sinais locais de Ca^{2+} que ocorrem nos

melanócitos e levam à liberação de melanina (Costin e Hearing, 2007; Joshi et al., 2007; Serre et al., 2018). Glaser et al. (2013) descreveu que o Ca^{2+} sinalizado pelo influxo de ATP ativa PKC e estimula o CREB, necessários para a atividade da tirosinase. Curiosamente, estudos anteriores relataram que o sistema das cininas completo é expresso em células epiteliais de pigmento da retina humana, onde o B2R evoca a sinalização de Ca^{2+} intracelular para regular os processos celulares de proliferação e melanogênese (Catalioto, Valenti, Maggi, e Giuliani, 2015; Liu et al., 2016; Lee et al., 2019). Esses dados apoiam dados ainda não publicados do nosso grupo, que sugerem que as cininas aumentam a produção de melanina em melanócitos B16F10 *in vitro*, por meio da ativação do B2R, provocando elevação da concentração de Ca^{2+} intracelular e induzindo aumento da melanina extracelular devido ao aumento da secreção de melanina (resultados não publicados).

Foi encontrado que a BK induz a proliferação melanócitos B16F10 *in vitro* (resultados não publicados). Vários estudos anteriores mostraram que a BK pode estimular a proliferação de vários tipos de células e parece que os receptores das cininas quando ativados podem estimular várias vias proliferativas, como a via da proteína quinase C, vias de sinalização STAT3 e via de sinalização ERK1/2 (Greco et al., 2005; Tschöpe, Heringer-Walther e Walther, 2000; Wang et al., 2019). Este é um achado importante, uma vez que existem várias modalidades de tratamento disponíveis para o manejo do vitiligo, incluindo o crescimento de melanócitos das células-tronco de melanócitos reservatórios em folículos capilares (Riding, Richmond, e Harris, 2019; Singh et al., 2019). Na maioria dos pacientes com vitiligo, apenas os melanócitos epidérmicos são alvos para destruição de melanócitos imunomediada, e os melanócitos presentes nos folículos capilares permanecem inalterados (Riding e Harris, 2019). Portanto, em alguns casos, manchas brancas desenvolvidas na pele com vitiligo podem ser revertidas estimulando-se os precursores dos melanócitos a proliferar, migrar e substituir os melanócitos epidérmicos perdidos (Karagaiah et al., 2020).

O estresse oxidativo é um fator importante na melanogênese, pois desempenha um papel fundamental na integridade celular e é considerado uma das causas da destruição dos melanócitos no vitiligo, sendo especialmente

sensíveis às EROs (Maresca et al., 1997; Khan et al., 2009). Além disso, a tirosinase também apresenta essa sensibilidade e altas concentrações de H_2O_2 podem levar a desativação da enzima (Schweikardt et al., 2007). Foi observado que pacientes com vitiligo acumulam uma concentração de H_2O_2 acima de 10^{-3} M na epiderme, o que acaba inibindo a via de formação da L-tirosina (Schallreuter et al., 1999; 1991). Ainda, van den Boorn e colaboradores (2011) demonstraram que MBZ induz a formação de EROs em células pigmentadas (van den Boorn et al., 2011).

Embora os melanócitos sejam sensíveis ao estresse oxidativo, a síntese de melanina é um processo dependente de oxigênio que envolve geração de ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que sujeita os melanócitos e queratinócitos ao estresse oxidativo, juntamente com a exposição à UVA e UVB (Denat et al., 2014; Mansourpour et al., 2019). Portanto, a melanina tem propriedades antioxidantes e citotóxicas (Feller et al., 2014). Segundo Kayashima et al. (2012) e Bledsoe et al. (2006), o sistema de cininas tem a capacidade de contribuir com a redução do estresse oxidativo via síntese de NO, que regula a fosforilação oxidativa mitocondrial negativamente, por meio da ativação do receptor B2R. Em nosso estudo todos os animais tratados com MBZ apresentaram menos EROs na pele, sugerindo que essa redução está diretamente ligada a menor formação de melanina. Estudo anterior do nosso grupo (Moreira et al, 2015) mostrou que animais tratados com MBZ tiveram redução na quantidade de EROs na pele. Assim, como há menos melanina nos locais analisados com o tratamento com MBZ, há menor produção de EROs pelas células pigmentadas. Curiosamente, nossos resultados encontraram uma redução expressiva dos níveis de EROs na pele de camundongos KOB1B2R tratados com veículo, o que pode estar associado ao pouco conteúdo de melanina em estados fisiológicos. Este é outro achado importante que apoia a hipótese dos receptores de cininas para a via de síntese de melanina.

Além da despigmentação, outro importante biomarcador associado a severidade da doença que serve de diagnóstico é o infiltrado celular na derme, uma vez que diversos gatilhos locais silenciosos alertam o sistema imunológico inato da pele, que precedem as respostas imunes adaptativas que são

direcionadas aos melanócitos (Picardo e Taieb, 2009; Taieb, 2011; Patel et al., 2013). Em relação ao modelo estudado, Hartmann e colaboradores (2008) demonstraram que análises histológicas de pele de animais tratados com MBZ apresentaram infiltrado de células T CD8⁺ semelhantes às observadas em pacientes com vitiligo. Isso também foi confirmado por van den Boorn e colaboradores (2011), que demonstraram que a exposição de MBZ em células de melanoma induziu a ativação de células T CD8⁺ após 7 dias de incubação *in vitro*. Assim, conforme observado na pele de pacientes com vitiligo, o MBZ aumentou os infiltrados de células dérmicas em camundongos WT e, mais importante, um infiltrado inflamatório marcadamente maior foi observado na ausência de um dos receptores de cininas, seja B1 ou B2. Esta evidência sugere que receptores de cininas podem desempenhar um papel fundamental na modulação do recrutamento de células inflamatórias e na patogênese do vitiligo.

Muitos estudos descreveram que o B2R é constitutivo e participa de processos fisiológicos e patológicos agudos, enquanto o B1R é induzido durante dano ou inflamação tecidual (Couture et al., 2001; Cunha et al., 2007; Wong, 2016). A BK, por exemplo, possivelmente atua via B2R na ativação do fator nuclear-kB (NF-kB), bem como na expressão do gene IL-1 β em cultura de células (Pan et al., 1998). O recrutamento de leucócitos para o tecido inflamado depende do envolvimento de cininas, com o B1R sendo expresso nos linfócitos T e o B2R nos neutrófilos, uma vez que a sua migração foi inibida pelo antagonista B2R HOE 140 (Bockmann e Paegelow, 2000). Dados anteriores do nosso grupo mostraram que a deleção dos receptores de cininas reduz a migração de leucócitos na pele de camundongos após a administração tópica de TPA (Pietrovski et al., 2011). Embora Soley et al. (2016) demonstraram que em um modelo de lesão tecidual o B1R é uma molécula chave para o recrutamento de células, aqui verificamos que o aumento foi maior tanto no grupo KOB1R quanto no grupo KOB2R. Isso indica que pode estar ocorrendo uma regulação cruzada entre os receptores B1 e B2, ocasionando na compensação dos efeitos analisados. Estudos *in vivo* demonstraram essa possibilidade do B1R ser regulado de forma cruzada pela ativação ou dessensibilização/deleção do B2R, ou seja, a ausência de um dos receptores

de cininas pode compensar seus efeitos com uma regulação positiva do outro (Campos et al., 1995; Marcon et al., 2013; Rodrigues et al., 2013).

Juntamente com a despigmentação e o aumento do infiltrado inflamatório, há também a participação de diversas citocinas, que desempenham um papel importante no vitiligo (Richmond et al., 2017). Os melanócitos danificados liberam padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), que são reconhecidos por receptores presentes nas células dendríticas e ocasionam na liberação de componentes inflamatórios como as citocinas, que aumentam a progressão da doença (Custurone et al., 2021). Há evidências crescentes de que desequilíbrios de citocinas estão associados ao processo de despigmentação da pele, e concentrações aumentadas de citocinas locais e sistêmicas são encontradas em pacientes com vitiligo (Kindl & D'Orazio, 2021; Luiten et al., 2009; D'Mello et al., 2016; Fu et al., 2020). Já as cininas têm sido implicadas na regulação das respostas imunes celulares, e isso é enfatizado pela observação de que as cininas e seus receptores parecem estar envolvidos em doenças autoimunes humanas, incluindo esclerose múltipla (Dos Santos et al., 2008), lúpus (Seliga et al., 2018), psoríase (Soley et al., 2020) e doença de Alzheimer (Ji et al., 2019). Muitos dados da literatura têm mostrado que as cininas estão diretamente associadas a mudanças nas funções das células imunes (por exemplo, ativação de células imunes, diferenciação de células imunes, proliferação celular ou migração de células imunes), estimulando a síntese de citocinas, eicosanóides e fatores quimiotáticos (Bertram et al., 2007; Bourdet et al., 2010; Dutra, 2017). Nesse contexto, esse aspecto interessante do envolvimento de receptores de cininas na regulação local de citocinas no vitiligo cutâneo foi investigado no presente estudo.

Estudos anteriores mostraram que as células Th1 (IL-1 e TNF- α) estão envolvidas com doenças autoimunes e são produzidas durante respostas inflamatórias iniciais, além de estarem envolvidas no desenvolvimento e proliferação de células Th17 e IL-6. IL-1 α é uma citocina pró-inflamatória e conhecida como um fator ativador de células B, liberada por linfócitos e queratinócitos (Singh et al., 2016). O TNF- α é produzido por queratinócitos e fibroblastos, além disso, contribui para a apoptose dos queratinócitos ao

induzir, juntamente com IL-6, a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), facilitando o reconhecimento dos melanócitos pelas células T e mediar o dano citotóxico celular (Camara-Lemarroy & Salas-Alanis, 2013). Diversos estudos, incluindo o de Gholijani e colaboradores (2020) e o de Birol e colaboradores (2006), observaram aumento dos níveis séricos de IL-1 α e TNF- α nos pacientes com vitiligo, implicando no papel dessas citocinas na patogênese da doença (Gholijani et al., 2020; Birol et al., 2006). Já em nosso estudo encontramos que a falta de ambos os receptores de cininas (KOB1B2R) leva a uma redução dos níveis de IL-1 α e TNF- α neste modelo de vitiligo, reduzindo parcialmente a reação inflamatória, mediando um papel protetor, nas lesões vitiliginosas causadas por MBZ.

IL-6 é uma citocina pró-inflamatória responsável pela produção de ICAM-1, o que facilita as interações leucócito-melanócito, apresentando um efeito inibitório na pigmentação, juntamente com o TNF- α e IL-1 α (Sigh et al., 2016). Ela é produzida em resposta a estímulos por uma grande variedade de células, como fibroblastos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B e queratinócitos, além de também ser produzida por estímulos mediados por IL-1, TNF, pela IL-17 e pelo estresse oxidativo (Sandoval-Cruz et al., 2011; Hirano, 1998; Yao et al., 2012). Yu e colaboradores (1997) relataram aumento de IL-6 e TNF- α nas células mononucleares periféricas em pacientes com vitiligo ativo (Yu et al., 1997). IL-6 também se encontra aumentada quando há aumento na expressão de B1R e B2R em modelo de cardiopatia induzida (Westermann et al., 2008), em pacientes com lúpus neuropsiquiátrico, quando comparados aos pacientes controle (Dellalibera-Joviliano et al., 2003).

A resposta Th17 tem apresentado um papel fundamental em doenças autoimunes. A IL-17A é uma citocina pró-inflamatória capaz de induzir uma ampla gama de efetores inflamatórios nas células-alvo. É produzida principalmente por células T CD4+, mas também é produzida por células T CD8+, células $\gamma\delta$ e as células natural killer (Gaffen et al., 2004; Wang et al., 2011). Esmaeili e colaboradores (2011) observaram aumento dos níveis de IL-17 nos neutrófilos de pacientes com vitiligo, comparados com o grupo controle (Esmaeili et al., 2011). Corroborando esses achados, Behfarjam e colaboradores (2018) detectaram níveis elevados de IL-17 no plasma de

pacientes com vitiligo (Behfarjam et al., 2018), assim como Bhardwaj e colaboradores (2017). Além disso, Soley e colaboradores (2020) observaram que a ausência dos receptores B1 e B2 reduziu os níveis de IL-17A nas lesões psoriásicas (Soley et al., 2020). Porém, aqui observamos que no modelo de vitiligo há um aumento da expressão de IL-17 em KOB1R, sugerindo que os B2R são importantes no desenvolvimento da patologia.

Já IL-5 é uma citocina expressa por linfócitos T, responsável pela ativação de eosinófilos, mastócitos e basófilos, além de aumentar a expressão de células T CD8+, além de ser uma citocina com estrutura semelhante a IL-4 (Roufosse, 2018; Moore e Peebles, 2006). IL-4 é produzida por células T CD4, basófilos, eosinófilos, mastócitos e células T NK e atua como um regulador das funções dos linfócitos (Juntilla, 2018). A resposta de IL-4 em pacientes com vitiligo é controversa. Alguns estudos anteriores relataram que a produção de IL-4 e IL-5 estão aumentadas em pacientes com vitiligo em comparação com indivíduos normais (Gholijani et al., 2020; Khan et al., 2012). Além disso, IL-4 e IL-5 desempenham um papel na manutenção e diferenciação de células Th2 e é proposto que um desequilíbrio da resposta Th1/Th2 pode levar ao desenvolvimento de vitiligo (Fu et al., 2020). Em contraste, Lotti (2015) descreveu uma redução desses níveis nos pacientes. Souza e colaboradores (2013) encontraram que IL-4 reduz a expressão de B1R e B2R, enquanto Mejia e colaboradores (2015) relataram que queratinócitos HaCaT aumentam significativamente os níveis de IL-4 após estímulos com agonista B1R.

Em nosso estudo, a indução de vitiligo por MBZ levou a um aumento nas citocinas inflamatórias, como IL-6, IL-17A e TNF- α , que inibem a síntese de melanina através da via MAPK (Wang et al., 2013; Grine et al., 2015; Toosi et al., 2012). Vários estudos relataram que a ativação de BK e des-Arg⁹-BK estimulam a liberação de citocinas IL-1, IL-6, IL-4 e TNF (Burch et al., 1989; Paegelow et al., 1995; Murakami et al., 2008). Hayashi e colaboradores (2000) observaram que a BK induz a produção de IL-6 mediada por MAPK em fibroblastos de pulmão humano. Já Meotti e colaboradores (2012) relataram inibição do TNF- α pelos antagonistas de B1R e B2R (DALBK e HOE 140, respectivamente), enquanto a IL-6 foi inibida apenas por HOE 140 em modelo de hiperalgesia mecânica. Neste trabalho, a presença de B2R sozinho, o que

ocorre em camundongos KOB1R, pode estar contribuindo para o aumento da presença de IL-4, IL-6 e IL-17A, citocinas responsáveis pela migração celular, agravando o processo inflamatório, o que corrobora os achados quanto ao infiltrado celular, resultando em mais despigmentação da pele. Para confirmar quais células estão presentes neste modelo, são necessárias mais análises.

7. CONCLUSÃO

Descobrimos que quando não há receptores de cininas, a melanina basal está baixa, assim como há menor resposta inflamatória (ROS e algumas citocinas), mostrando que os dois receptores são importantes na produção basal de melanina na pele de camundongos. Além disso, os camundongos sem receptores de cininas apresentaram uma redução acentuada na despigmentação da pele causada pelo MBZ, que foi mais pronunciada do que nos camundongos WT. B1R e B2R apresentam uma importante relação com a migração leucocitária. Juntos, esses resultados indicam que os receptores das cininas participam de alguma forma do processo de melanogênese, incluindo a sua produção fisiológica e também na resposta inflamatória. Para entender melhor como e em que medida as cininas são importantes para a melanogênese e para doenças relacionadas à pigmentação da pele, mais estudos são necessários. Além disso, este trabalho abre a possibilidade de discutir o sistema cininérgico como alvo para o tratamento de doenças inflamatórias de cunho imunológico.

8. REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017
- ALGHAMDI, K. M., KUMAR, A. Depigmentation therapies for normal skin in vitiligo universalis. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v.25, n.7, p.749-57, 2011.
- ALIKHAN A, Felsten LM, Daly M, Petronic-Rosic V. Vitiligo: A comprehensive overview Part I. Introduction, epidemiology, quality of life, diagnosis, differential diagnosis, associations, histopathology, etiology, and work-up. **J AM ACAD DERMATOL**, 473 - 491, 2011.

ALKHATEEB, A. et al. Epidemiology of vitiligo and associated autoimmune diseases in Caucasian probands and their families. **Pigment Cell Res**, v. 16, n. 3, p. 208-14, 2003.

AMER, A. A. A. et al. Hidden Victims of Childhood Vitiligo: Impact on Parents' Mental Health and Quality of Life. **Acta Derm Venereol**, v. 95, p. 322–325, 2015.

BADER M. Kallikrein-kinin system in neovascularization. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. V.29, n. 5, p. 617-619, 2009.

BADRAN, D. I.; NADA, H.; HASSAN, R. Association of angiotensin-converting enzyme ACE gene polymorphism with ACE activity and susceptibility to vitiligo in egyptian population. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, v. 19, n. 5, p. 258-263, 2015.

BANCROFT, J. D.; GAMBLE, M. Theory and Practice of Histological Techniques. 6th Edition, Churchill Livingstone, Elsevier, China, 2008.

BEHFARJAM, F.; MANSOURI, P.; JADALI, Z. Imbalance of Peripheral Blood T Helper Type 17 Responses in Patients with Vitiligo. **Iran J Allergy Asthma Immunol**, v. 17, n. 2, p. 174-178, 2018.

BERTRAM, C. M. et al. Expression of kinin B1 and B2 receptors in immature, monocyte-derived dendritic cells and bradykinin-mediated increase in intracellular Ca²⁺ and cell migration. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, n. 6, p. 1445–1454, 2007.

BIROL, A. et al. Increased tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and interleukin 1 alpha (IL1-alpha) levels in the lesional skin of patients with non-segmental vitiligo. **Int J Dermatol**, v. 8, p. 992-993, 2016.

BHARDWAJ, S. et al. Increased systemic and epidermal levels of IL-17A and IL-1b promotes progression of non-segmental vitiligo. **Cytokine**, v. 91, p. 153–161, 2017.

BHOOOLA, K. D.; FIGUEROA, C. D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. **Pharmacol Rev.**, v. 44, p. 1-80, 1992.

BLANPAIN, C.; HORSLEY, V.; FUCHS, E. Epithelial Stem Cells: Turning over New Leaves. **Cell.**, v. 128, p. 445 - 458, 2007.

BLEDSE, G. et al. Kallikrein/kinin protects against gentamicin-induced nephrotoxicity by inhibition of inflammation and apoptosis, **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 21, n. 3, p. 624-633, 2006.

BÖCKMANN, S.; PAEGELOW, I. Kinins and kinin receptors: importance for the activation of leukocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 68, p. 587-592, 2000.

BOUWSTRA, J. A.; PONEC, M. The skin barrier in healthy and diseased state. **Biochim Biophys Acta**, v. 1758, n.12, p. 2080-2095, 2006.

BORKOWSKI, J.A. et al. Targeted disruption of a B2 bradykinin receptor gene in mice eliminates bradykinin action in smooth muscle and neurons. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 23, p. 13706–13710, 1995.

BOURDET, B. et al. Distribution and expression of B2-kinin receptor on human leukocyte subsets in young adults and elderly using flow cytometry. **Neuropeptides**, v. 44, n. 2, p. 155–161, 2010.

CALIXTO, J. B. et al. Kinins in pain and inflammation. **Pain**, v. 87, p. 1-5, 2000.

CALIXTO, J. B. et al. Kinin B1receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. **British Journal of Pharmacology**, v. 143, p. 803–818, 2004.

CAMARA-LEMARROY, C. R.; SALAS-ALANIS, J. C. The Role of Tumor Necrosis Factor- α in the Pathogenesis of Vitiligo. **Am J Clin Dermatol**, v. 14, p. 343–350, 2013.

CAMPANATI, A.; GIULIODORI, K.; GANZETTI, G. A patient with psoriasis and vitiligo treated with etanercept. **Am J Clin Dermatol**, v. 11, p. 46-48, 2010

CAMPBELL, D. J. The renin–angiotensin and the kallikrein–kinin systems. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 35, n. 6, p. 784-791, 2003.

CAMPOS, M. M., et al. Non-peptide antagonists for kinin B1 receptors: new insights into their therapeutic potential for the management of inflammation and pain. **Trends Pharmacol Sci**, v. 27, p. 646–51, 2006.

CATALIOTO, R. M. et al. Enhanced Ca^{2+} response and stimulation of prostaglandin release by the bradykinin B2 receptor in human retinal pigment

epithelial cells primed with proinflammatory cytokines. **Biochemical Pharmacology**, v. 97, n. 2, p. 189–202, 2015.

CASTRO, A. P. B. M. Inibidores de calcineurina no tratamento das dermatoses alérgicas. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n.5, 2006.

CAYLA, C. et al. (2002). Structure of the mammalian kinin receptor gene locus. **International Immunopharmacology**, v. 2, n. 13–14, p. 1721–1727, 2002.

COSTIN, G.-E.; HEARING, V. J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 4, p. 976–994, 2007.

COUTURE, R. et al. Kinin receptors in pain and inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 429, p. 161–176, 2001.

CUNHA, T. M. et al. TNF- α and IL-1 β mediate inflammatory hypernociception in mice triggered by B1 but not B2 kinin receptor. **European Journal of Pharmacology**, v. 573, p. 221–229, 2007.

CUSTURONE, P. B. et al. Role of Cytokines in Vitiligo: Pathogenesis and Possible Targets for Old and New Treatments. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, p. 11429, 2021

DEEBA, F. et al. Association of angiotensin converting enzyme gene I/D polymorphism with vitiligo in South Indian population. **International Journal of Medicine and Medical Sciences**, v. 1, n. 1, p. 9-12, 2009.

DELLALIBERA-JOVILLIANO, R.; FONSECA, P. O. Cininas E Inflamação O Sistema Das Cininas E A Resposta Inflamatória. **Revista InterSaúde**, v. 1, p. 112, 2020.

DELLALIBERA-JOVILIANO, R. Kinins and cytokines in plasma and cerebrospinal fluid of patients with neuropsychiatric lupus. **The Journal of Rheumatology**, v. 30, n. 3, p. 485-492, 2003.

DELLATORRE, G. et al. Consenso sobre tratamento do vitiligo - Sociedade Brasileira de Dermatologia. **An Bras Dermatol.**, v. 95, n. 1, p. 70-82, 2020.

DENAT, L. et al. Melanocytes as Instigators and Victims of Oxidative Stress. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 6, p. 1512–1518, 2014.

DENTON, C. R. et al. Inhibition of melanin formation by chemical agents. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 18, n. 2, p. 119-35, 1952.

DESSINIOTI, C. et al. A review of genetic disorders of hypopigmentation: lessons learned from the biology of melanocytes. **Experimental Dermatology**, v. 18; p. 741-749, 2009.

DOS SANTOS, A. C. et al. Kinin B2 receptor regulates chemokines CCL2 and CCL5 expression and modulates leukocyte recruitment and pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice. **Journal of Neuroinflammation**, v. 5, p. 1–10, 2008.

D'MELLO, S. A. N et al. Signaling Pathways in Melanogenesis. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 17, p. 1144, 2016.

D'ORAZIO, J. et al. UV Radiation and the Skin. **Int J Mol Sci**, v.14, n.6, p.12222-48. 2013

DUTRA, R.C. Kinin receptors: Key regulators of autoimmunity. **Autoimmunity Reviews**, v. 16, p. 192–207, 2017.

EISENBARTH, H, et al. Sensitization to bradykinin B1 and B2 receptor activation in UV-B irradiated human skin. **Pain**, v. 110, p. 197–204, 2004.

ERF, G. F.; LE POOLE, I. C. Animal models. In: Picardo M., Taïeb A. (eds) Vitiligo. **Springer**, Cham, v. 22, p. 205-223, 2019.

ESMAEILI, B. et al. Expression of IL-17 and COX2 Gene in Peripheral Blood Leukocytes of Vitiligo Patients. **Iran J Allergy Asthma Immunol.**, v. 10, n. 2, p. 81-89, 2011.

ESMAT, S. et al. Phototherapy and Combination Therapies for Vitiligo. **Dermatol Clin**, v. 37, p.171–192, 2017.

EZZEDINE, K. et al. Revised classification/nomenclature of vitiligo and related issues: **the Vitiligo Global Issues Consensus Conference**, v. 25, 2012.

EZZEDINE, K. et al. Vitiligo. **Lancet**, v. 386, n. 9988, P74-84, 2015.

EZZEDINE, K.; SILVERBERG, N. A Practical Approach to the Diagnosis and Treatment of Vitiligo in Children. **Pediatrics**, v. 138, n. 1, e20154126, 2016.

FALABELLA, R. Vitiligo and the melanocyte reservoir. **Indian journal of dermatology**, v. 54, n. 4, p. 313–318, 2009.

FARIA, A. R. et al. Vitiligo - Part 2 - classification, histopathology and treatment. **An. Bras. Dermatol.** v. 89, n. 5, 2014.

FELLER, L. et al. Melanin: the biophysiology of oral melanocytes and physiological oral pigmentation. **Head Face Med**, v.10, p.8. 2014.

FELSTEN, L. M.; ALIKHAN, A.; PETRONIC-ROSIC, V. Vitiligo: a comprehensive overview Part II: treatment options and approach to treatment. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 65, n. 3, p. 493–514, 2011.

FISTAROL, S. K.; ITIN, P. H. Disorders of pigmentation. **Journal of the German Society of Dermatology**. v.8, n.3, p.187-201, 2010.

FRISOLI, M. L.; ESSIEN, K.; HARRIS, J. E. Vitiligo: Mechanisms of Pathogenesis and Treatment. **Annual review of immunology**, v. 38, p. 621–648, 2020.

FU, C., et al. Roles of inflammation factors in melanogenesis (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 21, n. 3, p. 1421–1430, 2020.

FUJITA, M. et al. Roles of kinin B1 and B2 receptors in skin cancer pain produced by orthotopic melanoma inoculation in mice. **European Journal of Pain**, v. 14, n. 6, p. 588-594, 2010.

GAFFEN, S. L. Biology of recently discovered cytokines: interleukin-17--a unique inflammatory cytokine with roles in bone biology and arthritis. **Arthritis Res Therapy**, v. 6, n. 6, p. 240-247, 2004.

GAUTHIER, Y. et al. Melanocyte detachment after skin friction in non lesional skin of patients with generalized vitiligo. **Br J Dermatol.**, v. 148, p. 95-101, 2003.

GHOLIJANI, N.; YAZDANI, M. R.; DASTGHEIB, L. Predominant role of innate pro-inflammatory cytokines in vitiligo disease. **Archives of Dermatological Research**, v. 312, n. 2, p. 123–131, 2020.

GLASER, T.; RESENDE, T.T.; ULRICH, R. Implications of purinergic receptor-mediated intracellular calcium transients in neural differentiation. **Cell Commum Signal**, v. 11, p. 12, 2013.

GOLIAS, C. H. et al. The kinin system - bradykinin: biological effects and clinical implications. Multiple role of the kinin system - bradykinin. **Hippokratia**, v. 11, n. 3, p. 124–128, 2007.

GRECO, S. et al. Bradykinin stimulates cell proliferation through an extracellular-regulated kinase 1 and 2-dependent mechanism in breast cancer cells in primary culture. **Journal of Endocrinology**, v. 186, n. 2, p. 291–301, 2005.

GRIMES, P.E.; NASHAWATI, R. Depigmentation Therapies for Vitiligo. **Dermatologic Clinics**, v. 35, n. 2, p. 219–227, 2017.

HADI, A. et al. Comorbid diseases of vitiligo: A 10-year cross-sectional retrospective study of an urban US population. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 82, n. 3, p. 628–633, 2020.

HALDER, R. M.; CHAPPELL, J. L. Vitiligo update. **Semin Cutan Med Surg.**, v. 28, n. 2, p. 86-92, 2009.

HALL J. M. Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. **Pharmac. Ther.**, v. 56, p. 131-190, 1992.

HAMEED, A.; AKHTAR, N. The Skin Melanin: An Inhibitor of Vitamin-D3 Biosynthesis: With Special Emphasis with Structure of Skin. A Mini Review. **Dermatology Case Reports**, v. 4, n. 1, p. 1-4, 2019.

HARTMANN, A., et al. Vitiligo and melanoma-associated hypopigmentation (MAH): shared and discriminative features. **Journal of the German Society of Dermatology**, v. 6, p.1053-1059, 2008.

HARTMANN, A.; BROCKER, E. B.; BECKER, J. C. Hypopigmentary Skin Disorders Current Treatment Options and Future Directions. **Drugs**, v. 64, n. 1, p. 89-107, 2004.

HAYASHI, R. et al. Bradykinin stimulates IL-6 and IL-8 production by human lung fibroblasts through ERK- and p38 MAPK-dependent mechanisms. **European Respiratory Journal**, v. 16, p. 452-458, 2000.

HEMPEL, S. L. et al. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5 (and 6)-carboxy-2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, n. 1-2, p. 146–159, 1999.

HIRANO, T. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. **Int Rev Immunol**, v. 16, n. 3-4, p. 249-84, 1998.

HOSOI, J. et al. Regulation of Melanin Synthesis of B16 Mouse Melanoma Cells by 1 α ,25- Dihydroxyvitamin D3 and Retinoic Acid. **Cancer Research**, v. 45, p. 1474-1478, 1985.

HOSSEINI, S. M., et al. Decreased levels of interleukin 27 in the serum of vitiligo patients. **An Bras Dermatol.**,p 1-5, 2020

Jl, B. et al. The Dual Role of Kinin/Kinin Receptors System in Alzheimer's Disease. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 12, p. 1–10, 2019.

JIMBOW, K. et al. Increased sensitivity of melanocytes to oxidative stress and abnormal expression of tyrosinase-related protein in vitiligo. **British Journal of Dermatology**, v. 144, p. 55-65, 2001.

JIN, S. et al. Association of Angiotensin Converting Enzyme Gene I/D Polymorphism of Vitiligo in Korean Population. **Pigment Cell Research**, v. 17, p. 84–86, 2004.

JOSHI, P. G. et al. Melanocyte-keratinocyte interaction induces calcium signalling and melanin transfer to keratinocytes. **Pigment Cell Research**, v. 20, n. 5, p. 380–384, 2007.

JUNTILLA, I. S. Tuning the Cytokine Responses: An Update on Interleukin (IL)-4 and IL-13 Receptor Complexes. **Front. Immunol.**, v. 9, p. 888, 2018.

KARAGAIAH, et al. Emerging drugs for the treatment of vitiligo, **Expert Opinion on Emerging Drugs**, 25:1, 7-24, 2020.

KASHUBA, E. et al. The kinin-kallikrein system: Physiological roles, pathophysiology and its relationship to cancer biomarkers. **Biomarkers: biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals.**, v.1, n. 1, 2013.

KAYASHIMA, Y.; SMITHIES, O.; KAKOKI, M. The kallikrein-kinin system and oxidative stress **Current opinion in nephrology and hypertension.** , v. 21, n. 1, p. 92–96, 2012.

KHAN, R. et al. Circulatory levels of antioxidants and lipid peroxidation in Indian patients with generalized and localized vitiligo. **Arch Dermatol Res**, v. 301,p. 731–737, 2009.

KHAN, R.; GUPTA, S.; SHARMA, A. Circulatory levels of T-cell cytokines (interleukin [IL]-2, IL-4, IL-17, and transforming growth factor- β) in patients with vitiligo. **J Am Acad Dermatol**, v. 66, n. 3, p. 510–511, 2012.

KEMP, E. H. et al. Autoantibodies to tyrosinase-related protein-1 detected in the sera of vitiligo patients using a quantitative radiobinding assay. **Br J Dermatol** 139:798–805, 1998.

KEMP, E. H. et al. Detection of tyrosinase autoantibodies in patients with vitiligo using 35S-labeled recombinant human tyrosinase in a radioimmunoassay. **J Invest Dermatol**, v. 109, p. 69–73, 1997.

KINDL, G. H., & D'ORAZIO, J. A. (2021). Pharmacologic manipulation of skin pigmentation. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 34(4), 777–785.

KORANNE, R. V.; DERM, D.; SACHDEVA, K. G. Vitiligo. **International Journal of Dermatology**, v. 27, n. 10, p. 676 – 681, 1998.

KOSTOVIC, K.; PASIC, A. New Treatment Modalities for Vitiligo: Focus on Topical Immunomodulators. **Drugs**, v. 65, p 447–459, 2012.

KRÜGER, C.; SCHALLREUTER, K. U. A review of the worldwide prevalence of vitiligo in children/adolescents and adults. **International Journal of Dermatology**, v. 51, p. 1206-1212, 2012.

LAMBERT MW, et al. The physiology of melanin deposition in health and disease. **Clinics in Dermatology**, v. 37, n. 5, p. 402-417, 2019.

LAI-CHEONG, J. E.; MCGRATH, J. A. Structure and function of skin, hair and nails. **Medicine**. 2017.

LE POOLE, I. C, et al. Tenascin is overexpressed in vitiligo lesional skin and inhibits melanocyte adhesion. **Br J Dermatol.**, v. 197, p. 171-178, 1997.

LEE, E. J. et al. Critical Role of ATP-P2X7 Axis in UV-Induced Melanogenesis, **Journal of Investigative Dermatology**, v. 139, n. 7, p. 1554-1563, 2019.

LI, M.; KNAPP, S. K.; IDEN, S. Mechanisms of melanocyte polarity and differentiation: What can we learn from other neuroectoderm-derived lineages?, **Current Opinion in Cell Biology**, v. 67, p. 99-108, 2020.

LIN, J.; FISHER, D. Melanocyte biology and skin pigmentation. **Nature**, v. 445, p. 843-850, 2007

LIU, Q. et al. Effect of bradykinin on cultured retinal pigment epithelial cells. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 9, n. 3, p. 2998–3006, 2016.

LUITEN, R. M. et al. Autoimmune destruction of skin melanocytes by perilesional T cells from vitiligo patients. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 129, n. 9, p. 2220–2232, 2009.

LOSQUADRO, W. D. Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. **Facial Plast Surg Clin N Am.**, p. 1-7, 2017

LOTTI, T. New frontiers in vitiligo treatment: the low dose cytokines-based therapy. **Med Case Rep**, v. 2, n. 2, p. 18, 2015.

LUXENBURG, C.; ZAIDEL-BAR, R. From cell shape to cell fate via the cytoskeleton—Insights from the epidermis. **Experimental Cell Research**, v. 378, p. 232–237, 2019.

MAHMOUND, R. H. Angiotensin converting enzyme (ACE) gene polymorphism in vitiligo, p. 108-111, 2014.

MANSOURPOUR, H. et al. Therapeutic effects of iNOS inhibition against vitiligo in an animal model. **European journal of translational myology**, v. 29, n. 3, p. 8383, 2019.

MANZONI, A. P. et al. Assessing depression and anxiety in the caregivers of pediatric patients with chronic skin disorders. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 88, n. 6, p. 894–899, 2013.

MARCEAU, F.; BACHVAROV, D. R. Kinin receptors. **Clinical reviews in allergy & immunology**, v. 16, n. 4, p. 385–401, 1998.

MARCEAU, F. et al. Kinin receptors: functional aspects. **International immunopharmacology**, v. 2, n. 13-14, p. 1729–1739, 20202.

MARCON, R. et al. Exacerbation of DSS-induced colitis in mice lacking kinin B(1) receptors through compensatory up-regulation of kinin B(2) receptors: the role of tight junctions and intestinal homeostasis. **British journal of pharmacology**, v. 168, n. 2, p. 389–402, 2013.

MARESCA, V. et al. Increased Sensitivity to Peroxidative Agents as a Possible Pathogenic Factor of Melanocyte Damage in Vitiligo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 109, n. 3, p. 310-313, 1997.

MARINHO, F. S.; CIRINO, P. V.; FERNANDES, N. C. Clinical epidemiological profile of vitiligo in children and adolescents. **An. bras. dermatol.**, v. 88, n. 6, 2013.

MATUS CE, et al. Activation of kinin B1 receptor triggers differentiation of cultured human keratinocytes. **Br J Dermatol.**, v. 159, n. 4, p.792-803. 2008.

MATUS, C. E. et al. Activation of the human keratinocyte B1 bradykinin receptor induces expression and secretion of metalloproteases 2 and 9 by transactivation of EGFR. **Exp Dermatol**, v. 25, n. 9, p. 694-700, 2016.

MATUS, C. E.; BHOOLA, K. D.; FIGUEROA, C. D. Kinin B1 Receptor Signaling in Skin Homeostasis and Wound Healing. **YALE JOURNAL OF BIOLOGY AND MEDICINE**, v. 93, p.175-185, 2020,

MAURER, M. et al. New topics in bradykinin research. **Allergy**, v. 66, p. 1397–1406, 2011.

MEJIA, A. J. et al. Intracellular signaling pathways involved in the release of IL-4 and VEGF from human keratinocytes by activation of kinin B1 receptor: functional relevance to angiogenesis. **Arch Dermatol Res**, v. 307, p. 803–817, 2015.

MEOTTI, F. et al. Inflammatory muscle pain is dependent on the activation of kinin B1 and B2 receptors and intracellular kinase pathways. **British Journal of Pharmacology**, v. 166, p. 1127-1139, 2012

MIDELFART, K. et al. A case of chronic urticaria and vitiligo, associated with thyroiditis, treated with PUVA. **Dermatology**, v. 167, p 39 – 41, 1983.

MOHAMMED, G. F.; GOMAA, A. H.; AL-DHUBAIBI, M. S. Highlights in pathogenesis of vitiligo. **World J Clin. Cases**, v. 3, n. 3, p. 221-230, 2015.

MOORE, M. L.; PEEBLES, R. S. INTERLEUKINS | IL-5, Editor(s): Geoffrey J. Laurent, Steven D. hapiro, Encyclopedia of Respiratory Medicine, **Academic Press**, p. 359-363, 2006

MOREIRA, C.G. et al. Pre-clinical evidences of *Pyrostegia venusta* in the treatment of vitiligo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 168, p. 315–325, 2015.

MORRONE, A. et al. Catecholamines and vitiligo. **Pigment Cell Res.**, v. 5, n. 2, p. 65-69, 1992

MURAKAMI, M.; OHTA, T.; ITO, S. Interleukin-1 β enhances the action of bradykinin in rat myenteric neurons through up-regulation of glial B1 receptor expression. **Neuroscience**, v. 151, n. 1, p. 222-231, 2008.

NICOLAIDOU, E.; Mastrafsi, S.; Tzanetakou, V.; Rigopoulos, D. Childhood Vitiligo. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 20, p. 515 – 526, 2019.

OGG, G. S. et al. High Frequency of Skin-homing Melanocyte-specific Cytotoxic T Lymphocytes in Autoimmune Vitiligo. **J Exp Med.**, v. 188, n. 6, p. 1203–1208, 1998.

OLIVER, E. A.; SCHWARTZ, L.; WARREN, L. H. Occupational leukoderma. **JAMA Dermatology**, v. 42, n. 6, p. 993-1014, 1939.

PAEGELOW, I. et al. Release of cytokines from isolated lung strips by bradykinin. **Inflamm Res**, v. 44, p. 306–311, 1995.

PALERMO, B. et al. Specific cytotoxic T lymphocyte responses against Melan-A/MART1, tyrosinase and gp100 in vitiligo by the use of major histocompatibility complex/peptide tetramers: the role of cellular immunity in the etiopathogenesis of vitiligo. **J Invest Dermatol.** v. 117, n. 2, p. 326-32, 2001.

PARK, H. Y. et al. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. **Cell Mol Life Sci**, v. 66, n. 9, p.1493-506, 2009.

PATEL, A. B.; KUBBA, R.; KUBBA, A. Clinicopathological correlation of acquired hypopigmentary disorders. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 79, n. 3, p. 376-82, 2013.

PESQUERO, J. B. et al. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 14, p. 8140–8145, 2000.

PIETROVSKI, E. F. et al. B1 and B2 kinin receptor participation in hyperproliferative and inflammatory skin processes in mice. **Journal of Dermatological Science**, v. 64, p. 23–30, 2011.

PILLAIYAR, T.; MANICKAM, M.; JUNG, S. Recent development of signaling pathways inhibitors of melanogenesis, **Cellular Signalling**, v. 40, p. 99-115, 2017a.

PILLAIYAR, T.; MANICKAM, M.; JUNG, S-H. Downregulation of melanogenesis: drug discovery and therapeutic options. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 2, 2017b.

PILLAIYAR, T, et al. Inhibitors of Melanogenesis: An Updated Review. **J. Med. Chem.**, v. 61, p. 7395–7418, 2018.

PLENDL, J. et al. Expression of Tissue Kallikrein and Kinin Receptors in Angiogenic Microvascular Endothelial Cells. **Biol. Chem.**, v. 381, p. 1103 — 1115, 2000.

RAPOSO, G.; MARKS, M. S. Melanosomes — dark organelles enlighten endosomal membrane transport. **Nature reviews | molecular cell biology.**, v. 8, p. 786 — 797, 2007.

REES, J. L. Genetics Of Hair And Skin Color. **Annu. Rev. Genet.**, v. 37, p. 67–90, 2003.

REGOLI, D.; BARABE, J. Pharmacology of Bradykinin and related kinins. **The american Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 32, p. 1–46, 1980

REZAEI, N. et al. Autoimmunity as an aetiological factor in vitiligo. **JEADV**, 2007.

RICHMOND, J. M. et al. Keratinocyte-Derived Chemokines Orchestrate T-Cell Positioning in the Epidermis during Vitiligo and May Serve as Biomarkers of Disease. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 137, n. 2, p. 350-358, 2017.

RIDING, R. L.; RICHMOND, J. M.; HARRIS, J. E. Mouse Model for Human Vitiligo. **Current Protocols in Immunology**, v. 124, n. 5, p. 139–148, 2019.

ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W.T.; RSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma

globulin by snake venoms and by trypsin. **Am. J. Physiol.**, v. 156, p. 261-173, 1949.

RODRIGUES, M. et al. New discoveries in the pathogenesis and classification of Vitiligo, v. 77, p. 1-13, 2017.

RORDAM, O. M.; LENOUVEL, E. W.; MAALO, M. Successful treatment of extensive vitiligo with monobenzene. **The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, v. 5, n. 12, p. 36–39, 2012.

ROUFOSSE, F. Targeting the Interleukin-5 Pathway for Treatment of Eosinophilic Conditions Other than Asthma. **Front. Med.**, v. 5, 2018.

SANDOVAL-CRUZ, M. et al. Immunopathogenesis of vitiligo. **Autoimmunity Reviews**, v. 10, p. 762–765, 2011.

SCHACHTER, M.; THAIN, E. M. Chemical and pharmacological properties of the potent, slow contracting substance (kinin) in wasp venom. **British journal of pharmacology and chemotherapy**, v. 9, n. 3, p. 352–359, 1954.

SCHALLREUTER, K. U.; WOOD, J. M.; BERGER, J. Low catalase levels in the epidermis of patients with vitiligo. **J Invest Dermatol.**, v. 97, n. 6, p. 1081-1085, 1991.

SCHREMMER-DANNINGER, E. et al. Identification and occurrence of mRNAs for components of the kallikrein–kinin system in human skin and in skin diseases. **Immunopharmacology**, v. 43, p. 287–91, 1999.

SCHREMMER-DANNINGER, E. et al. Autoradiographic localization and characterization of bradykinin receptors in human skin. **European Journal of Pharmacology**, v. 283, p. 207-216, 1995

SCHWEIKARDT, T. et al. A three-dimensional model of mammalian tyrosinase active site accounting for loss of function mutations. **Pigment Cell Res.**, v. 20, p. 394–40, 2007.

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

SERRE, C.; BUSUTTIL, V.; BOTTO, J-M. Intrinsic and extrinsic regulation of human skin melanogenesis and pigmentation. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 40, p. 328–347, 2018.

SHOENFELD, N.; AMITAL, H.; SHOENFELD, Y. The effect of melanism and vitamin D synthesis on the incidence of autoimmune disease. **Nature Clinical Practice Rheumatology**, v. 5, n. 2, p. 99-105, 2009.

SINGH, M. et al. Interleukin 1- α : A Modulator of Melanocyte Homeostasis in Vitiligo. **Biochem Anal Biochem**, v. 5, n. 2, p 1-7, 2016.

SINGH, S.; SINGH, U.; PANDEY, S. S. Serum concentration of IL-6, IL-2, TNF- α , and IFN γ in Vitiligo patients. **Indian J Dermatol**, v. 57, n. 1, p. 12-4, 2012.

SOLEY, B. S. et al. Kinin receptors in skin wound healing. **J Dermatol Sci**, v. 82 n. 2, p. 95-105, 2016.

SOLEY, B.S. et al. B1 and B2 kinin receptor blockade improves psoriasis-like disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 177, n. 1, p. 3535–3551, 2020.

SOUZA, P. et al. IL-4 inhibits kinin receptors expression. **Br J Pharmacol**, v.169, p, 400-412, 2013.

SPEECKAERT, R. et al. Biomarkers of disease activity in vitiligo: A systematic review. **Autoimmunity reviews**, 16, n. 9, p. 937–945, 2017.

SUSHAMA, S, et al. Cytokine profile (IL-2, IL-6, IL-17, IL-22, and TNF- α) in vitiligo—New insight into pathogenesis of disease. **J Cosmet Dermatol.**, v. 18,p. 337-341, 2019.

TAIEB, A. Vitiligo as an inflammatory skin disorder: a therapeutic perspective. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 25, n. 1, p. 9–13., 2011.

TAÏEB, A.; PICARDO, M. Vitiligo. **The new england journal of medicine**, v. 360, p. 160-169, 2009.

TALBOT, S.; LIN, J.; COUTURE, R. Kinin Receptors. p. 1519-1526, 2013

TARLÉ, R. G.; MIRA, M. T. Vitiligo - Part 1. **An Bras Dermatol.**, v. 89, n. 3, p. 461-470, 2014.

TOOSI, S. et al. Vitiligo-inducing phenols activate the unfolded protein response in melanocytes resulting in upregulation of IL6 and IL8. **J Invest Dermatol**, v. 132, n. 11, p. 2601-2609, 2012

TSCHÖPE, C.; HERINGER-WALTHER, S.; WALTHER, T. Regulation of the kinin receptors after induction of myocardial infarction: A mini-review. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 6, p. 701–708, 2000.

VAN DEN BOORN, J. G. et al., Autoimmune Destruction of Skin Melanocytes by Perilesional T Cells from Vitiligo Patients. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 129, p. 2220–2232, 2009.

VAN DEN BOORN, J. G., et al. Skin-Depigmenting Agent Monobenzene Induces Potent T-Cell Autoimmunity toward Pigmented Cells by Tyrosinase Haptenation and Melanosome Autophagy. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, p. 1240–1251, 2011.

VAN DEN WIJNGAARD, R. et al. Local immune response in skin of generalized vitiligo patients. Destruction of melanocytes is associated with the prominent presence of CLA⁺ T cells at the perilesional site. **Lab Invest**, v. 80, n. 8, p. 1299-309, 2000.

WANG, W. et al. (2019). Bradykinin promotes proliferation, migration, and invasion of cervical cancer cells through STAT3 signaling pathways. **Oncology Reports**, v. 42, n. 6, p. 2521–2527, 2019.

WANG, C. Q. F., et al. Th17 cells and activated dendritic cells are increased in vitiligo lesions. **Plos One**, v. 6, n. 4, p. 18907, 2011.

WESTERHOF, W.; D'ISCHIA, M. Vitiligo puzzle: the pieces fall in place. **Pigment Cell Res.**, v. 20, p. 345-359, 2007.

WESTERMANN, D. et al. Doxorubicin cardiomyopathy-induced inflammation and apoptosis are attenuated by gene deletion of the kinin B1 receptor. **Biol. Chem.**, v.389, n. 6, p. 713-718, 2008.

WOLNICKA-GLUBISZ, A.; DE FABO, E.; NOONAN, F. Functional melanocortin 1 receptor Mc1r is not necessary for an inflammatory response to UV radiation in adult mouse skin. **Experimental Dermatology**, v. 22, n. 3, p. 226-228, 2013.

WONG, M. K. S. Bradykinin. In: Takei, I; Ando, H.; Tsutsui, K. (eds) Handbook of Hormones. **Academic press**, p. 274 – 279, 2016.

WONG, M. K. S. Kininogen. *Handbook of Hormones*, 268–e30A–3, 2016.

YAMAMOTO, T.; TSURUTA, J.; KAMBARA, T. Interstitial-tissue localization of high-molecular-weight kininogen in guinea-pig skin. **Biochim Biophys Acta**, v. 916, p. 332–42, 1987.

YAO, L. et al. Subtoxic levels hydrogen peroxide-induced expression of interleukin-6 by epidermal melanocytes. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 304, p. 831–838, 2012.

YONES, S. S. et al. Randomized double-blind trial of treatment of vitiligo efficacy of psoralen-UV-A therapy vs Narrowband UV-B therapy. **Arch Dermatol**, v. 143, n. 5, p. 578–84, 2007.

YU, H. S. et al. Alterations in IL- 6, IL-8, GM-CSF, TNF-a, and IFN-I' Release by Peripheral Mononuclear Cells in Patients with Active Vitiligo. **The Society for Investigative Dermatology**, v. 4, p. 527-529, 1997.

ZHU, Y.; WANG, S.; XU, A. A mouse model of vitiligo induced by monobenzene. **Experimental Dermatology**, v. 22, n. 7, p. 499–501, 2013.

ZUBAIR, R.; HAMZAVI, I. H. Phototherapy for Vitiligo. **Dermatologic Clinics**, v. 38, n. 1, p. 55-62, 2020.