

PUCRS

ESCOLA DE CIÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

PRISCILLA BATISTA PAIL

**O PAPEL DOS RECEPTORES B<sub>1</sub> E B<sub>2</sub> DE CININAS NO MODELO DERMATITE ATÓPICA  
INDUZIDA POR OXAZOLONA EM CAMUNDONGOS**

Porto Alegre  
2019

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE CIÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

PRISCILLA BATISTA PAIL

**O PAPEL DOS RECEPTORES B<sub>1</sub> E B<sub>2</sub> DE CININAS NO MODELO DERMATITE  
ATÓPICA INDUZIDA POR OXAZOLONA EM CAMUNDONGOS**

Porto Alegre

2019

PRISCILLA BATISTA PAIL

**O PAPEL DOS RECEPTORES B<sub>1</sub> E B<sub>2</sub> DE CININAS NO MODELO DERMATITE  
ATÓPICA INDUZIDA POR OXAZOLONA EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada como requisito para a obtenção  
do título de Doutor pelo Programa de Pós-  
Graduação em Biologia Celular e Molecular da  
Escola de Ciências da Pontifícia Universidade  
Católica do Rio Grande do Sul

Orientadora: Prof. Maria Martha Campos

Porto Alegre

2019

## Ficha Catalográfica

P143p Pail, Priscilla Batista

O papel dos receptores B1 e B2 de cininas no modelo de dermatite atópica induzida por oxazolona em camundongos / Priscilla Batista Pail . – 2019.

99 f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Martha Campos.

1. Dermatite atópica. 2. cininas. I. Campos, Maria Martha. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Bibliotecária responsável: Salete Maria Sartori CRB-10/1363

PRISCILLA BATISTA PAIL

**O PAPEL DOS RECEPTORES B<sub>1</sub> E B<sub>2</sub> DE CININAS NO MODELO DERMATITE  
ATÓPICA INDUZIDA POR OXAZOLONA EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada como requisito para a obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Escola de Ciências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Maurício Reis Bogo

---

Prof. Dra. Alessandra Hubner de Souza

---

Prof. Dra. Nadja Schoder

Porto Alegre

2019

*Dedico esse trabalho aos pilares da minha vida, a minha família, que sempre se orgulharam,  
me apoiaram e, principalmente, me amaram incondicionalmente.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força durante esses quatro anos. Acredito que o apoio e a luz que recebi veio através de todas as pessoas que Ele colocou em meu caminho.

A minha família por sempre me ouvirem e ficarem ao meu lado. Desde pequena fui ensinada a fazer as coisas com cuidado e que não importava a situação, eles sempre estariam junto para me ajudar. Todas as palavras de conforto me impulsionaram a realizar as tarefas que surgiam e a solidariedade prestada me incentivam a concluir. O amor que temos não pode ser explicado, ele é apenas sentido e por isso mesmo é simplesmente lindo.

Agradeço a minha orientadora, Maria Martha Campos, uma das pessoas mais brilhantes e dedicadas que já conheci. Em uma obra de Hiromu Arakawa, *Fullmetal Alchemist*, o autor diz: “transformar o simples em complicado é fácil, porém, transformar o complicado em simples exige criatividade”. Essa citação consegue explicar a beleza dos ensinamentos de uma professora que ama lecionar. Durante os seis anos que me orientou, agradeço por tudo que o que aprendi, lições sobre farmacologia e, principalmente, sobre a vida, que levarei para a vida inteira.

Agradeço as minhas coautoras, meu braço direito e esquerdo, Gabriela W. Neculqueo e Giovana P. Maccari, por todo o auxílio que me prestaram durante o doutorado. Tenho certeza que essas duas meninas extremamente especiais terão lindo futuro tamanha é a dedicação, bondade e a inteligência de ambas.

Aos meus queridos amigos Ana Paula A. Dagnino, Raquel D. S. Freitas e Pedro Chagastelles, agradeço do fundo do meu coração pela ajuda ao longo desses anos. A rotina de laboratório é difícil e essas três pessoas abençoadas tornaram os meus dias mais coloridos. Agradeço pelos experimentos que realizamos, mas, principalmente, agradeço por todo o carinho que desenvolvemos uns pelos outros. Obrigada!

Agradeço a todos os meus colegas e amigos do Instituto de Toxicologia que conheci ao longo desses anos. Uma equipe admirada por outros devido a nossa união e parceria. Amigos que sempre tiveram disponibilidade para me ajudar e me ouvir, assim como sentiram a confiança de fazerem o mesmo quando precisavam.

Agradeço a técnica Janaína Pasetti Nunes do laboratório de Patologia da PUCRS por toda a ajuda durante o doutorado.

Agradeço aos funcionários do Instituto de Toxicologia por todo o auxílio durante todos esses anos que estou no laboratório.

Aos funcionários do Centro de Modelos Biológicos Experimentais, meus mais sinceros agradecimentos por toda a ajuda.

Ao Samuel Greggio e Gianina T. Venturin agradeço pelo auxílio durante os experimentos realizados no Instituto do Cérebro e por todas as conversas que tornaram esse período mais leve.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de estudos concedida.

Agradeço as minhas amigas leais Gabriela de Farias, Fabiane Nitzke e Jéssica Gabriele por todo o apoio e, acima de tudo, paciência durante esse período. Obrigada por todo o carinho e por todos os abraços afetuosos.



*O mundo era para mim um segredo que eu desejava decifrar. Entre as mais antigas sensações de que posso me lembrar estão a curiosidade, a pesquisa dedicada para aprender as leis ocultas da natureza e uma felicidade equivalente ao júbilo quando elas se revelavam a mim.*

***Mary Shelley - Frankenstein***

## RESUMO

A dermatite atópica é uma doença de caráter crônico caracterizada por inflamação recorrente do tecido tegumentar, com intensa sensação pruriginosa. Essa alteração cutânea afeta um grande número de crianças e adultos em todo o mundo. A participação dos receptores de cininas foi demonstrada em diferentes modelos de prurido agudo e crônico em camundongos. Assim, justifica-se o desenvolvimento de novas pesquisas para elucidar o papel dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> em diferentes doenças dermatológicas. O presente trabalho teve como objetivo verificar o possível envolvimento dos receptores de cininas, B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, no modelo de dermatite atópica induzida por oxazolona, bem como avaliar o seu papel no modelo de prurido agudo induzido pelo peptídeo liberador de gastrina (GRP), considerado um mediador seletivo da transmissão pruriginosa espinhal. Os dados obtidos indicam que a dermatite atópica induzida por oxazolona promoveu aumento da expressão dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de cininas na pele com redução de ambos os receptores no gânglio da raiz dorsal (DRG). Por outro lado, a dermatite atópica induzida por oxazolona não modificou a expressão dos receptores cininérgicos em nível espinhal ou cerebral. Houve uma redução parcial dos acessos de coceira nos animais com dermatite atópica que receberam tratamento crônico, pela via intraperitoneal (i.p.), com o antagonista seletivo do receptor B<sub>2</sub> de cininas, o HOE140 (50nmol/kg). Também o antagonista seletivo do receptor B<sub>1</sub>, o R715 (438nmol/kg), não modificou esse parâmetro. O tratamento agudo pela via sistêmica (nas mesmas doses descritas acima) não reverteu os acessos de coceiras no grupo com dermatite atópica induzida por oxazolona. Ademais, a administração local, por via intradérmica (i.d.) de R715 (30nmol/sítio) ou HOE 140 (3nmol/sítio) não foi capaz de alterar o prurido induzido por oxazolona. No que se refere à avaliação histológica, a indução de dermatite atópica causou um aumento da espessura da camada córnea, da epiderme e da derme, o que é um indicativo do processo de liquenificação típico da doença. No entanto, o tratamento crônico, pela via sistêmica, com os antagonistas seletivos dos receptores de cininas não foi capaz de reverter esses parâmetros. De maneira interessante, o tratamento local com R715 ou HOE140 (via i.d.) reduziu de forma marcante o número de histiócitos no sítio de lesão. O grupo com dermatite atópica tratado com HOE140 (i.d.), entretanto, apresentou aumento significativo no número de eosinófilos na pele. A expressão da metaloproteinase ADAMTS5 foi avaliada na pele dos animais com dermatite atópica. Apenas o grupo que recebeu tratamento crônico com HOE140, pela via i.p., apresentou redução na expressão dessa metaloproteinase. No modelo de prurido agudo induzido pela aplicação intratecal (i.t.) de GRP, o tratamento sistêmico com R715

(876nmol/kg) reduziu os acessos de coceira dos animais. Já, o tratamento com o R715 na dose mais baixa (438nmol/kg) ou com o HOE140 (nas doses de 25 e 50nmol/kg) não reverteu o comportamento de coçar. Para avaliação do sítio de ação, os antagonistas dos receptores de cininas foram coadministrados com GRP (via intratecal). A dose mais alta do HOE140 (30pmol/sítio) foi capaz de reverter o prurido nesses animais; o tratamento com o R715 (25 e 50nmol/sítio) e a dose mais baixa de HOE140 (10pmol/sítio) não modificaram esse parâmetro. A avaliação da atividade em regiões cerebrais dos animais tratados com GRP foi realizada por meio de tomografia por emissão de pósitrons. Essa análise não revelou modificações significativas entre o grupo tratado com GRP e o grupo controle. Por fim, foi verificado se o tratamento crônico com o antagonista do receptor do GRP (GRPR), o PD176252 (5mg/kg; i.p.), poderia modificar a expressão dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de cininas na pele de animais com dermatite atópica induzida por oxazolona. A análise não revelou qualquer modificação na expressão dos receptores de cininas nesse tecido. Em conjunto, os dados do presente estudo confirmam e estendem as evidências acerca da papel dos receptores de cininas na transmissão pruritogênica, aguda ou crônica, indicando a relevância do sistema cininas na patofisiologia da dermatite atópica. Estudos adicionais são necessários a fim de avaliar os efeitos de diferentes protocolos de tratamento com os antagonistas de cininas no modelo de dermatite atópica induzido por oxazolona, investigando mecanismos adicionais implicados nessa doença, incluindo a medida de citocinas pró-inflamatórias, a caracterização da migração de células por citometria de fluxo, além da relação entre o GRP e os receptores das cininas nesse cenário.

## ABSTRACT

Atopic dermatitis is a chronic inflammatory skin disorder featured by recurrent eczematous lesions and intense pruritus. It affects a great number of children and adults worldwide, greatly affecting the life quality of affected individuals. The participation of kinin receptors has been previously demonstrated in different mouse models of itching, justifying further investigations on the relevance of these receptors in models of chronic skin inflammatory diseases. This study evaluated the role of kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors in the pre-clinical mouse model of oxazolone-induced atopic dermatitis. Moreover, we have also investigated the implication of kinin receptors in the acute mouse model of pruritus induced by gastrin-releasing peptide (GRP), a selective mediator of spinal pruritus transmission. The B<sub>1</sub> R715 or B<sub>2</sub> HOE140 receptor antagonists were dosed at different schemes of treatment. After assessment of clinical lesion scores and pruritus, lesional skin samples were collected for histopathological analysis. The plasma extravasation and the expression of the metalloproteinase ADAMTS5 were also assessed. The immunopositivity for kinin receptors was evaluated in skin, dorsal root ganglion (DRG), thoracic spinal cord and brain cortex sections. A marked upregulation of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors was observed in the skin of oxazolone-treated mice. The induction of atopic dermatitis led to a downregulation of both receptors in the DRG, without any alteration in the spinal cord and cortex. The repeated administration of HOE140 (50nmol/kg; i.p.) partially inhibited the oxazolone-related pruritus, associated with a reduction of ADAMTS5 immunolabelling in the skin. Alternatively, R715 (438nmol/kg; i.p.) produced a mild inhibition of plasma extravasation in oxazolone-challenged mice. Noteworthy, the repeated i.d. injection of R715 (30nmol/site) or HOE140 (3nmol/site) significantly reduced the histiocyte numbers, according to the histopathological analysis. Either B<sub>1</sub> or B<sub>2</sub> kinin antagonists, irrespective of the protocol of treatment, did not alter any other evaluated clinical or histological parameters. In the mouse model of acute pruritus induced by the intrathecal (i.t.) injection of GRP, the systemic treatment with R715 (876nmol/kg) significantly reduced the scratching bouts. Alternatively, the treatment with R715 at a lower dose (438nmol/kg), or with HOE140 (25 e 50nmol/kg) did not affect GRP-induced pruritus. To analyze the possible site of action, the kinin antagonists were also co-injected with GRP by i.t. route. The co-treatment with HOE140 (30pmol/site) was able to prevent the itching behavior elicited by GRP, whereas R715 (25 e 50nmol/site) or a lower dose of HOE140 (10pmol/site) did not change this parameter. Evaluation of brain activation by positron emission tomography did not reveal any significant differences between vehicle-

and GRP-treated mice. We also evaluated whether the pre-treatment with the selective GRP receptor antagonist PD176252 (5mg/kg; i.p.) might prevent the upregulation of B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> receptors in the skin of mice with atopic dermatitis. No alteration was observed in this experimental set. Altogether, the present data confirm and extend previous evidence on the relevance of kinin receptors in either acute or chronic pruritogenic transmission, indicating a role for the kinin system in atopic dermatitis. Additional studies are necessary to evaluate the effects of long-term protocols of treatment with kinin antagonists in the mouse model of atopic dermatitis evoked by oxazolone. It is also relevant to further investigating other mechanisms implicated in atopic dermatitis, including the assessment of cytokine levels, besides a detailed cell characterization by flow cytometry. Future studies should be also focused on the relationship between GRP and kinin receptors in atopic dermatitis.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE - enzima conversora de angiotensina  
BK - bradicinina  
CD - células dendríticas  
CGRP - peptídeo regulador do gene da calcitonina  
CFA - adjuvante completo de Freund  
COX-2 - cicloxigenase-2  
DCP - difenilciclopropenona  
eCB - canabinoides endógenos  
ERK1/2 - quinase regulada por sinal extracelular  
ET-1 - endotelina-1  
GRP - peptídeo liberador de gastrina  
GRPR - receptor do peptídeo liberador de gastrina  
H<sub>1</sub>R - receptor de histamina tipo 1  
H<sub>4</sub>R - receptor de histamina tipo 4  
ILC2 - células linfoides inatas tipo 2  
IP<sub>3</sub> - inositol (1,4,5) trifosfato  
KOR - receptores opioides  $\kappa$   
LTB<sub>4</sub> - leucotrieno B<sub>4</sub>  
MAPK - quinases ativadas por mitógenos  
MMP-9 - metaloproteinase-9  
MOR1D - receptor  $\mu$ -opioide  
MPO - mieloperoxidase  
Mrgprs - receptores acoplados à proteína G relacionados com Mas  
NF- $\kappa$ B - fator nuclear- $\kappa$ B  
NGF - fator de crescimento do nervo  
NK1 - neurocinina-1  
NT-4 - neurotrofina 4  
PAR-2 - receptores ativados por proteases-2  
PAR-4 - receptores ativados por proteases-4  
PGD - prostaglandina D  
PI3K - fosfatidilinositol-3-quinase  
PKC $\epsilon$  - proteína cinase C $\epsilon$   
PLA<sub>2</sub> - fosfolipase A<sub>2</sub>  
PLC $\beta$ 3 - fosfolipase C- $\beta$ 3  
SLIGRL-NH<sub>2</sub> - Ser-Leu-Ile-Gly-Arg-Leu  
SNC - sistema nervoso central  
SP - substância P  
TLR7 - receptor Toll-like 7  
TNF - fator de necrose tumoral  
TRPV1 - receptor de potencial transitório vaniloide do tipo 1  
TSLP - linfopoetina estromal do timo  
TXA<sub>2</sub> - tromboxano A<sub>2</sub>  
VIP - peptídeo intestinal vasoativo

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Capítulo 01

Figura 1 - Prevalência global da dermatite atópica .....	18
Figura 2 - Padrão de localização da dermatite atópica .....	19
Figura 3 - Manifestações clínicas da dermatite atópica.....	20
Figura 4 - Modificações celulares presentes na fase inicial e tardia da dermatite atópica .....	21
Figura 5 - Modelos para a codificação da coceira .....	27
Figura 6 - Esquema de interação neuronal da dor e da coceira .....	30
Figura 7 - Células e moléculas associadas à coceira na pele.....	31
Figura 8 - Esquema das células envolvidas na detecção de diversos estímulos de prurido .....	32
Figura 9 - Células imunes, terminações nervosas e receptores envolvendo a coceira .....	34
Figura 10 - Representação esquemática do sistema calicreína-cininas .....	39
Figura 11 - Vias de sinalização vinculadas ao receptor B <sub>1</sub> .....	41
Figura 12 - Localização do extravasamento de líquido em disfunções cutâneas .....	43
Figura 13 - Manifestação da urticária e do angioedema.....	44
Figura 14 - Mecanismo de ação de substâncias utilizadas no tratamento de angioedema .....	46

### Capítulo 03

Figura 1 - Acessos de coceira em modelo de prurido agudo induzido por GRP.....	66
Figura 2 - Expressão cutânea dos receptores B <sub>1</sub> e B <sub>2</sub> de cininas após o tratamento crônico com PD176252 (5mg/kg) .....	70
Figura 3 - Atividade neural após o tratamento com GRP.....	72

## SUMÁRIO

Capítulo I.....	17
1.1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1.1. DERMATITE ATÓPICA.....	18
1.1.2 MODELO DE DERMATITE ATÓPICA INDUZIDO POR OXAZOLONA.....	23
1.1.3 PRURIDO.....	24
1.1.4 SISTEMA CININÉRGICO .....	38
1.2 OBJETIVOS.....	47
1.2.1 OBJETIVO GERAL.....	47
1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	47
Capítulo II.....	49
2.1 MANUSCRITO.....	50
2.2 RESULTADOS ADICIONAIS.....	52
Capítulo III .....	74
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	78
ANEXOS .....	88



## **Capítulo I**

---

### **1.1 Introdução**

1.1.1 Dermatite atópica

1.1.2 Modelo de dermatite atópica induzido por oxazolona

1.1.3 Prurido

1.1.4 Sistema cininérgico

### **1.2 Objetivos**

1.2.1 Objetivo Geral

1.2.2 Objetivos Específicos

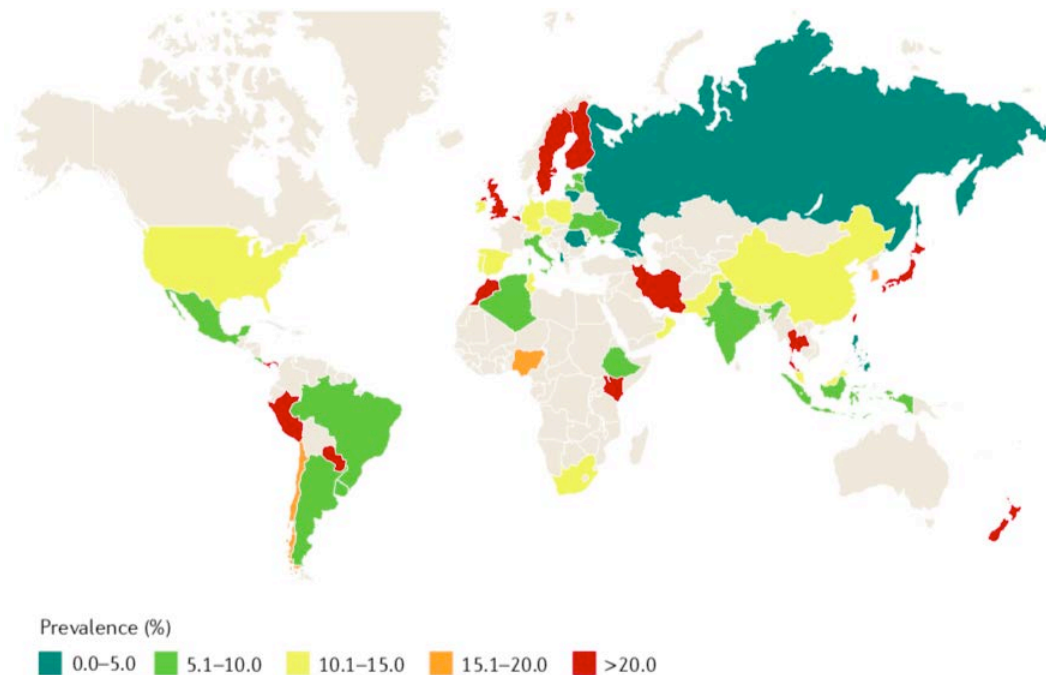
---

## 1.1 INTRODUÇÃO

### 1.1.1. DERMATITE ATÓPICA

A dermatite atópica é uma doença de caráter crônico que apresenta inflamação do tecido tegumentar, com intensa sensação pruriginosa. Essa alteração cutânea afeta até 20% de crianças e, embora tenha uma tendência a se resolver espontaneamente, o quadro pode persistir até a vida adulta de 10% a 30% dos casos<sup>1-3</sup>. Na figura 1, é mostrada a prevalência da dermatite atópica ao longo da vida de crianças de 13-14 anos de idade<sup>4</sup>. Entretanto, novos dados estimam que até 10% dos adultos podem ser acometidos pela dermatite atópica, o que compreende aproximadamente 230 milhões de pessoas no mundo<sup>4,5</sup>.

**Figura 1** – Prevalência global da dermatite atópica



Prevalência da dermatite atópica ao longo da vida de crianças de 13-14 anos de idade segundo o relatório dos responsáveis. *Publicação da imagem autorizada pela revista (número da licença: 4480900318460)*<sup>4</sup>.

A dermatite atópica pode afetar qualquer parte do corpo, em especial nos lactentes (Figura 2) e, conforme o crescimento do indivíduo acometido, a mesma tende a se manifestar

em regiões com dobras cutâneas. Nos sítios das lesões, a pele se torna avermelhada e ressecada (xerose), podendo desenvolver escamação, exsudação, pápulas e vesículas, além de liquenificação (Figura 2A-E)<sup>6</sup>.

**Figura 2** – Padrão de localização da dermatite atópica



- (1) Em lactentes, a dermatite atópica manifesta-se principalmente na face e nas superfícies dos membros superiores e inferiores, podendo atingir o tronco; (B) a partir de 1 a 2 anos de idade, as lesões manifestam-se em locais com dobras cutâneas; (C) em adolescentes e adultos, além dos locais com dobras cutâneas, podem surgir lesões na parte superior do tronco, nos ombros, mãos e o couro cabeludo. *Publicação da imagem autorizada pela revista (número da licença: 4480900065456)*<sup>6</sup>.

Algumas pessoas podem apresentar outras manifestações, tais como a hiperlinearidade das palmas das mãos e solas dos pés, as linhas de Dennie-Morgan e o sinal de Herthoge

(Figura 3F-H)<sup>4,6,7</sup>. Logo, devido às manifestações no tecido e ao grande desconforto causado por essas, a dermatite atópica afeta negativamente a qualidade de vida dos indivíduos acometidos<sup>3</sup>.

**Figura 3** – Manifestações clínicas da dermatite atópica



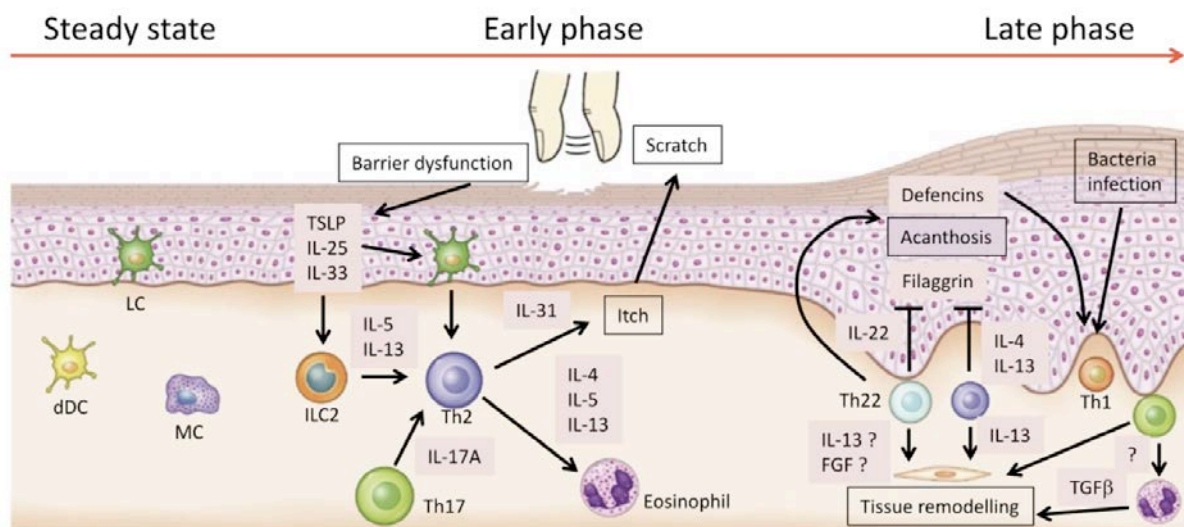
Aspecto tegumentar de uma (A) pele saudável; (B) pele com dermatite atópica não lesionada, apenas associada com o quadro de xerose; (C) fase aguda da dermatite atópica caracterizada por manchas eritematosas difusas e exsudação papulovesiculosa; (D) fase subaguda da dermatite atópica com a presença de lesões avermelhadas, secas e escamosas; (E) fase crônica da dermatite atópica com a presença de lesões pouco demarcadas, placas escamosas, escoriação e liquenificação. Na figuras F-H, estão representadas outras disfunções relacionadas à dermatite atópica, como (F) hiperlinearidade das palmas das mãos, (G) as linhas de Dennie-Morgan, as quais são caracterizadas por apresentarem dobras simples ou duplas sob as pálpebras inferiores e, (H) o sinal do Herthoge, que consiste no afinamento ou ausência da porção lateral das sobrancelhas. *Publicação da imagem autorizada pela revista (número da licença: 4480900065456)*<sup>6</sup>.

No que se refere à patofisiologia da dermatite atópica, essa apresenta uma disfunção na barreira cutânea e uma ativação complexa do sistema imune. As alterações observadas na barreira da pele estão relacionadas a modificações da filagrina, sendo essa proteína relacionada com a integridade do tecido tegumentar, reduzindo a adesão celular entre os queratinócitos, afetando também a hidratação do tecido. Essa disfunção, conseqüentemente,

torna a pele mais susceptível às agressões exógenas, podendo agravar o quadro inflamatório<sup>1,8</sup>.

Na fase inicial da dermatite atópica, os queratinócitos presentes no sítio da lesão liberam diversos mediadores inflamatórios em resposta aos estímulos endógenos e exógenos (Figura 4). Agressões provocadas por traumas físicos, como o ato de coçar ou, em resposta a agentes alergênicos, como substâncias irritantes, induzem a secreção de linfopoetina estromal do timo (TSLP) e, interleucinas (IL)-25 e 33. Essas moléculas, por sua vez, irão modular as células dendríticas (CD) e células linfoides inatas tipo 2 (ILC2), que promoverão uma resposta mediada por Th2<sup>1,9</sup>.

**Figura 4** – Modificações celulares presentes na fase inicial e tardia da dermatite atópica



Fase inicial e tardia da dermatite atópica. O evento inicial da dermatite atópica ocorre pela disfunção da barreira cutânea, que pode ser causada por fatores intrínsecos e extrínsecos. Com isso, ocorre a entrada de agentes alergênicos na pele, estimulando os queratinócitos a liberarem citocinas, tais como a TSLP, IL-25 e IL-33. Essas citocinas estimulam as ILC2s a produzirem IL-5 e IL-13 que, por sua vez, ativam as células Th2. A TSLP aumenta a maturação de células dendríticas e células de Langerhans CD11<sup>+</sup>, que irão estimular as células Th2. A IL-25 é uma citocina da família da IL-17 e pode ampliar a resposta imune tipo Th2, por ligação da IL-17B a seu receptor, que é expresso em células ILC2, iNKT e Th2. A IL-33 é um membro da família da IL-1 e liga-se ao IL1RL1, que é altamente expresso em células ILC2, Th2 e mastócitos. Na fase tardia da doença, a pele se torna mais espessa e avermelhada em virtude da inflamação crônica e do atrito constante devido ao ato de coçar. O infiltrado celular inflamatório se torna complexo nessa fase. A IL-22 é uma citocina que atua nas

células epidérmicas, incluindo os queratinócitos. Seu papel benéfico relaciona-se com o aumento da produção de peptídeos antimicrobianos pela epiderme, como as defensinas. Essas podem contribuir para a diferenciação de células Th1, que produzirão IFN- $\gamma$  nas lesões de fase tardia da dermatite atópica. Ademais, em resposta à IL-22, os queratinócitos apresentam intensa proliferação, resultando em hiperplasia epidérmica difusa, uma condição denominada acantose. Juntamente com a IL-4 e a IL-13 derivadas de células Th2, a IL-22 inibe a expressão de genes relacionados à barreira, como filagrina, loricrina e involucrina, tornando a pele susceptível a infecções cutâneas graves. A IL-17 induz a expressão de citocinas pró-fibróticas, tais como o fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e IL-11, pelos eosinófilos, bem como, o número de células Th17 correlaciona-se com o número de células que produzem tenascina C<sup>1</sup> e metaloproteinases-9 (MMP-9), ambas associadas com o remodelamento tecidual. *Publicação da imagem autorizada pela revista (número da licença: 4480891150309)*<sup>1</sup>.

As células ILC2 produzem as IL-5 e IL-13 que, em seguida, estimulam as células Th2 a sintetizarem a IL-31. Essa última citocina é altamente expressa em pacientes com dermatite atópica e representa um dos principais agentes pruritogênicos envolvidos na patofisiologia da doença. Ainda no ambiente inflamatório, os queratinócitos sintetizam e liberam diversas quimiocinas, tais como CCL17, CCL20, CCL27, entre outras, que ampliam a resposta mediada por linfócitos Th2<sup>1,10-12</sup>.

Na fase tardia da doença, as citocinas Th1, Th17 e Th22 são encontradas nas lesões. Nessa etapa, a pele se apresenta mais espessa, essa liquenificação relaciona-se com o atrito provocado pelo ato de coçar e com o processo inflamatório contínuo que induz a liberação de IL-22 pelas Th22 presentes nas lesões. A IL-22 atua sobre o processo mitótico de queratinócitos, resultando na acantose, bem como inibe a expressão de genes relacionados com a integridade da barreira cutânea, como o gene na filagrina. Foi ainda relatado que tanto IL-13 quanto IL-17 possuem um papel importante no remodelamento do tecido nas lesões de dermatite atópica, uma vez que estimulam os fibroblastos a sintetizarem proteínas fibrosas<sup>1,4,10</sup>.

---

<sup>1</sup> Glicoproteína adesiva da matriz extracelular

<sup>2</sup> Protease presente na *Mucuna pruriens*, cujos nomes populares incluem *cowhage* ou pó de mico.

Destaca-se que, nos quadros de dermatite atópica, o local da lesão apresenta maior inervação e mais excitabilidade, efeitos esses relacionados com a maior expressão do fator de crescimento do nervo (NGF) e redução de semaforina 3A, que promove aumento das terminações nervosas<sup>13-15</sup>. Logo a hipersensibilidade dos neurônios sensíveis à coceira pode contribuir com a intensa sensação pruriginosa, mesmo quando provocada por substâncias não pruritogênicas, como frequentemente relatado por pacientes com dermatite atópica<sup>16,17</sup>. Corroborando essa informação, foi demonstrado que pacientes com dermatite atópica apresentam coceira intensa quando expostos à histamina, substância P, serotonina e bradicinina (BK). Para essa última substância, também se observou a ocorrência de dor. De maneira interessante, a sensação dolorosa induzida pela BK no local, não suprimiu a sensação pruriginosa. Por fim, os autores apontam que a BK assim como a serotonina são potentes pruritogênicos endógenos, que atuam por vias independentes da histamina<sup>18</sup>, conforme será melhor explicado a seguir.

Considerando que a dermatite atópica apresenta uma patofisiologia complexa, os profissionais da área da saúde encontram diversas dificuldades no seu tratamento. As abordagens terapêuticas disponíveis como, por exemplo, os corticoides, agentes imunossupressores, substâncias emolientes, entre outras, nem sempre apresentam resultados satisfatórios, necessitando de mais estudos sobre o quadro<sup>19</sup>.

### 1.1.2 MODELO DE DERMATITE ATÓPICA INDUZIDO POR OXAZOLONA

A oxazolona (*4-ethoxymethylene-2-phenyl-2-oxazolin-5-one*) é uma substância utilizada para provocar lesões cutâneas que mimetizam as alterações de pele encontradas na dermatite atópica. A oxazolona é um hapteno de baixo peso molecular que modifica covalentemente as proteínas da pele, desencadeando respostas alérgicas. O modelo de dermatite atópica induzida por oxazolona pode ser realizado utilizando diferentes concentrações diluídas em acetona<sup>20-22</sup>.

Após aplicação tópica de oxazolona é possível observar espessamento das camadas da pele, esse efeito na epiderme é confirmado pelo aumento de queratina-16 (*KRT16*), um marcador de hiperplasia epidérmica. Em adição, ocorre um intenso processo inflamatório no local, aumentando as citocinas Th1 e Th2, tais como a IL-1 $\beta$ , IL-13 e IFN- $\gamma$ , bem como outros mediadores inflamatórios S100A8 e lipocalina 2<sup>23,24</sup>.

Destaca-se ainda que outras alterações importantes também são encontradas nesse modelo como, por exemplo, pele avermelhada devido à inflamação, redução de conteúdo hídrico na epiderme e na derme, aumento do prurido, aumento de IgE. Já a avaliação histológica revela que há aumento de células inflamatórias (células T e células dendríticas)<sup>24,20</sup>.

### 1.1.3 PRURIDO

O prurido é definido como uma sensação desagradável que induz ao reflexo de coçar. Essa definição foi estabelecida há 365 anos pelo o médico alemão Samuel Hafenreffer e ainda é utilizada por muitos pesquisadores<sup>16,17,25-30</sup>. O prurido pode ser induzido por estímulos mecânicos, térmicos e químicos<sup>26</sup>, além de alterações neurofisiológicas e psiquiátricas<sup>31,32</sup>. Sua manifestação pode ser aguda – por exemplo, induzida por picadas de insetos, podendo ser facilmente aliviada pelo ato de coçar – ou crônica – subdividida em quatro grupos: dermatológica, sistêmica, neuropática ou psicogênica<sup>16</sup>.

A coceira dermatológica ocorre devido a alterações cutâneas, tais como a dermatite atópica (predileção pelas áreas flexoras, regiões anterior e laterais do pescoço, pálpebras, fronte, face, punhos e dorso dos pés e das mãos), dermatite de contato por irritante (geralmente é restrita ao local de contato com a substância), psoríase (acomete principalmente o tronco, cotovelos, joelhos, região sacro-glútea, couro cabeludo, palmas das mãos e plantas do pés), xerose (tendem a ocorrer nas pernas, braços, mãos e tronco)<sup>16,33</sup>, urticária (disfunção



cutânea caracterizada por vermelhidão local, além de sensação pruriginosa, podendo se manifestar em qualquer parte do corpo)<sup>34</sup>.

O prurido sistêmico, em contraste com o prurido dermatológico, não apresenta lesão primária. Entretanto, o ato de coçar e sua intensidade provocam danos cutâneos; este tipo de prurido ocorre devido a desordens sistêmicas, que incluem doenças metabólicas e endócrinas, além de determinados tumores e infecções<sup>35</sup>, como, por exemplo, aneurismas, esclerose múltipla, doenças hepato-biliares, diabetes, entre outras<sup>28,35</sup>.

A coceira neuropática é causada por uma lesão primária ou disfunção em qualquer ponto ao longo da via aferente no sistema nervoso. Ela pode estar relacionada com tumores, aneurismas, esclerose múltipla, sensibilidade cutânea, prurido induzido por fármacos ou uso de substâncias psicoativas, entre outros. Em muitos casos, é acompanhada por parestesia, hiperestesia ou hipoestesia<sup>28,32,36</sup>.

Finalmente, o prurido psicogênico tem sua origem nas desordens psiquiátricas, tais como depressão, transtorno obsessivo-compulsivo e estresse emocional, sendo caracterizado por um impulso excessivo do ato de coçar<sup>17,32</sup>. Alguns desses tipos de prurido podem se apresentar de forma aguda, mas, em muitos casos, ocorrem de maneira crônica e persistente<sup>32</sup>.

O prurido é, possivelmente, um dos sintomas mais comuns nas doenças cutâneas, mas pode co-ocorrer com doenças não relacionadas à pele, como desordens metabólicas<sup>31</sup>. Em adição, aproximadamente um terço da população global experimenta essa sensação uma vez por semana. Entretanto, o mecanismo exato permanece desconhecido e inúmeras hipóteses têm sido desenvolvidas para tentar compreender como ocorre a transmissão da coceira<sup>28</sup>.

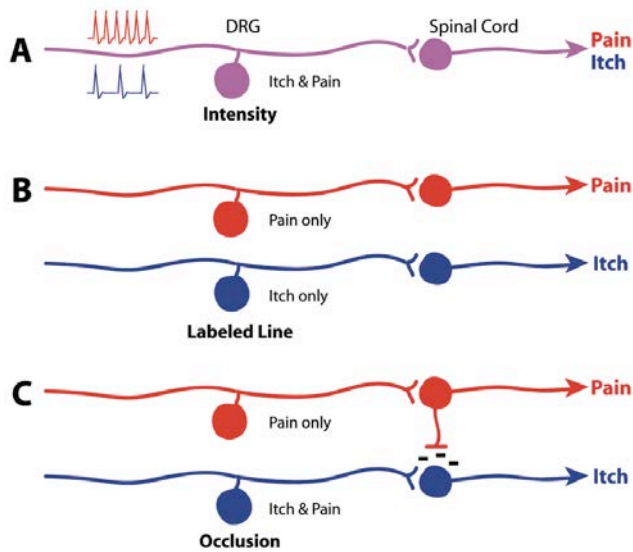
No começo do século XX, a Teoria da Intensidade foi inicialmente descrita por von Frey (1922) e Lewis et al. (1927). Esses pesquisadores postularam que os estímulos da coceira produziam respostas neuronais fracas, ao passo que estímulos dolorosos induziam forte ativação da mesma população de neurônios (Figura 5A)<sup>29</sup>. Contudo o desenvolvimento de

diversos estudos tem refutado essa hipótese. Outrossim, sabe-se que o aumento da intensidade de coceira induzida por estímulos elétricos não provoca uma sensação dolorosa, assim como a diminuição da frequência de um estímulo doloroso não acarreta em sensação pruriginosa<sup>16,37</sup>.

Foi identificada em voluntários humanos saudáveis a presença de fibras nervosas aferentes, com axônios particularmente finos e com excessivas ramificações, denominadas fibras C. Essas fibras possuem baixa velocidade de condução (em média 0,5m/s) e são ativadas por histamina. A partir desses resultados, foi proposto que, possivelmente, essas fibras poderiam mediar a sensação de coceira de forma exclusiva, sendo sugerida a Teoria da Especificidade (Figura 5B)<sup>38</sup>.

Em adição, essas fibras C são seletivas para a coceira, mas não específicas, sendo também responsivas a certos estímulos algícos. Uma vez que foi estabelecida a íntima relação entre o circuito neural do prurido e os mecanismos da dor, foi proposta a Teoria da Oclusão (Figura 5C), que sugere que nos neurônios nociceptivos existem pruriceptores, que induzem à sensação pruriginosa quando ativados. Por outro lado, a ativação de uma grande quantidade de nociceptores por estímulos nocivos ocasionaria uma oclusão da resposta pruriceptiva para produzir a sensação dolorosa (Figura 6)<sup>29,39</sup>.

**Figura 5 - Modelos para a codificação da coceira**



Modelos propostos para a transmissão de prurido. (A) A Teoria da Intensidade propõe que neurônios transmitem prurido ou dor, dependendo de a intensidade do estímulo ser baixa ou alta, respectivamente. (B) A Teoria da Especificidade propõe fibras e circuitos completamente separados para a detecção de dor e prurido. (c) A Teoria da Oclusão propõe que um grupo de neurônios dentro dos nociceptores transmite prurido quando seletivamente ativado por estímulos pruriginosos. Os estímulos nocivos levariam à ativação do grande grupo de fibras e isso inibiria a sensação do prurido. *Publicação da imagem autorizada pela revista (não houve número de licença)*<sup>29</sup>.

Atualmente, algumas moléculas que medeiam a transdução do prurido foram melhor esclarecidas (Figura 7; Tabela 1). Sabe-se que a coceira ocorre por vias histaminérgicas e vias não-histaminérgicas<sup>29</sup>. A histamina liberada pelas células do sistema imune e queratinócitos atua nos receptores de histamina tipo 1 e 4 (H<sub>1</sub>R e H<sub>4</sub>R, respectivamente), localizados nos neurônios sensoriais. O H<sub>1</sub>R é acoplado à proteína G<sub>q</sub>/G<sub>11</sub> e, após a ligação de histamina, ativa a fosfolipase C-β3 (PLCβ3), produzindo inositol (1,4,5) trifosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol. Conseqüentemente, há aumento da concentração de cálcio e ativação da proteína cinase Cε (PKCε)<sup>16,35,40</sup>. Além disso, foi demonstrado que a depleção genética da PLCβ3 diminui o comportamento de coceira induzido por histamina em camundongos<sup>41,42</sup>. Ademais, o prurido induzido pela serotonina também é mediado pela via da PLCβ3<sup>43</sup>. Por fim, destaca-se que

essa via não atua de maneira específica, uma vez que sua depleção potencializa a analgesia induzida por morfina após estimulação térmica em camundongos<sup>44</sup>.

**Tabela 1** – Principais moléculas descritas como indutoras de prurido

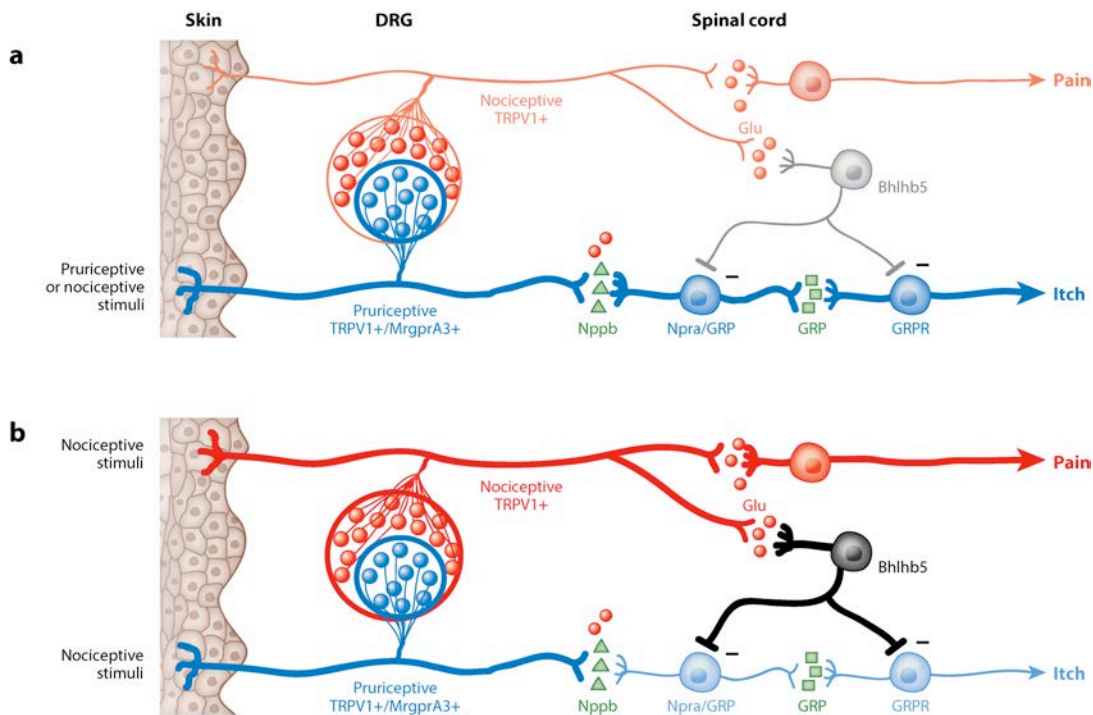
<b>Molécula indutora de prurido</b>	<b>Origem</b>	<b>Receptor</b>
Histamina	Mastócitos	H <sub>1</sub> R, H <sub>4</sub> R
BAM8-22	Clivagem proteolítica de proencefalina	MrgprC11
Cloroquina	Substância antimalárica	MrgprA3
SLIGRL-NH <sub>2</sub>	Peptídeo sintético ou clivagem proteolítica de PAR2	MrgprC11, PAR2
B-alanina	Suplemento para desenvolvimento muscular	MrgprD2
Macunaíma	<i>Cowhage</i>	PAR-2, PAR-4
Catepsina S	Células imunes e células epiteliais	PAR-2, PAR-4
Triptase	Mastócitos	PAR-2, PAR-4
Serotonina	Mastócitos	5-HT <sub>1</sub> , 5-HT <sub>2</sub>
Endotelina-1	Células endoteliais	ET <sub>A</sub>
SP	Neurônios sensoriais primários	NK1
IL-31	Principalmente linfócitos Th2	IL-31RA, OSMR
Imiquimode	Imunoestimulante sintético	TLR7 (controverso)
Ácido policitidílico	Imunoestimulante sintético	TLR3
Ácido biliar	Colestase	TGR5
Ácido lisofosfatídico	Colestase	Desconhecido
Bradicinina	Mastócitos	B <sub>2</sub>
GRP	Neurônios não-mielinizados	GRPR

*Publicação da tabela autorizada pela revista (não houve número de licença)<sup>16</sup>.*

Nos mesmos neurônios sensoriais que expressam os receptores de histamina, também há expressão do receptor de potencial transitório vaniloide do tipo 1 (TRPV1). Inúmeras evidências sugerem que o H<sub>1</sub>R exerce seu efeito através da ativação de TRPV1, induzindo a estimulação neuronal e posterior resposta pruriceptiva. Sabe-se, por exemplo, que a formação do diacilglicerol ativa a proteína cinase C (PKC), provocando a abertura dos receptores TRPV1. Em adição, o diacilglicerol pode atuar como um ligante endógeno para o TRPV1 em neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRG, do inglês *dorsal root ganglion*) em ratos. Essa informação corrobora os dados indicando que o H<sub>1</sub>R é relacionado com o TRPV1 através da sinalização da proteína G<sub>q</sub>/G<sub>11</sub> e de alguns receptores de tirosina cinase (TrkA) –

ativado pelo fator de crescimento do nervo –, ambos relacionados à via da fosfolipase C (PLC)<sup>17,25,27,43,45,46</sup>.

**Figura 6** - Esquema de interação neuronal da dor e da coceira

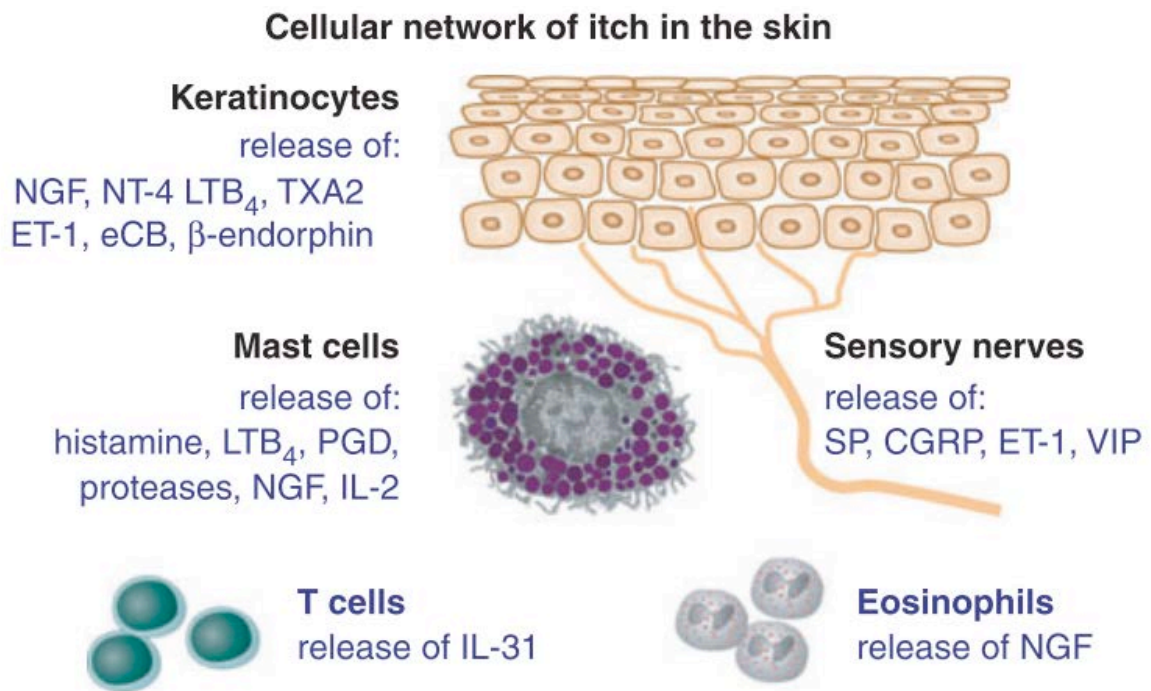


Desenho esquemático das interações entre os neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRG) e neurônios espinhais nas vias da coceira (*azul*) e da dor (*vermelho*). As linhas em negrito indicam as vias ativadas. (A) Quando neurônios pruriceptivos do DRG são seletivamente ativados por estímulos pruriceptivos ou nociceptivos (exemplo, capsaicina), a sensação da coceira é produzida. (B) Quando estímulos nociceptivos ativam ambos neurônios pruriceptivos e nociceptivos no DRG, a sensação da coceira é suprimida pelos interneurônios inibitórios espinhais e apenas a sensação de dor é produzida. Para fins desta ilustração, as fibras sensoriais de todos os neurônios do DRG foram agrupadas em uma única linha para representar os terminais periféricos e centrais. Cada população diferente de neurônios espinhais é representada por um único neurônio. O sinal de menos (-) indica a sinapse inibitória entre o interneurônio e o neurônio pruriceptivo. Publicação da imagem autorizada pela revista (não houve número de licença)<sup>16</sup>.

De forma interessante, algumas substâncias pruritogênicas endógenas – como a serotonina, a endotelina-1 e a substância P (SP) – e algumas exógenas – tais como a

macunaíma<sup>2</sup> e a cloroquina – atuam em vias não-histaminérgicas e induzem a sensação pruriginosa<sup>25,40,47,48</sup>.

**Figura 7** - Células e moléculas associadas à coceira na pele



Esquema das células e mediadores na pele associados à coceira. Indução, percepção, conservação e controle do prurido envolvem uma rede complexa de várias células e mediadores. Somente algumas células e mediadores são listados aqui. NGF, fator de crescimento do nervo; NT-4, neurotrofina 4; LTB<sub>4</sub>, leucotrieno B<sub>4</sub>; TXA<sub>2</sub>, tromboxano A<sub>2</sub>; ET-1, endotelina-1; eCB, canabinoides endógenos; PGD, prostaglandina D; IL-2, interleucina-2; SP, substância P; CGRP, peptídeo regulador do gene da calcitonina; VIP, peptídeo intestinal vasoativo. *Publicação da imagem autorizada pela revista (número da licença: 3677680386357)<sup>27</sup>.*

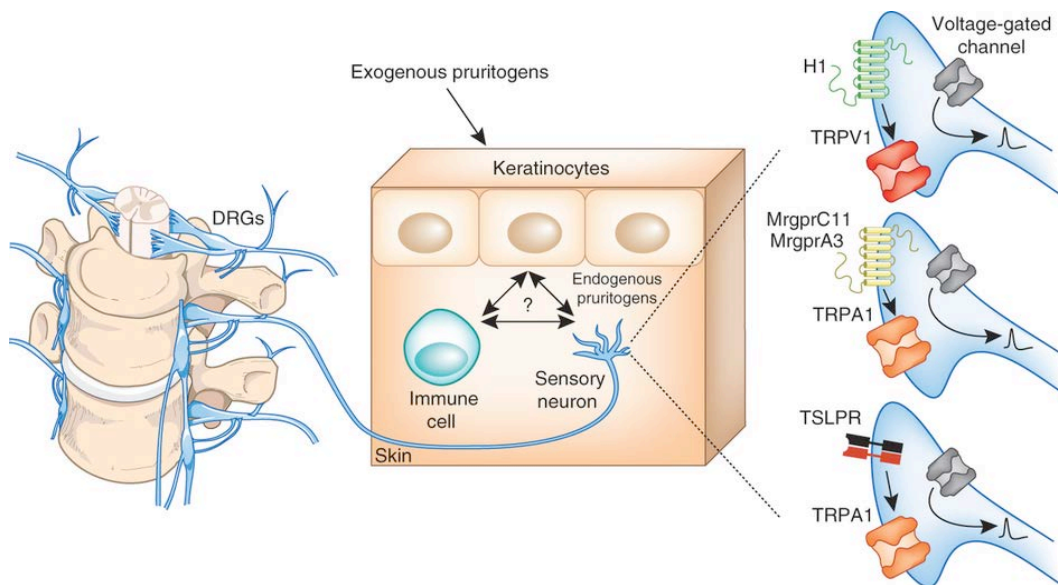
Os antagonistas dos TRPV1 são capazes de inibir a sinalização induzida por histamina nos neurônios do DRG. Ademais, pacientes com rinite alérgica apresentam aumento do prurido após ativação de TRPV1, e camundongos que não expressam o TRPV1 respondem pouco à injeção de histamina. Entretanto, a coceira induzida por esta molécula não é

<sup>2</sup> Protease presente na *Mucuna pruriens*, cujos nomes populares incluem *cowhage* ou pó de mico.

completamente revertida em camundongos com deleção gênica para TRPV1, sugerindo o envolvimento de outros receptores na coceira induzida por histamina (Figura 8)<sup>25,42</sup>.

Sabe-se que a serotonina e a endotelina-1 atuam em receptores acoplados à proteína  $G_q/G_{11}$ . Como mencionado, após ação do ligante no receptor, a PLC produz diacilglicerol e, conseqüentemente, a ativação da PKC e a posterior fosforilação do TRPV1, desencadeando o potencial de ação (Figura 9). No que se refere à endotelina-1, mais estudos são necessários para compreender quais os receptores da família dos TRPs estão envolvidos na resposta pruriceptiva, uma vez que as pesquisas sobre a endotelina-1 e o TRPV1 são contraditórias. Em adição, sugere-se que a endotelina-1 possa também ativar a fosfolipase  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>) e D<sup>35</sup>.

**Figura 8** - Esquema das células envolvidas na detecção de diversos estímulos de prurido



Esquema das células envolvidas na detecção de diversos estímulos de prurido. Neurônios do DRG (azul; à esquerda) inervam a pele e podem ser ativados diretamente por agentes indutores de coceira de origem exógena ou endógena (moléculas pruritogênicas) liberados pelos queratinócitos, células do sistema imune ou terminações neuronais aferentes adjacentes. No entanto, muitos destes mediadores endógenos também podem ativar queratinócitos e várias células do sistema imune. Em adição, a interconexão entre todos os três tipos de células, através da liberação de determinadas substâncias, pode modular a capacidade de resposta celular e a transmissão da coceira. Subconjuntos distintos de neurônios sensoriais aferentes inervam a pele, mediando a sinalização da resposta pruriceptiva (à direita). A histamina ativa os neurônios através do H<sub>1</sub>R que induz à abertura dos canais iônicos TRPV1 (vermelho; canto superior direito). As moléculas pruritogênicas, BAM8-22 e cloroquina,

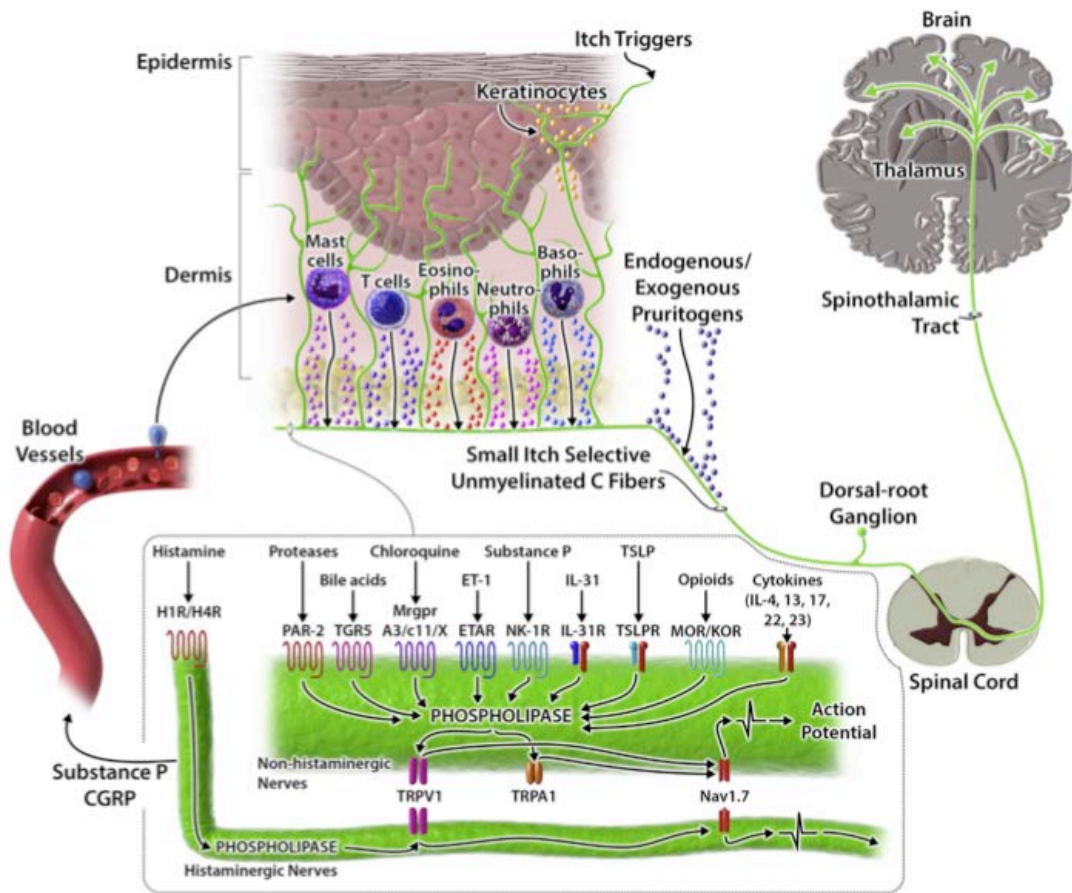


ativam os neurônios via MrgprC11 e MgrprA3, respectivamente, induzindo a abertura de receptores TRPA1 (*vermelho*). A citocina TSLP ativa neurônios através do receptor TSLPR, desencadeando a abertura dos canais de TRPA1 (*vermelho; canto inferior direito*). A ativação de TRPV1 ou TRPA1 induz a despolarização neuronal e, conseqüentemente, a transmissão do sinal de coceira da periferia para o sistema nervoso central (SNC). *Publicação da imagem autorizada pela revista (número da licença: 3673880065950)*<sup>25</sup>.

Outra molécula amplamente estudada na coceira é a SP, liberada na pele pelas terminações nervosas sensoriais. A SP tem alta afinidade pelo receptor de neurocinina-1 (NK1), presente nos queratinócitos e mastócitos, produzindo a sensação pruriginosa, além de induzir a liberação de outros mediadores inflamatórios, tais como o leucotrieno B<sub>4</sub>, a prostaglandina D<sub>2</sub> e o fator de necrose tumoral (TNF). Além disso, a administração de SP, em humanos saudáveis, induz a ativação de mastócitos que, posteriormente, secretam histamina. Essa informação corrobora os dados que indicam que a coceira induzida por SP é inibida por antagonistas do H<sub>1</sub>R<sup>16,35,49,50</sup>.

A macunaína, a catepsina S, uma enzima lisossoma, e a tripsina, uma protease endógena, são capazes de estimular os receptores ativados por proteases-2 e -4 (PAR-2 e PAR-4, respectivamente). Ambos, PAR-2 e PAR-4, são amplamente expressos em diversos tecidos, estando presentes nos neurônios sensoriais primários no DRG. A ativação ocorre após a clivagem proteolítica de sua porção N-terminal e, posteriormente, a nova porção N-terminal – geralmente composta por seis aminoácidos, Ser-Leu-Ile-Gly-Arg-Leu (SLIGRL-NH<sub>2</sub>) – atua como ligante para ativar PAR-2 e PAR-4, desencadeando uma resposta pruriceptiva<sup>16,48</sup>. Foi demonstrado que o pequeno peptídeo SLIGR ativa especificamente o receptor PAR-2, que desencadeia hipersensibilidade a estímulos térmicos em camundongos; por outro lado, o peptídeo SLIGRL-NH<sub>2</sub> é capaz de ativar o receptor acoplado à proteína G relacionado com Mas C11 (MrgprC11), produzindo uma resposta pruriceptiva independente de histamina<sup>43,51</sup>.

**Figura 9** - Células imunes, terminações nervosas e receptores envolvendo a coceira



Células, terminações nervosas e receptores envolvidos na coceira. Substâncias pruritógenas exógenas e endógenas (moléculas secretadas por células T, mastócitos, eosinófilos, neutrófilos, basófilos e queratinócitos) estimulam as fibras C presentes na epiderme e na junção dermoepidérmica. As fibras nervosas seletivas de coceira são divididas em dois subgrupos: terminações nervosas histaminérgicas e não-histaminérgicas. As fibras histaminérgicas expressam os receptores de histamina tipo 1 ( $H_1R$ ) e tipo 4 ( $H_4R$ ), sendo esses ativados pela histamina e envolvidos principalmente na coceira aguda. Já as fibras não-histaminérgicas respondem a uma variedade de substâncias pruritógenas, que não a histamina, através dos receptores correspondentes, e estão envolvidos na coceira crônica. *Publicação da imagem autorizada pela revista (número da licença: 4480890975642)*<sup>49</sup>.

Os receptores acoplados à proteína G relacionados com Mas (Mrgprs) são amplamente expressos em neurônios nociceptivos de pequeno diâmetro no gânglio trigeminal e no DRG. As terminações nervosas que expressam esses receptores são não-mielinizadas e se projetam para a superfície da pele e para o corno dorsal da medula espinhal na lâmina II<sup>52</sup>. Foi demonstrado que alguns receptores dessa família respondem a substâncias pruritógenas,

induzindo a sensação de coceira. O MrgprA3, por exemplo, é um receptor para a substância antimalárica, cloroquina; o MrgprD é ativado por  $\beta$ -alanina e; o MrgprC11 produz a sensação pruriginosa após ligação do SLIGRL-NH<sub>2</sub> e da catepsina S. A sinalização intracelular dos Mrgprs ainda não está claramente compreendida. Sabe-se que o MrgprA3 atua na subunidade G $\beta\gamma$ , envolvida na modulação dos canais iônicos por ligação direta, tal como ao TRPV1. Por outro lado, o MrgprC11 é acoplado à G<sub>q</sub>/G<sub>11</sub> para ativar a PLC e, posteriormente, o TRPV1<sup>16,35,49,53,54</sup>. Curiosamente, alguns pruriceptores presentes nas terminações sensoriais são ativados por substâncias como a capsaicina – agonista do TRPV1 – e a bradicinina (BK) – agonista do receptor B<sub>2</sub> de cininas –, ambas moléculas também indutoras de estímulos nociceptivos<sup>29,55,56</sup>.

No que se refere à transmissão da coceira ao nível do sistema nervoso central (SNC), inúmeras evidências indicam que a transdução de sinal é mediada, em alguns casos, por uma via específica, que responde exclusivamente a estímulos pruriceptivos sem alterar a percepção dolorosa<sup>57</sup>. O peptídeo bombesina foi inicialmente isolado da pele do sapo *Bombina bombina*, em 1970, por Erspamer e colaboradores. Esse peptídeo encontra-se amplamente distribuído nos tecidos de anfíbios e participa de diversos processos biológicos. Entretanto, embora essa molécula não esteja presente nos tecidos de mamíferos, estruturas homólogas foram identificadas, como a neuromedina B e o peptídeo liberador de gastrina (GRP), sendo este último composto por 27 aminoácidos nos humanos e 29 aminoácidos em roedores<sup>58,59</sup>.

Os efeitos semelhantes observados entre o peptídeo bombesina e o GRP estão relacionados com a similaridade estrutural, uma vez que possuem os mesmos sete aminoácidos na porção C-terminal, havendo a substituição da glutamina pela histidina na posição oito. Nos mamíferos, o GRP é amplamente expresso no trato gastrointestinal e no SNC, onde participa de diversas funções patofisiológicas, que incluem a modulação do

apetite, regulação do ciclo circadiano e consolidação da memória, bem como apresenta um papel fundamental na percepção e transmissão do prurido<sup>58,60-62</sup>.

O gene do pré-pró-GRP está localizado no cromossomo 18q21, sendo este codificado em três éxons separados por dois íntrons. O processamento pós-traducional inicia pela clivagem da molécula por uma peptidase sinalizadora, gerando o pró-GRP, que será novamente clivado, formando peptídeos menores, tais como o GRP<sub>1-27</sub> e GRP<sub>18-27</sub><sup>58,59</sup>. O GRP é amplamente distribuído no SNC, particularmente no prosencéfalo, núcleos hipotalâmicos e nos núcleos sensoriais<sup>59</sup>. Em adição, é expresso nos subconjuntos de neurônios não-mielinizados no DRG<sup>56,63,64</sup>. Entretanto, o RNAm não é detectável na medula espinhal; com base nessa informação, sugere-se que a liberação pré-sináptica do GRP ocorra através das terminações centrais dos neurônios aferentes primários<sup>63</sup>. O GRP é coexpresso com o CGRP e com a SP nos neurônios do DRG. De modo interessante, também está colocalizado com MrgprA3, receptor Toll-like 7 (TLR7) e com uma isoforma de um receptor  $\mu$ -opioide (MOR1D)<sup>16,43</sup>.

Após a liberação, o GRP ativa seu receptor (BB<sub>2</sub> ou GRPR), composto por 384 aminoácidos, expresso na lâmina I da superfície da medula espinhal<sup>16,59,64</sup>. O GRPR é um receptor acoplado à proteína G<sub>q</sub>/G<sub>11</sub> que promove estimulação da PLC quando ativado, induzindo o aumento dos níveis de cálcio e ativação da PKC<sup>62,65</sup>; entretanto, pode também atuar na via da PLA<sub>2</sub><sup>66</sup>. De modo interessante, o GRP é capaz de estimular as PTK<sup>66,67</sup>, assim como a ligação do GRP/GRPR também provoca a ativação da via ERK1/2-MAPK (ERK1/2 - quinase regulada por sinal extracelular; MAPK - quinases ativadas por mitógenos), alterando a transcrição gênica de determinadas proteínas<sup>62</sup>. Além disso, foi demonstrado que a ligação do GRP/GRPR pode ativar a via da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), responsável pela proliferação e sobrevivência celular<sup>68</sup>, da mesma forma que está intimamente relacionada com a sensação pruriginosa<sup>69,70</sup>.

O bloqueio farmacológico do GRPR pelo antagonista RC-3095, administrado por via intratecal (i.t.), na dose de 0.3nmol, foi capaz de diminuir o comportamento de coçar induzido por GRP em camundongos<sup>71</sup>. A injeção subcutânea de RC-3095 (5mg/kg) reduziu significativamente a sensação pruriginosa em um modelo de coceira induzida por agonista PAR-4 (AYPGKF-NH<sub>2</sub> na dose de 200nmol/site)<sup>72</sup>. Foi demonstrado que a administração sistêmica (via intraperitoneal) ou i.t. do antagonista não-peptídico dos receptores BB1<sup>3</sup>/GRPR, o PD 176252, foi capaz de inibir de forma significativa e dose-dependente a coceira induzida por diversos agentes, incluindo o GRP administrado por via espinhal<sup>70,73</sup>.

Demonstrou-se que camundongos *knockout* para *Bhlhb5*, um fator de transcrição envolvido na sobrevivência de interneurônios inibitórios denominados B5-I, exibem maior comportamento de coceira em resposta aos agentes pruritogênicos<sup>74,75</sup>. Também sabe-se que agonistas dos receptores opioides  $\kappa$  (KOR) diminuem a sensação pruriginosa. Os interneurônios inibitórios liberam dinorfina, um agonista endógeno para KOR capaz de modular o prurido. Corroborando esses dados, a administração de nalfurafina (40ng; via i.t.), um agonista do KOR, é capaz de reduzir significativamente o comportamento de coçar induzido pela injeção i.t. de GRP<sup>76,77</sup>. De forma interessante, o uso clínico da nalfurafina foi aprovado para o tratamento do prurido em pacientes com doença renal crônica<sup>78</sup>. Em um modelo de pele seca, os pesquisadores identificaram que a via da PI3K $\gamma$ /Akt está intimamente relacionada com a sensação pruriginosa e que inibidores dessa via, assim como o bloqueio farmacológico do GRPR, foram capazes de reduzir o comportamento de coçar em camundongos, sugerindo um novo alvo terapêutico para a sensação pruriginosa<sup>70</sup>.

---

<sup>3</sup> A bombesina exerce seus efeitos através da ativação de receptores BB1 e GRPR (Alexander et al., 2011).

#### 1.1.4 SISTEMA CININÉRGICO

Quanto ao sistema de cininas, sabe-se que o cininogênio de alto peso molecular sofre clivagem hidrolítica por uma serina-protease, a calicreína plasmática, produzindo o nonapeptídeo BK. Em adição, a calicreína tecidual realiza a quebra do cininogênio de baixo peso molecular, formando o decapeptídeo calidina (também chamado de Lys-BK) (Figura 10)<sup>79-81</sup>.

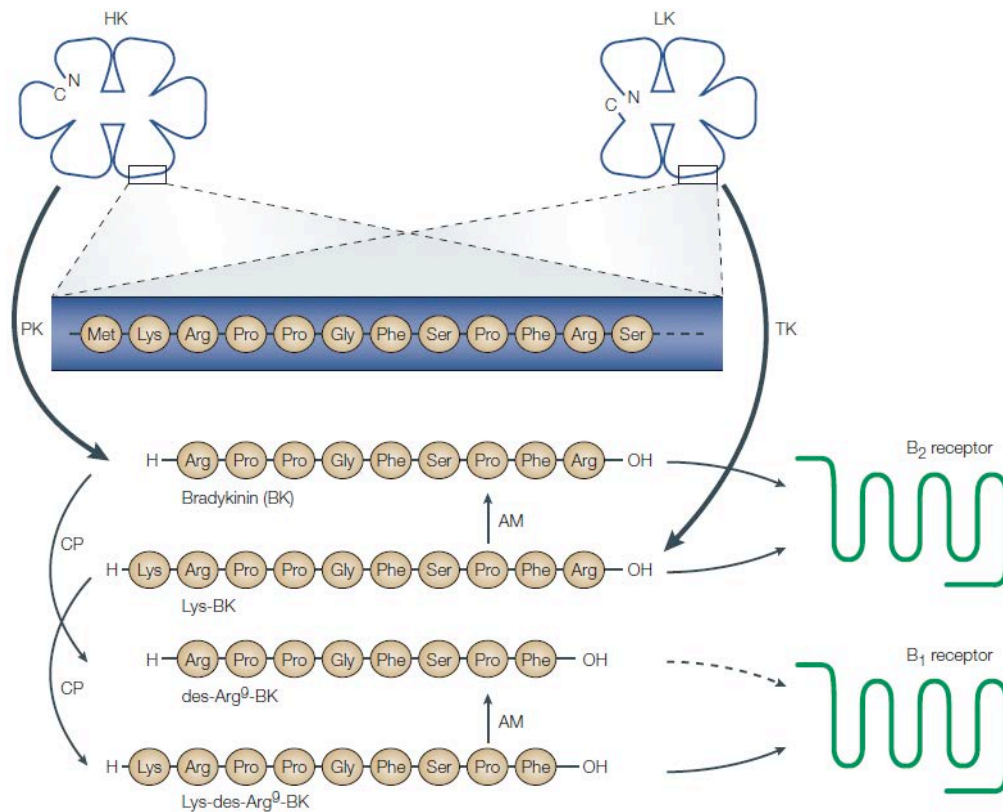
De modo interessante, as carboxipeptidases M e N (conhecidas como cininases I) podem realizar a clivagem da calidina e da BK, produzindo os metabólitos ativos Lys-des-Arg<sup>9</sup>-BK e des-Arg<sup>9</sup>-BK, respectivamente. Ademais, a aminopeptidase M pode remover a lisina da cadeia polipeptídica da calidina – formando a BK –, e da Lys-des-Arg<sup>9</sup>-BK – formando a des-Arg<sup>9</sup>-BK (Figura 10)<sup>82,83</sup>.

As cininas possuem meia-vida curta, de aproximadamente 15 segundos, sendo rapidamente convertidas em metabólitos inativos por metaloproteínases, tais como a enzima conversora de angiotensina (ACE ou cininase II), a endopeptidase neutra e a aminopeptidase P (cininases I)<sup>35,79,84,85</sup>. As enzimas calicreínas realizam a clivagem do cininogênio nos sítios de lesão ou com inflamação, participando de efeitos patofisiológicos, tais como a percepção dolorosa ou pruriginosa por ativação de fibras C sensíveis à histamina<sup>63,86</sup>.

As cininas exercem seus efeitos através da interação com dois receptores acoplados à proteína G, denominados B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>. O receptor B<sub>2</sub> é expresso constitutivamente em diversos tecidos, ao passo que o receptor B<sub>1</sub> só é expresso em determinadas situações, como, por exemplo, após estímulos inflamatórios e infecciosos. De maneira interessante, o receptor B<sub>2</sub> é ativado por calidina e BK, enquanto que seus metabólitos, Lys-des-Arg<sup>9</sup>-BK e a des-Arg<sup>9</sup>-BK, se ligam ao receptor B<sub>1</sub><sup>82,87</sup>. Os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de cininas são expressos nas células epiteliais, fibroblastos, macrófagos, células dendríticas, entre outras<sup>88</sup>. Os receptores de cininas interagem inicialmente com a proteína G<sub>q</sub>/G<sub>11</sub> e G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub><sup>79,89,90</sup>. Em adição, foi

demonstrado em experimentos *in vitro* que o receptor B<sub>2</sub> também está relacionado com a proteína G<sub>s</sub><sup>91</sup>.

**Figura 10** - Representação esquemática do sistema calicreína-cininas



Os dois receptores acoplados à proteína G, receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, fazem parte do sistema calicreína-cininas. Enzimas, como a cininase II, a endopeptidase neutra e a aminopeptidase P, clivam as cininas em diferentes sítios, resultando em sua completa inativação. AM, aminopeptidase M; CP, carboxipeptidases N e M (=cininase D); HK, cininogênio de alto peso molecular; LK, cininogênio de baixo peso molecular; PK, calicreína plasmática; TK, calicreína tecidual. *Publicação da imagem autorizada pela revista (número da licença: 3703361148443)*<sup>82</sup>.

No que se refere a via da G<sub>q</sub>/G<sub>11</sub>, como supramencionado, ocorre a ativação da PLCβ e posterior formação de IP<sub>3</sub>, desencadeando um aumento de cálcio citosólico, em que o receptor B<sub>1</sub> utiliza o cálcio extracelular e o receptor B<sub>2</sub> o cálcio intracelular<sup>85,88,92,93</sup>. Curiosamente, os receptores de cininas também são capazes de modular o TRPV1, através da ativação da PLC<sup>94,95</sup>. Entretanto ocorre ativação da PLA<sub>2</sub> quando há estimulação da G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>, induzindo à

liberação de ácido araquidônico e posterior formação de prostaglandina E<sub>2</sub> ou prostaglandina I<sub>2</sub>, resultando na formação de AMPc<sup>35,81,92,93,96</sup>.

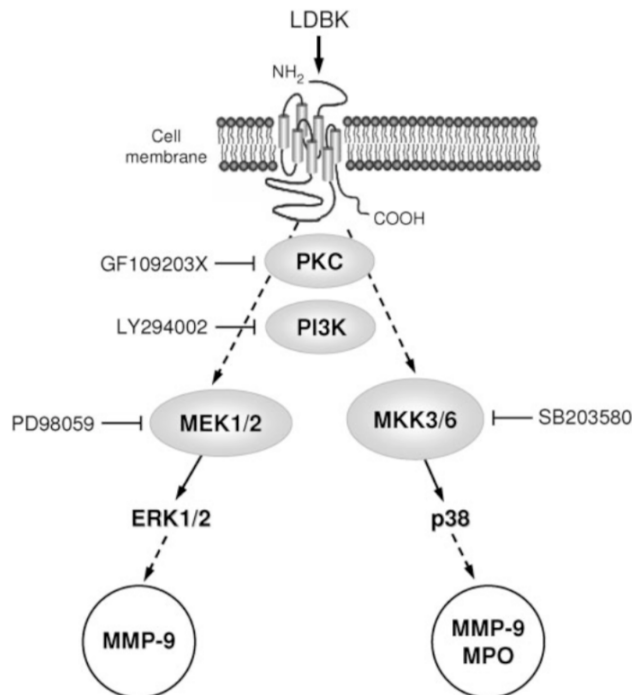
Sabe-se também que a ativação do receptor B<sub>1</sub> modula proteínas inflamatórias, como a ciclooxigenase-2 (COX-2), assim como a ativação de ambos receptores de cininas resulta na liberação de óxido nítrico, que leva à produção de GMPc<sup>85,92,97</sup>. A ativação do receptor B<sub>1</sub> pela Lys-des-Arg<sup>9</sup>-BK estimula a liberação das enzimas, metaloproteinase-9 (MMP-9) e mieloperoxidase (MPO), ambas proteínas importantes no processo inflamatório, sendo que a liberação da MMP-9 é dependente da fosforilação de ERK1/2-MAPK e p38, enquanto que a ativação da MPO depende apenas da p38. Ainda nesse estudo, os autores relataram que o tratamento com os antagonistas do receptor B<sub>1</sub>, des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-BK ou Lys-des[Arg<sup>9</sup>]-Leu<sup>8</sup>-BK, foi capaz de inibir a fosforilação da ERK1/2 MAPK, um efeito que não foi observado para o antagonista do receptor B<sub>2</sub>, HOE140 (Figura 11)<sup>98</sup>.

O receptor B<sub>2</sub> pode, ainda, ativar vias alternativas, tais como a fosforilação de algumas quinases – por exemplo, PTK e MAPK, entre outras. A ativação dessas vias pode desencadear a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1β, IL-6, IL-8 e o TNF, bem como induzir a ativação do fator nuclear-κB (NF-κB) e a liberação de SP e do CGRP<sup>35,92,93</sup>.

A administração intradérmica de BK aumenta a sensação pruriginosa e há expressão dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> nas fibras nervosas sensoriais<sup>99</sup>. Corroborando essa informação, a BK é capaz de induzir intenso prurido na pele de pacientes com dermatite atópica<sup>18</sup>, bem como aumentar os acessos de coceira em camundongos com dermatite de contato alérgica induzida por dibutilester do ácido esquárico<sup>100</sup>. Em outro modelo de prurido crônico, induzido por difenilciclopropenona (DCP), foi demonstrado que o antagonista do receptor B<sub>1</sub>, R892, reduziu a sensação pruriginosa. Por outro lado, o tratamento com o antagonista seletivo dos receptores B<sub>2</sub>, HOE140, não modificou esse comportamento<sup>101</sup>.



**Figura 11** - Vias de sinalização vinculadas ao receptor B<sub>1</sub>



Visão esquematizada da liberação de MMP-9 pela ativação de ERK1/2 MAPK e p38, enquanto MPO é dependente da via da p38 apenas. GF109203X, inibidor da PKC; LY294002, inibidor da PI3K; PD98059, inibidor da MAP quinase; SB203580, inibidor da p38. *Publicação da imagem autorizada pela revista (número da licença: 4499480412541)*<sup>98</sup>.

Também foi demonstrada a relação entre os receptores de B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de cininas e o PAR-2, uma vez que camundongos *knockout* para os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> exibiram menor comportamento de coceira após administração de tripsina e SLIGRL-NH<sub>2</sub>, ambas moléculas indutoras de prurido por ativação de PAR-2<sup>102</sup>. A administração de dois antagonistas do receptor B<sub>2</sub> (FR173657 e HOE140) diminuiu a coceira induzida por ácido deoxicólico em camundongos<sup>103</sup>. Ademais, a administração de antagonistas dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> (SSR240612 e FR173657, respectivamente) reduziu significativamente o comportamento de coçar em camundongos previamente tratados com tripsina<sup>104</sup>.

Curiosamente, outro estudo demonstrou que a sensação pruriginosa induzida pelo adjuvante completo de Freund (CFA) é exacerbada após administração de BK. Entretanto, o bloqueio farmacológico do receptor B<sub>2</sub>, utilizando o antagonista D-Arg-[Hyp<sup>3</sup>, D-Phe<sup>7</sup>]-BK,

aumentou a coceira nesses animais. Já o antagonista do receptor B<sub>1</sub>, des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-BK, reduziu esse comportamento. Esse dado sugere efeitos opostos dos receptores de cininas na resposta pruriceptiva no modelo de inflamação induzida por CFA<sup>105</sup>. Além disso, um trabalho publicado posteriormente evidenciou que o efeito pruritogênico no modelo induzido CFA associado com o agonista do receptor B<sub>1</sub>, des-Arg<sup>9</sup>-BK está relacionado com ativação aumentada e persistente da ERK1/2 na medula espinhal<sup>106</sup>.

No tecido tegumentar, os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de cininas também estão envolvidos com o processo cicatricial. Em um estudo que utilizou camundongos *knockout* para os receptores cininérgicos, os autores observaram que a cicatrização das lesões cutâneas nesses animais apresentava-se mais lenta. Esse efeito se relaciona com a redução de colágeno, do infiltrado celular na fase inflamatória e da reepitelização local, demonstrando, pela primeira vez, o envolvimento das cininas no reparo tecidual<sup>107</sup>. Em um modelo de cicatrização utilizando camundongos machos C57Bl6/J, foi identificado que a ativação do receptor B<sub>1</sub> de cininas, pelo uso do agonista, des-Arg<sup>9</sup>-BK, promove a migração de queratinócitos, favorecendo o reparo tecidual. Em adição, a ativação do receptor B<sub>1</sub> aumentou a expressão das metaloproteinases-2 e 9, cujas funções estão relacionadas à proliferação de queratinócitos, diferenciação celular e processo inflamatório<sup>108</sup>.

O angioedema é um distúrbio cutâneo diretamente relacionado com o sistema cininas. Essa doença pode se apresentar de forma adquirida, alérgica e não alérgica, ou hereditária. O angioedema se caracteriza pelo aumento da permeabilidade vascular (Figura 12), no qual a histamina e a BK são importantes mediadores envolvidos nesse processo. Entretanto, destaca-se ainda o envolvimento de outras substâncias, tais como a SP, leucotrienos, prostaglandinas, citocinas e quimiocinas<sup>34,109</sup>. A urticária é uma disfunção que acomete de 15 a 25% dos indivíduos em algum momento da vida. Como principais sintomas, pode-se citar a sensação pruriginosa, coloração avermelhada no local e inchaço (Figura 13). Ressalta-se que

aproximadamente 40% das pessoas com urticária também apresentam o angioedema. É importante destacar que essa doença também pode se manifestar de forma aguda ou crônica, sendo que essa última pode reduzir a qualidade de vida do indivíduo<sup>34</sup>.

**Figura 12** - Localização do extravasamento de líquido em disfunções cutâneas

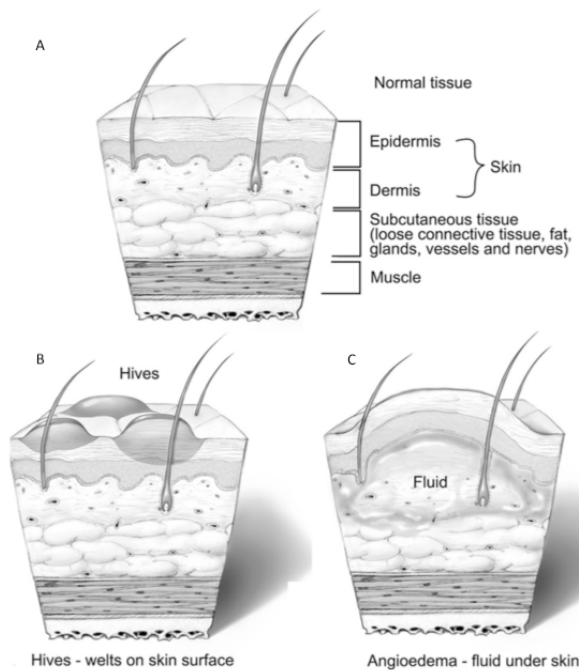


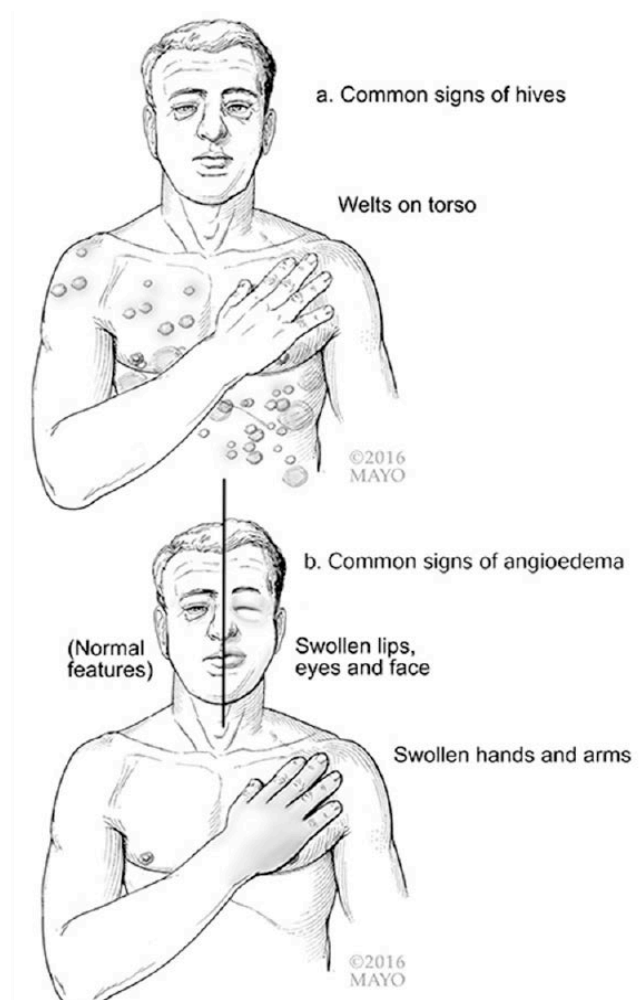
Imagem representativa de uma pele normal (A), com urticária (B) e com angioedema (C). *Publicação da imagem autorizada pela revista (número da licença: 501453552)*<sup>110</sup>.

O antagonista seletivo dos receptores B<sub>2</sub>, HOE140, demonstrou efeitos benéficos em vários modelos de inflamação, dor e prurido<sup>88,101,106,111-113</sup>. Em 2011, o HOE140, comercializado com o nome de Icatibanto (FIRAZYR®), foi aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento do angioedema, na dose de 30mg, por via subcutânea<sup>34,114-118</sup>.

Inibidores da ACE são utilizados para o tratamento de hipertensão. Conforme apontam os dados de uma pesquisa publicada em 2012, houve aumento no uso desses, incluindo em pacientes com histórico de angioedema. De 112 pacientes que foram entrevistados ao longo

de 10 anos, 39% utilizavam os inibidores de ACE, aumentando o risco para esses indivíduos<sup>119</sup>. Em outro trabalho duplo-cego de fase II, os pesquisadores investigaram o efeito do tratamento do angioedema causado por inibidores de ACE. Dos 27 participantes, 13 indivíduos receberam o tratamento com HOE140 (30mg; via subcutânea) e outros 14 pacientes receberam a terapia convencional com glicocorticoide (prednisona; 500mg) e anti-histamínico (clemastina; 2mg). Após o tratamento, o grupo tratado com HOE140 apresentou uma melhora do quadro de angioedema em um período inferior quando comparado com a abordagem convencional<sup>120</sup>.

**Figura 13** - Manifestação da urticária e do angioedema

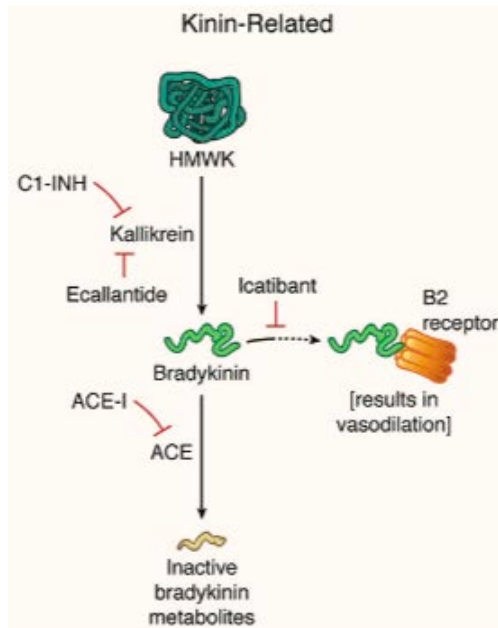


Manifestação da urticária no torso (A) e angioedema na hemiface esquerda (B). *Publicação da imagem autorizada pela revista (número da licença: 501453552)*<sup>110</sup>.

Resultados similares foram encontrados em pacientes com angioedema hereditário. Nesse estudo clínico, os pacientes do grupo tratado com HOE140 (30mg; via subcutânea), quando comparado com o grupo controle, apresentaram uma melhora significativa dos sintomas do angioedema em um período menor, de 2,5 horas, em relação às 4,6 horas do grupo controle. Além disso, outro grupo recebeu o tratamento prévio com HOE140 (via subcutânea) ou com ácido tranexâmico (3mg/dia durante dois dias; via oral), sendo que, novamente, o antagonista do receptor B<sub>2</sub> apresentou uma redução dos sintomas em um período menor, de duas horas, em comparação às 12 horas do grupo tratado com ácido tranexâmico<sup>121</sup>.

Foi identificado pelo registro no banco de dados do *IMS PharMetrics Plus™* que 62,8% dos pacientes com história de angioedema hereditário relataram utilizar o HOE140 ou um inibidor da calicreína plasmática, a ecalantida (Figura 14), também aprovada pelo FDA<sup>122</sup>. Além disso, 20 pacientes com angioedema hereditário foram acompanhados e 24 ataques foram registrados, observando-se melhora em até 30 minutos após a administração do HOE140. Os efeitos adversos do antagonista do receptor B<sub>2</sub> se restringiram apenas no local da lesão, com relatos de eritema e sensação de ardência em 15 das aplicações. Em três casos, foi relatado prurido e seis aplicações não causaram qualquer reação<sup>123</sup>, que em outro artigo publicado, os autores destacam, porém, que o desconforto causado por esse antagonista se restringe ao sítio de aplicação<sup>124</sup>.

**Figura 14** - Mecanismo de ação de substâncias utilizadas no tratamento de angioedema



Mecanismo de ação do Icatibanto, um antagonista do receptor B<sub>2</sub> de cininas; da ecalantida (Kalbitor®) e do C1-INH (Berinert®), ambos inibidores da calicreína plasmática; ACE-I, um inibidor da enzima conversora de angiotensina. *Publicação da imagem autorizada pela revista (número da licença: 501453552)*<sup>110</sup>.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 OBJETIVO GERAL

A presente tese teve por objetivo caracterizar a participação dos receptores cininérgicos nas alterações pruriginosas e inflamatórias em um modelo de dermatite atópica em camundongos, bem como a relação entre os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de cininas no modelo de prurido agudo induzido por GRP.

### 1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> em modelo de dermatite atópica induzida por oxazolona por meio de imunistoquímica na pele, medula, DRG e no córtex motor primário e secundário e o córtex cingulado;
- Avaliar o efeito da inibição farmacológica seletiva dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> cininérgicos sobre o comportamento de coçar em modelo de dermatite atópica induzida por oxazolona através do tratamento agudo pela via intraperitoneal;
- Avaliar o efeito da inibição farmacológica seletiva dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> cininérgicos sobre o comportamento de coçar em modelo de dermatite atópica induzida por oxazolona através do tratamento crônico pela via intraperitoneal e intradérmica;
- Avaliar extravasamento plasmático do tecido cutâneo no modelo de dermatite atópica induzida por oxazolona, bem como o efeito dos antagonistas dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de cininas, através do tratamento crônico pela via intraperitoneal neste parâmetro;
- Avaliar as possíveis modificações cutâneas no modelo de dermatite atópica induzida por oxazolona, assim como o efeito dos antagonistas dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de cininas neste parâmetro;

- Avaliar as possíveis alterações histológicas na pele no modelo de dermatite atópica induzida por oxazolona e o efeito dos antagonistas dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de cininas neste parâmetro;
- Avaliar a expressão da metaloproteinase ADAMTS5 na pele em modelo de dermatite atópica induzida por oxazolona por meio de imunistoquímica, bem como o efeito dos antagonistas dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de cininas através do tratamento crônico pela via intraperitoneal e intradérmica, neste parâmetro;
- Avaliar o efeito da inibição farmacológica seletiva dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> cininérgicos sobre o comportamento de coçar em modelo de prurido agudo induzido por GRP através do tratamento pela via intraperitoneal e intratecal;
- Avaliar o efeito da administração de antagonistas dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de cininas sobre a atividade neural no modelo de prurido agudo induzido pelo GRP por meio da tomografia por emissão de pósitrons (micro-PET);
- Avaliar o efeito do tratamento crônico pela via intraperitoneal com o antagonista do GRPR, o PD176252, sobre a expressão dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de cininas em modelo de dermatite atópica induzida por oxazolona por meio de imunistoquímica na pele.



## **Capítulo II**

---

### **2.1 MANUSCRITO**

### **2.2 RESULTADOS ADICIONAIS**

---

## 2.1 MANUSCRITO

O manuscrito “*The role of kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors in the mouse model of oxazolone-induced atopic dermatitis*” dos autores Priscilla B. Pail, Gabriela W. Neculqueo, Giovana P. Maccari, Pedro Chagastelles, Raquel D. S. Freitas, Ana P. A. Dagnino, Maria Martha Campos, foi submetido ao periódico *International Immunopharmacology*, com fator de impacto de 3.118 (ANEXO A).



Contents lists available at ScienceDirect

## International Immunopharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/intimp](http://www.elsevier.com/locate/intimp)

Preliminary report

The role of kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors in the mouse model of oxazolone-induced atopic dermatitisPriscilla B. Pail<sup>a,b</sup>, Gabriela W. Neculqueo<sup>b,c</sup>, Giovana P. Maccari<sup>b,c</sup>, Pedro C. Chagastelles<sup>b,d</sup>, Raquel D.S. Freitas<sup>b,d</sup>, Ana P.A. Dagnino<sup>a,b</sup>, Maria M. Campos<sup>a,b,c,d,\*</sup><sup>a</sup> Escola de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre 90619-900, Brazil<sup>b</sup> Escola de Ciências da Saúde, Centro de Pesquisa em Toxicologia e Farmacologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Avenida Ipiranga, 6681, Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil<sup>c</sup> Escola de Ciências da Saúde, Curso de Graduação em Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre 90619-900, Brazil<sup>d</sup> Escola de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre 90619-900, Brazil

## A B S T R A C T

This study evaluated the role of kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors in the pre-clinical mouse model of oxazolone-induced atopic dermatitis. The B<sub>1</sub> R715 or B<sub>2</sub> HOE140 receptor antagonists were dosed at different schemes of treatment. After assessment of clinical lesion scores and pruritus, lesional skin samples were collected for histopathological analysis. The plasma extravasation and the expression of the metalloproteinase ADAMTSS were also assessed. The immunopositivity for kinin receptors was evaluated in the skin, dorsal root ganglion (DRG), thoracic spinal cord and brain cortex sections. Marked upregulation of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors was observed in the skin of oxazolone-treated mice. The induction of atopic dermatitis led to a downregulation of both receptors in the DRG, without any alteration in the spinal cord and brain cortex. The repeated administration of HOE140 (50 nmol/kg; i.p.) partially inhibited the oxazolone-related pruritus, associated with a reduction of ADAMTSS immunolabelling in the skin. Alternatively, R715 (438 nmol/kg; i.p.) produced a mild inhibition of plasma extravasation in oxazolone-challenged mice. Noteworthy, the repeated i.d. injection of R715 (30 nmol/site) or HOE140 (3 nmol/site) significantly reduced the histiocyte numbers, according to the histopathological analysis. Either B<sub>1</sub> or B<sub>2</sub> kinin antagonists, irrespective of the protocol of treatment, did not alter any other evaluated clinical or histological parameters. Data brings novel evidence about the role of kinin receptors in allergy-related conditions, such as atopic dermatitis. Further studies to test different protocols of treatment with kinin antagonists on in-depth cellular alterations underlying oxazolone-induced atopic dermatitis remain to be performed.

## 1. Introduction

Bradykinin (BK), and the related family of peptides, are a group of mediators implicated in a series of pathophysiological responses, which are produced in plasma and tissues by the action of kallikreins. Most of their effects are mediated via the activation of two G protein-coupled receptors: the housekeeping B<sub>2</sub> and the inducible B<sub>1</sub> [1,2]. The participation of BK and its receptors has been widely investigated in allergic conditions, such as rhinitis, pruritus, asthma, and anaphylaxis [3–7]. Noteworthy, the selective peptide B<sub>2</sub> receptor antagonist HOE140 (Icatibant) is clinically approved for the management of acute attacks of hereditary angioedema, in which BK mediates endothelial activation and edema, via histamine-independent mechanisms [8].

With respect to skin disorders, it has been demonstrated that BK application into the lesional skin of patients with atopic dermatitis elicited a marked pruritic sensation, in comparison to minor effects in

healthy individuals [9]. Moreover, the administration of the selective non-peptide B<sub>1</sub> SSR240612 or B<sub>2</sub> FR173657 receptor antagonists efficiently reduced the itching sensation caused by trypsin injection into the mouse dorsal skin [4]. Liang et al. [10] showed that BK-elicited pruritus in complete Freund's adjuvant (CFA)-inflamed skin was prevented by the selective blocker of B<sub>1</sub> receptors des-Arg<sup>9</sup>[Leu<sup>8</sup>]-BK, whereas the peptide B<sub>2</sub> antagonist (D-Arg-[Hyp<sup>3</sup>,D-Phe<sup>7</sup>]-BK) enhanced the scratching bouts. Alternatively, B<sub>2</sub> receptor inhibition by HOE140 or FR173657 significantly reduced the pruritus caused by the dorsal injection of the bile salt deoxycholic acid in mice, without any significant effect for the B<sub>1</sub> antagonist des-Arg<sup>9</sup>[Leu<sup>8</sup>]-BK [11]. Nonetheless, the itching response secondary to the induction of contact dermatitis by diphenylcyclopropenone (DCP) was reduced by the B<sub>1</sub> receptor antagonist R892, whilst it was unaffected by the B<sub>2</sub> antagonist HOE140 [12]. Considering this controversial series of data, further studies to determine the role of kinin receptors in pruritus and chronic

\* Correspondent author at: Escola de Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, Partenon, Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil.

E-mail address: [maria.campos@pucrs.br](mailto:maria.campos@pucrs.br) (M.M. Campos).

<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.03.063>

Received 2 February 2019; Received in revised form 23 March 2019; Accepted 29 March 2019

1567-5769/© 2019 Published by Elsevier B.V.

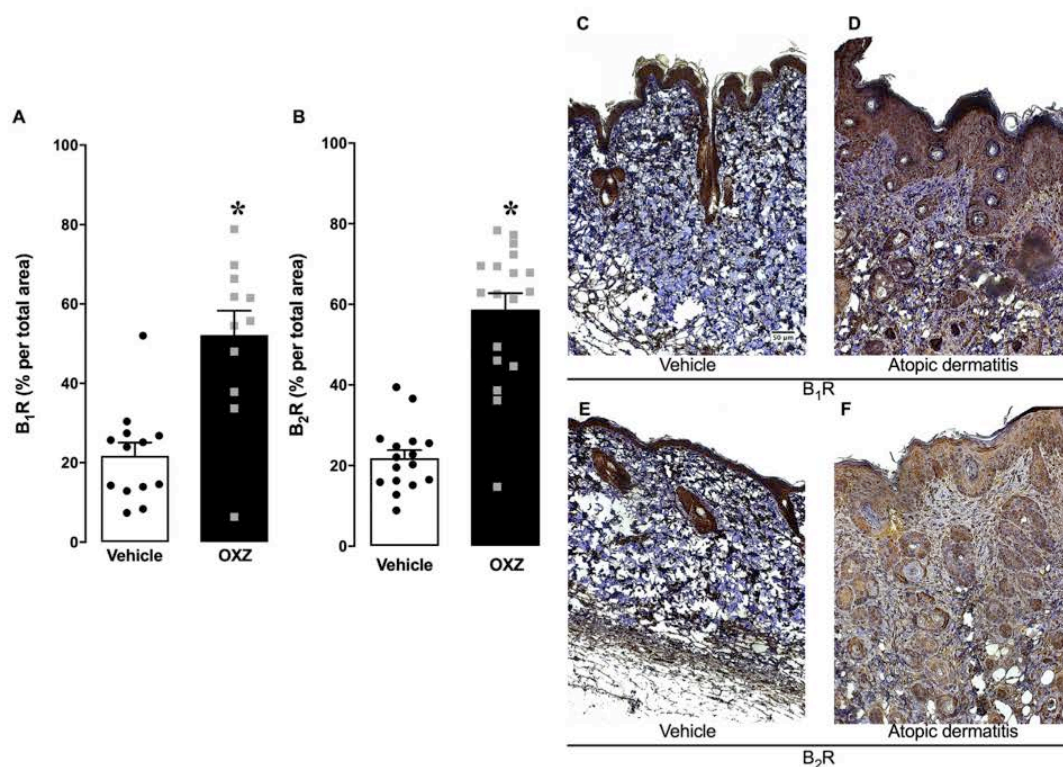


Fig. 1. Skin expression of kinin receptors in the mouse model of atopic dermatitis induced by oxazolone. Immunohistochemical analysis of kinin B<sub>1</sub> (A) or B<sub>2</sub> (B) receptors in the dorsal skin of vehicle and oxazolone-treated mice.  $n = 11$ – $18$  mice per group,  $*P < 0.05$  vs vehicle-treated group (unpaired Student *t*-test). Representative images of B<sub>1</sub> (C–D) and B<sub>2</sub> (E–F) receptor immunostaining in the skin. Original magnification  $\times 200$ , scale bar (—)  $50 \mu\text{m}$ . (OXZ; oxazolone).

skin inflammation are still required.

The present study evaluated, for the first time, the effects of selective B<sub>1</sub> or B<sub>2</sub> receptor antagonists in the clinical and microscopic alterations associated with a mouse model of atopic dermatitis elicited by oxazolone. We also evaluated whether the induction of atopic dermatitis by oxazolone might modulate the central and peripheral expression of kinin receptors, via immunohistochemistry assessment.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals and reagents

The experimental protocols followed the current Brazilian guidelines for the care and use of animals for scientific and didactic procedures, from the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA, Brazil, 2014). The local Animal Ethics Committee evaluated and approved all the protocols (CEUA/PUCRS 15/00489). Male CF-1 specific-pathogen-free mice (2-month old, 18–20 g at the beginning of experiments,  $N = 184$ ) were obtained from the Centre for Experimental Biological Models (CeMBE/PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil). The number of animals per group ( $n$ ) is indicated in each legend to Figure. The mice were maintained in micro-isolator cages (4 per cage), equipped with inlet/outlet air filters, under controlled temperature ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) and humidity (50–70%), and a light-dark cycle of 12h (lights on at 7 a.m., lights off at 7 p.m.). The cages were filled with autoclaved wood chip bedding. The animals received pelleted feed and sterile water ad libitum. The euthanasia was performed by sevoflurane inhalation.

Oxazolone was purchased from Sigma Aldrich Chemical Company (St. Louis MO, USA). The selective kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor antagonists,

R715 (Ac-Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-D $\beta$ Nal-Ile) and HOE140 (D-Arg-Arg-Pro-Hyp-Gly-Thi-Ser-D-Tic-Oic-Arg), respectively, were purchased from Tocris Bioscience (Bristol, UK). Oxazolone was diluted in absolute acetone at the desired concentration just before using. The stock solutions of the kinin antagonists were prepared in phosphate-buffered saline (PBS) in siliconized plastic tubes, maintained at  $-20^\circ\text{C}$ , and diluted to the desired concentration just before use. All the other chemical reagents were of analytical grade.

### 2.2. Oxazolone-induced atopic dermatitis model

The protocols of sensitization and challenge with oxazolone were accomplished according to the methodology described by Tsukumo et al. [13], with minor modifications (Fig. 4 A–C). For the sensitization protocol (day  $-7$ ), the nape of the neck was shaved 48 h before, and the animals received an epicutaneous application of 0.5% oxazolone solution ( $10 \mu\text{l}/\text{site}$ ). Seven days later (day 0), the animals were shaved again, and the protocol of challenge was initiated. For this purpose,  $10 \mu\text{l}$  of 0.5% oxazolone solution was applied at the same site, at 2–3-day intervals for 16 days (days 2, 4, 7, 9, 11, 14 and 16). In the control group, PBS was applied at the same region and intervals of time. After this period, the scratching behavior and the lesion scores were registered, and the animals were immediately euthanized for sample collection. Independent investigators made all the analysis, in a blinded manner.

### 2.3. Protocols of treatment with the kinin antagonists

To assess the acute effects of kinin receptor inhibition on the scratching behavior associated with oxazolone-induced atopic

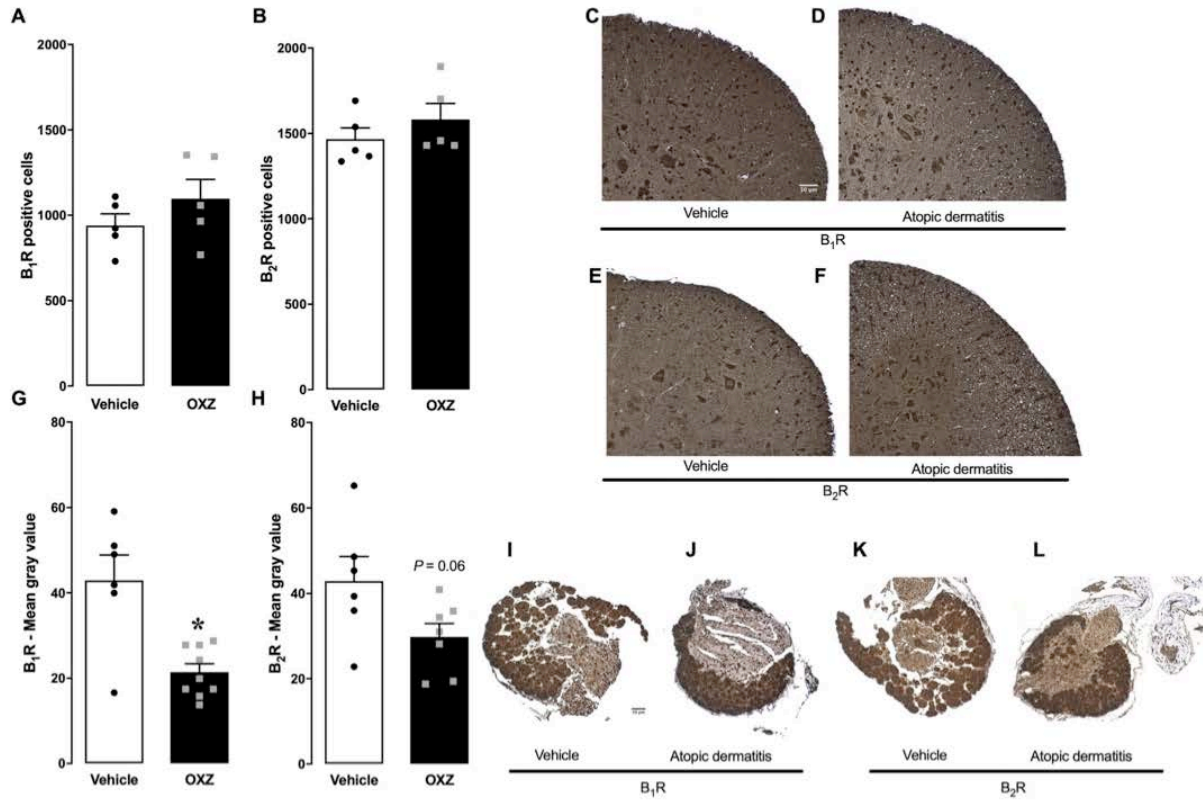


Fig. 2. Expression of kinin receptors in the thoracic spinal cord and DRG of mice submitted to the mouse model of atopic dermatitis induced by oxazolone. Immunohistochemical analysis of kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors in the thoracic spinal cord (A-B) or DRG (G-H) of the vehicle and oxazolone-treated mice. *n* = 5–9 mice per group, \**P* < 0.05 vs vehicle-treated group (unpaired Student *t*-test). Representative images of B<sub>1</sub> (C, D) and B<sub>2</sub> (E, F) receptor immunolabelling in the thoracic spinal cord. Representative images of B<sub>1</sub> (I–J) and B<sub>2</sub> (K–L) receptor immunopositivity in the DRG. Original magnification × 200, scale bar (—) 50 μm. (OXZ; oxazolone).

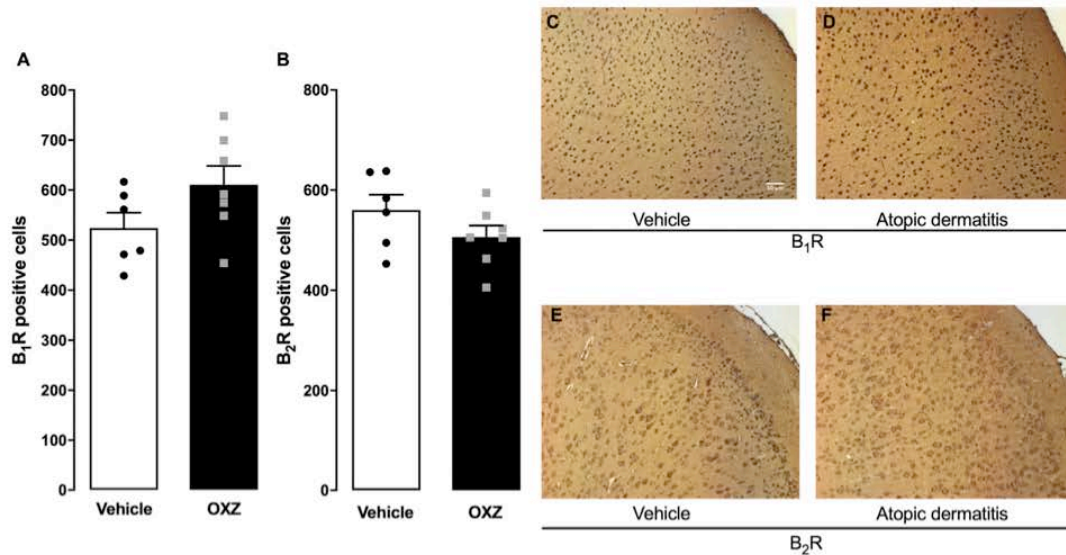
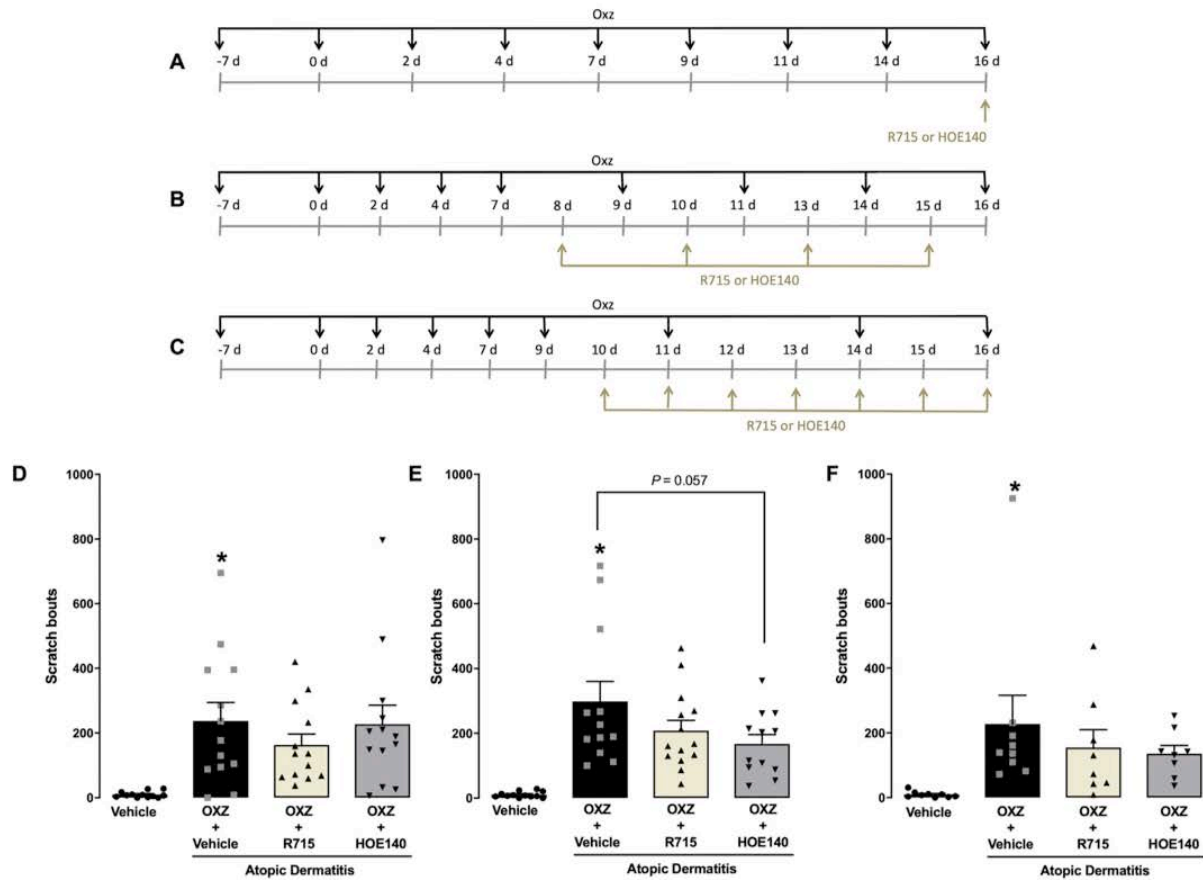


Fig. 3. Expression of kinin receptors in the brain cortex of mice submitted to the mouse model of atopic dermatitis induced by oxazolone. Immunohistochemical analysis of B<sub>1</sub> (A) or B<sub>2</sub> (B) receptors in the brain of vehicle and oxazolone-treated mice. *n* = 6–7 mice per group, *P* > 0.05 (unpaired Student *t*-test). Representative images of B<sub>1</sub> (C–D) or B<sub>2</sub> (E–F) receptor immunopositivity in the brain. Original magnification × 200 scale bar (—) 50 μm. (OXZ; oxazolone).



**Fig. 4.** Effects of kinin antagonists on the scratching behavior in the oxazolone-induced atopic dermatitis model. Schematic protocol timeline for the acute treatment (A; i.p.), or repeated treatment by intraperitoneal (B; i.p.), and by intradermal (C; i.d.) routes. (D) Effects of the acute treatment with the selective B<sub>1</sub> R715 (438 nmol/kg; i.p.) or B<sub>2</sub> HOE140 (50 nmol/kg; i.p.) receptor antagonists, given 30 min before pruritus assessment. (E) Effects of the repeated treatment with the selective B<sub>1</sub> R715 (438 nmol/kg; i.p.) or B<sub>2</sub> HOE140 (50 nmol/kg; i.p.) receptor antagonists, given on days 8, 10, 13 and 15 prior pruritus assessment. (F) Effects of the repeated local treatment with the selective B<sub>1</sub> R715 (30 nmol/site; i.d.) or B<sub>2</sub> HOE140 (3 nmol/site; i.d.) receptor antagonists, given from day 10 to 16, before pruritus assessment; the last injection was administered 5 min prior to the last oxazolone application.  $n = 8-14$  mice per group, \* $P < 0.05$  vs vehicle-treated group (one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test). (OXZ; oxazolone).

dermatitis, separate groups of animals received the selective B<sub>1</sub> R715 (438 nmol/kg) or B<sub>2</sub> HOE140 (50 nmol/kg) receptor antagonists in a single dose, administered by intraperitoneal (i.p.) route, immediately before the last application of oxazolone (day 16; Fig. 4A). Next, to evaluate whether the repeated systemic treatment with the kinin antagonists might prevent the pruritic and the inflammatory changes elicited by oxazolone, different experimental groups received R715 (438 nmol/kg; i.p.) or HOE140 (50 nmol/kg; i.p.), dosed one day before each last four applications of oxazolone (days 8, 10, 13 and 15; Fig. 4B). Additionally, to assess the local effects of the kinin antagonists, mice received R715 (30 nmol/site) or HOE140 (3 nmol/site), injected intradermally (i.d.), near to the site of oxazolone application, every day, from day 10 to 16, after beginning the challenge phase of atopic dermatitis induction (Fig. 4C). The control groups received PBS at the same time points. The doses of kinin antagonists were chosen based on the literature data [14–17].

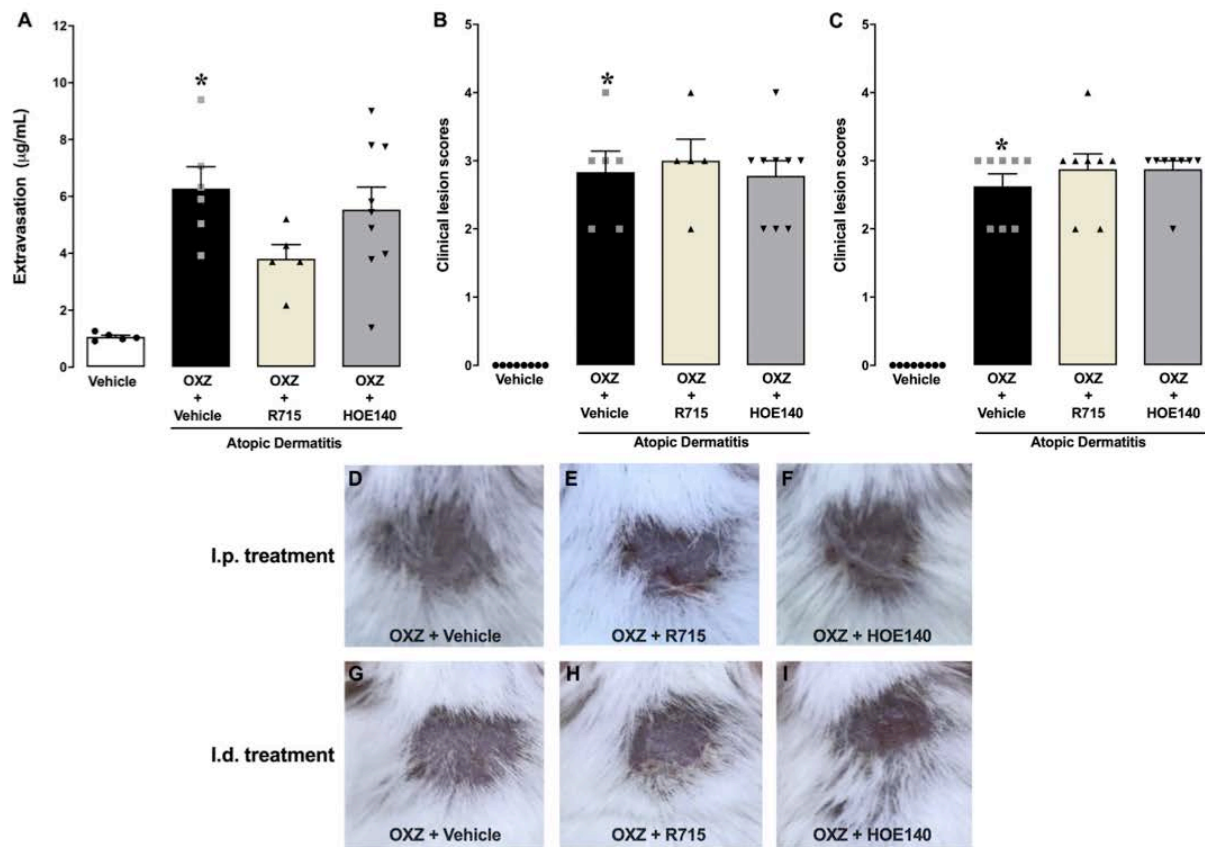
#### 2.4. Scratching bouts

On day 16, the animals were individually placed into glass cylinders 20 cm in diameter, for 30 min, in order to acclimatize them to the environment. After 30 min of adaptation, the last application of 0.5%

oxazolone solution or vehicle was performed. The mice were returned to the cylinders for an additional period of 30 min. Immediately after, the number of scratching bouts with both forepaws and hindpaws close to the injected site was registered during 60 min. Scratching behind the ears, but not on the face, was also counted [18]. The itching behavior was measured in animals pre-treated with the kinin antagonists, in acute or repeated schedules of administration, as described above (item 2.3.).

#### 2.5. Clinical lesion scores

The clinical changes secondary to the induction of atopic dermatitis by oxazolone were evaluated by using the score described by Kang et al. [19]. After the registration of scratching bouts, the lesions were classified as: (0) no visible inflammatory changes; (1) mild inflammation, with dryness and scaling; (2) moderate inflammatory changes, characterized by dryness, scaling and erosion; (3) middle inflammation, with the presence of dryness, scaling, erosion and excoriation; (4) severe inflammatory response, with all the alterations described for the score 3, plus hemorrhage. The groups of animals that had been repeatedly treated with the kinin antagonists, by i.p. or i.d. routes, were included in this analysis.



**Fig. 5.** Effects of kinin antagonists on plasma extravasation and skin alterations in oxazolone-induced atopic dermatitis in mice. Effects of systemic repeated treatment with the selective B<sub>1</sub> R715 (438 nmol/kg; i.p.) or B<sub>2</sub> HOE140 (50 nmol/kg; i.p.) receptor antagonists, given on days 8, 10, 13 and 15, on skin plasma extravasation (A) and lesion severity scores (B). Effects of the local repeated treatment with the selective B<sub>1</sub> R715 (30 nmol/site; i.d.) or B<sub>2</sub> HOE140 (3 nmol/site; i.d.) receptor antagonists, given on days 10 to 16, in the dermatitis score (C).  $n = 5-9$  mice per group, \* $P < 0.05$  vs vehicle-treated group (one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test). (D-I) Representative images of the clinical appearance of the skin. (OXZ; oxazolone).

## 2.6. Plasma extravasation

The method used was similar to that described by Pereira et al. [20]. Briefly, the animals submitted to the i.p. repeated treatment with the kinin antagonists, or the respective controls, received an intravenous injection of Evans blue dye solution (25 mg/kg), one h after the last application of oxazolone or vehicle, via the infraorbital plexus, under a slight inhalatory anesthesia with sevoflurane/oxygen. After 30 min, the mice were euthanized and the dorsal skin was removed and incubated in formamide (55 °C, overnight). The dye concentration was estimated based on a standard curve (0.5 to 50 µg/ml), at 595 nm (SpectraMax M2, Molecular Devices, San Jose, CA, USA).

## 2.7. Skin collection and general histological procedures

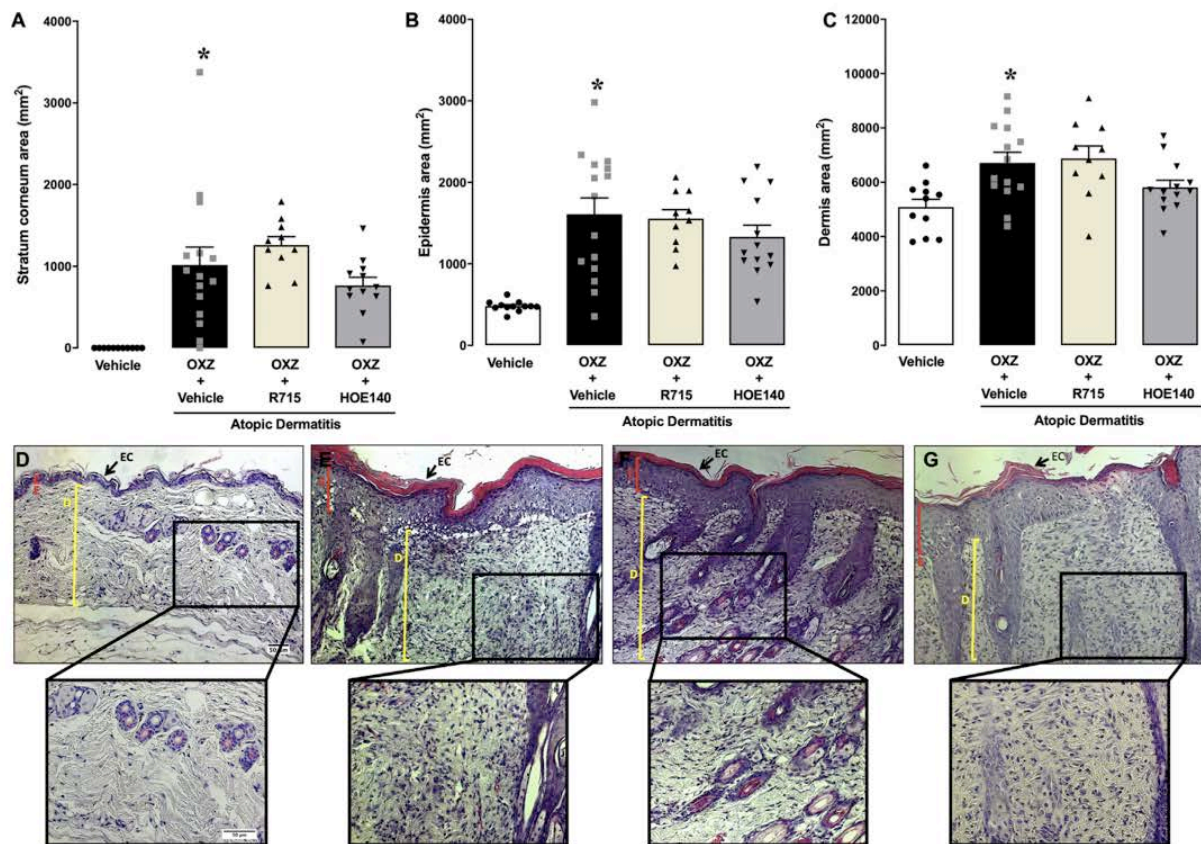
For the repeated treatment groups, after the lesion scoring, the animals were euthanized and the skin region corresponding to the site of oxazolone application was collected and immediately fixed in 10% formaldehyde, for 24 h. For the histochemical procedures, consecutive transversal 4-µm-thick sections were obtained from paraffin blocks. The sections were mounted on poly-L-lysine-coated glass slides for posterior analysis.

## 2.8. Histopathology

The skin histological sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) or toluidine blue (0.04% in acetate buffer; pH 4.0) for further analysis of atopic dermatitis severity, under the repeated treatment with the kinin antagonists [21–23]. The histological images were obtained with a microscope (Axio Imager A1) coupled to an image capture system (Axio Vision Rel. 4.4 Software Multimedia), from Carl Zeiss (Hallbergmoos, Germany). The areas (in mm<sup>2</sup>) of stratum corneum, epidermis and dermis were measured in H&E-stained slides, under ×100 magnification, by using the NIH Image J 1.50 g Software. The presence of rete ridges and the follicular inflammation was evaluated at ×200 magnification. The dermal numbers of eosinophils, lymphocytes and histiocytes were also evaluated in H&E-stained sections, at ×400 magnification. Toluidine blue-stained sections were used to determine the numbers of mast cells in dermis, at ×400 magnification.

## 2.9. Immunodetection of ADAMTS5

The skin immunopositivity for the metalloproteinase ADAMTS5 was evaluated according to the method described by Togni et al. [24]. The polyclonal rabbit anti-ADAMTS5 (1:200; sc-83,186, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) was used as the primary antibody, and a three-step avidin-biotin complex staining procedure was carried



**Fig. 6.** Effects of kinin antagonists on the histological features in oxazolone-induced atopic dermatitis. Effects of the systemic repeated treatment with the selective B<sub>1</sub> R715 (438 nmol/kg; i.p.) or B<sub>2</sub> HOE140 (50 nmol/kg; i.p.) receptor antagonists, given on days 8, 10, 13 and 15, on the following parameters: stratum corneum area (A), epidermal area (B) or dermal area (C), measured in mm<sup>2</sup>.  $n = 10$ – $15$  mice per group, \* $P < 0.05$  vs vehicle-treated group (one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test). Representative H&E-stained skin sections of the vehicle-treated group (D), oxazolone-treated group (E), oxazolone-treated group pretreated with the B<sub>1</sub> R715 (F) or B<sub>2</sub> HOE140 (G) receptor antagonists. Original magnification  $\times 200$  and  $\times 400$ , scale bar (—) 50  $\mu\text{m}$ . EC, stratum corneum; E, epidermis; D, dermis. Arrows indicate the stratum corneum. Epidermis and dermis are indicated by red and yellow lines, respectively. (OXZ, oxazolone). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

out. The immunopositivity for ADAMT5 was determined by using the NIH Image J 1.50 g Software, under  $\times 200$  magnification. For this purpose, a specific macro was created to quantify the positive areas based on the pixel colour from a slide of the vehicle group, as described elsewhere [25].

#### 2.10. Immunohistochemistry analysis for kinin receptor expression

To assess the expression of kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors, the dorsal skin, the thoracic spinal cord, the dorsal root ganglion (DRG) and the brain of vehicle or oxazolone-challenged mice were collected, and fixed in 10% paraformaldehyde. Four- $\mu\text{m}$  paraffin tissue sections were submitted to a standard three-step immunohistochemistry protocol, using the polyclonal rabbit anti-B<sub>1</sub>R (1:200; ABR-011), or the polyclonal rabbit anti-B<sub>2</sub>R (1:200 (skin, spinal cord and DRG or 1:150 (for brain samples); ABR-012), both from Alomone Labs (Jerusalem, Israel). The immunopositivity for kinin receptors was evaluated as described earlier [26], by using the NIH Image J 1.50 g Software, under  $\times 200$  magnification. For the immunohistochemistry analysis, the whole right and left DRGs of thoracic spinal cord were collected ( $\approx 8$ /mice) and thoroughly evaluated. For the thoracic spinal cord, the analysis was performed considering the immunolabelling of the right and left ventral horn, right and left dorsal horn, and the central canal. For the cortex,

the primary and secondary motor cortices, besides the cingulate cortex, were included in the analysis [27].

#### 2.11. Statistical analysis

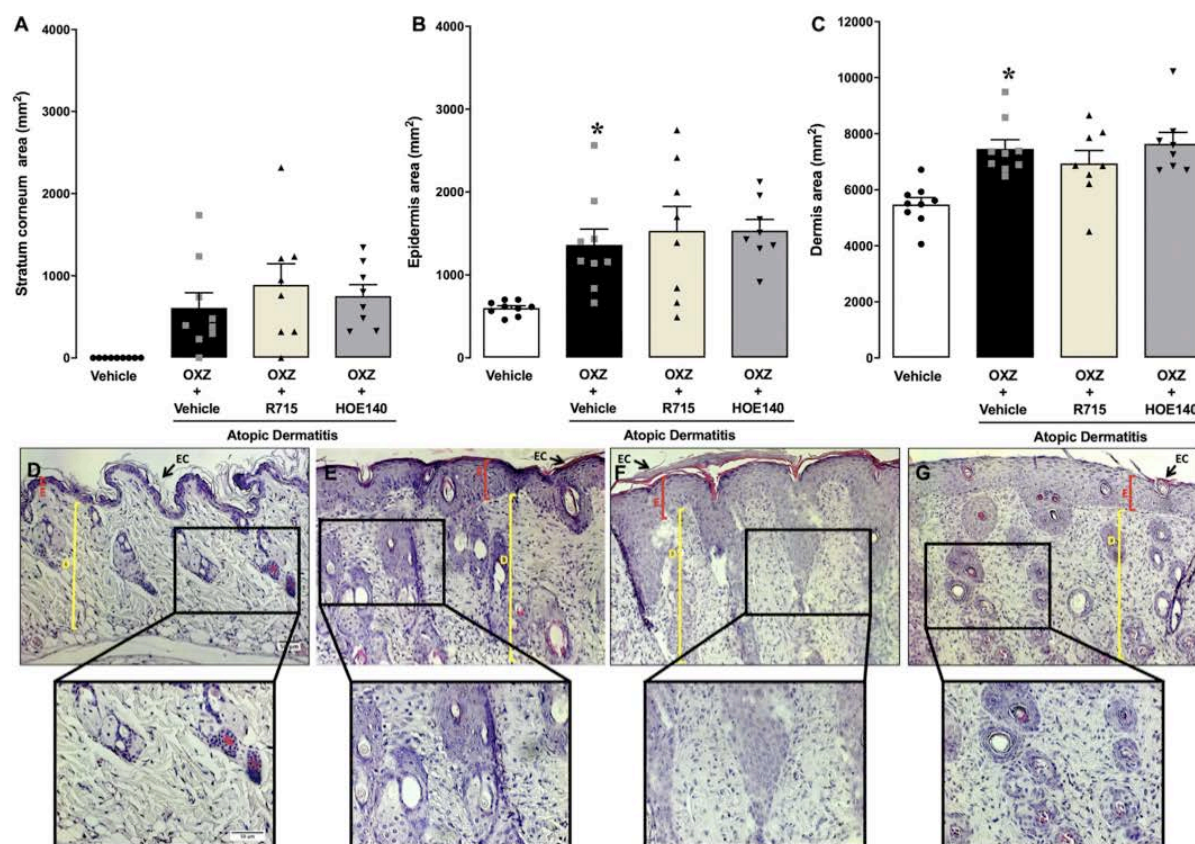
Data is expressed as the mean  $\pm$  SEM. Unpaired student's *t*-test or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the multiple comparisons Bonferroni's test were used. All of the statistical tests and the production of the graphs were performed by using GraphPad 8.0.2 Software (San Diego, CA, USA).  $P < 0.05$  was considered as an indicative of significance.

### 3. Results

#### 3.1. Peripheral and central kinin receptor expression in oxazolone-induced atopic dermatitis

The induction of atopic dermatitis by the repeated application of 0.5% oxazolone in the mouse dorsal skin resulted in a significant up-regulation of either B<sub>1</sub> or B<sub>2</sub> receptors, throughout the epidermis and dermis, according to the evaluation of skin sections by immunohistochemistry (Fig. 1C–F). The immunopositivity for the B<sub>1</sub> receptor was increased by 2.4-fold (Fig. 1A), whereas the B<sub>2</sub> receptor





**Fig. 7.** Effects of kinin antagonists on the skin thickening in oxazolone-induced atopic dermatitis. Effects of the local repeated treatment with the selective B<sub>1</sub> R715 (30 nmol/site; i.d.) or B<sub>2</sub> HOE140 (3 nmol/site; i.d.) receptor antagonists, given on days 10 to 16, on the following parameters: stratum corneum area (A), epidermal area (B) or dermal area (C), measured in mm<sup>2</sup>,  $n = 10$ –15 mice per group, \* $P < 0.05$  vs vehicle-treated group (one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test). Representative H&E-stained skin sections of the vehicle-treated group (D), oxazolone-treated group (E), oxazolone-treated group pre-treated with the B<sub>1</sub> R715 (F) or B<sub>2</sub> HOE140 (G) receptor antagonists. Original magnification  $\times 200$  and  $\times 400$ , scale bar (—) 50  $\mu$ m. EC, stratum corneum; E, epidermis; D, dermis. Arrows indicate the stratum corneum. Epidermis and dermis are indicated by red and yellow lines, respectively. (OXZ; oxazolone). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

immunolabelling was augmented by 2.6-fold (Fig. 1B), in the skin of oxazolone-treated mice, when compared to the vehicle-treated group. The immunohistochemical analysis did not reveal any significant difference for the B<sub>1</sub> or B<sub>2</sub> receptor distribution in the thoracic spinal cord sections of mice that received oxazolone (Fig. 2A–F). However, the repeated application of oxazolone to the mouse dorsal skin elicited a down-regulation of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors in the DRG (Fig. 2G–L), with a significant reduction of the B<sub>1</sub> receptor immunopositivity in the DRG of mice with atopic dermatitis (Fig. 2G). No marked differences for B<sub>1</sub> or B<sub>2</sub> receptor immunolabelling were observed in the brain cortex, after the induction of atopic dermatitis by oxazolone, in comparison to the vehicle-treated controls (Fig. 3A–F).

### 3.2. Effects of kinin receptor antagonists on atopic dermatitis-related scratching behavior

The repeated application of oxazolone into the dorsal mouse skin was associated with a significant increase in the number of scratching bouts (Fig. 4D–F). The acute administration of the selective B<sub>1</sub> R715 (438 nmol/kg) or B<sub>2</sub> HOE140 (50 nmol/kg), both given i.p., failed to significantly alter the scratching behavior elicited by oxazolone (Fig. 4D). A repeated protocol of i.p. administration with R715 (438 nmol/kg), given the day before the last four applications of

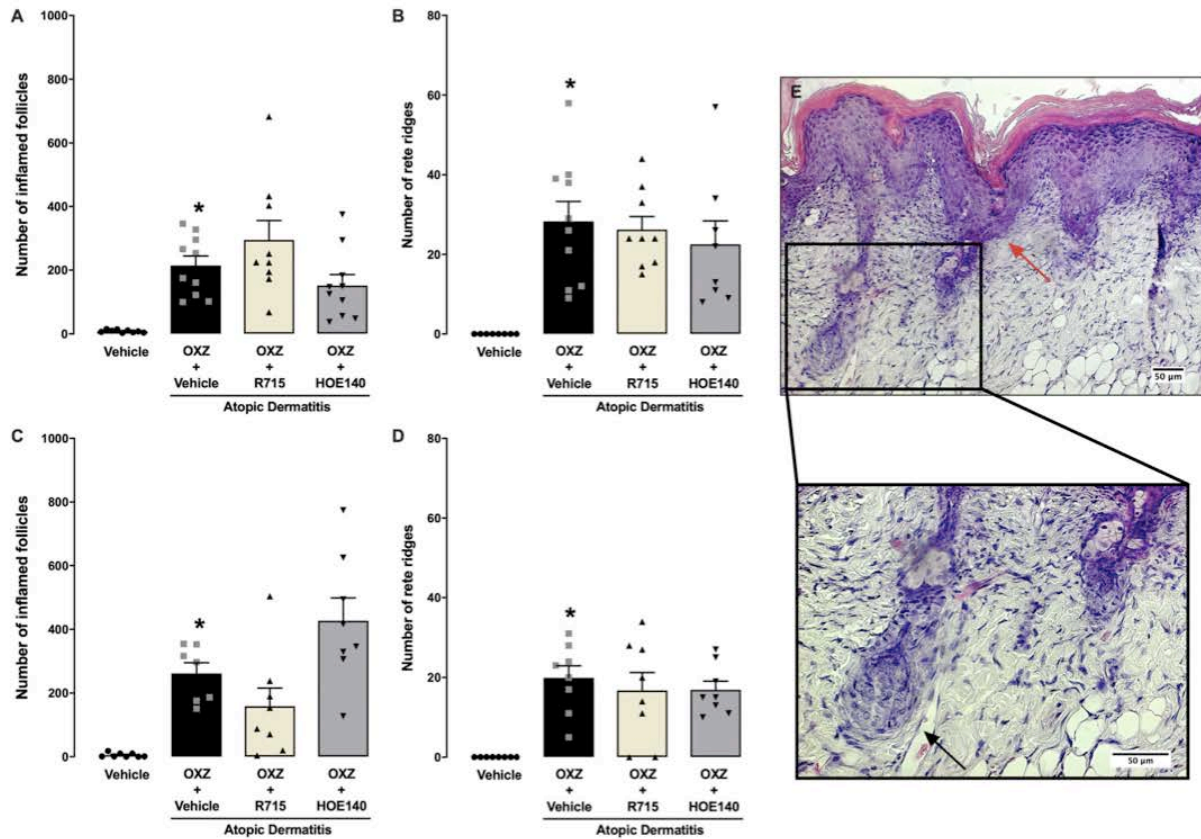
oxazolone, also lacked any significant effect on itching behavior elicited by oxazolone. Alternatively, the repeated treatment with HOE140 (50 nmol/kg) partially reduced the oxazolone-related pruritus ( $P = 0.057$ ; Fig. 4B). Finally, the local i.d. administration of R715 (30 nmol/site) or HOE140 (3 nmol/site), dosed for the last seven days of the protocol of oxazolone-induced atopic dermatitis, did not significantly affect the scratching counts (Fig. 4F).

### 3.3. Skin plasma extravasation and lesion severity indexes

The induction of atopic dermatitis by oxazolone led to a marked increase of plasma extravasation and clinical lesion scores. The repeated i.p. treatment with R715 (438 nmol/kg) or HOE140 (50 nmol/kg) did not significantly change any of the evaluated parameters (Fig. 5A–B; D–F), regardless of a slight reduction of plasma extravasation by R715 (Fig. 5A). The i.d. injection of R715 (30 nmol/site) or HOE140 (3 nmol/site) was not able to modify the lesion severity, according to the clinical evaluation of the dorsal skin (Fig. 5C; G–I).

### 3.4. Histopathological assessment of skin lesion sites

Oxazolone-induced atopic dermatitis was associated with a significant increase of the stratum corneum, epidermis and dermis areas,



**Fig. 8.** Effects of kinin antagonists on the numbers of inflamed follicles and rete ridges. Effects of the systemic repeated treatment with the selective B<sub>1</sub> R715 (438 nmol/kg; i.p.) or B<sub>2</sub> HOE140 (50 nmol/kg; i.p.) receptor antagonists, given on days 8, 10, 13 and 15, in the number of inflamed follicles (A) and rete ridges (B) in the skin. Effects of the local repeated treatment with the selective B<sub>1</sub> R715 (30 nmol/site; i.d.) or B<sub>2</sub> HOE140 (3 nmol/site; i.d.) receptor antagonists, given on days 10 to 16, in the number of inflamed follicles (C) and rete ridges (D) in the skin.  $n = 7-10$  mice per group, \* $P < 0.05$  vs vehicle-treated group; # $P < 0.05$  vs control oxazolone-treated group (one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test). Red and black arrows indicate rete ridges and inflamed follicles, respectively. (OXZ; oxazolone; panel E). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

as an indicative of acanthosis (Figs. 6 and 7). Of note, the application of oxazolone also led to a significant elevation in the numbers of inflamed hair follicles and elongated rete ridges, which might account for the histological changes observed in atopic dermatitis (Fig. 8). The repeated administration of the selective B<sub>1</sub> R715 or B<sub>2</sub> HOE140 receptor antagonists, given i.p. (Fig. 6A-C) or i.d. (Fig. 7A-C) did not significantly alter the skin thickening parameters. The kinin antagonists, given repeatedly i.p. (Fig. 8A-B) or i.d. (Fig. 8C-D) also failed to prevent the hair follicle inflammation or the elongation of rete ridges.

### 3.5. Effects of kinin antagonists in atopic dermatitis cell infiltration

The evaluation of H&E-stained slides revealed a significant increase of the lymphocyte (Fig. 9A-D), eosinophil (Fig. 9B-E) or histiocyte (Fig. 9C-F) counts. The systemic repeated treatment with R715 (538 nmol/kg) or HOE140 (50 nmol/kg), given i.p., was not able to alter the infiltration of inflammatory cells to the skin of mice with atopic dermatitis (Fig. 9A-C). The i.d. repeated injection of R715 (30 nmol/site) or HOE140 (3 nmol/site) failed to prevent the infiltration of lymphocytes (Fig. 9D), whereas HOE140 led to a significant increase of eosinophil numbers (Fig. 9E). Noteworthy, both antagonists markedly prevented the increase of histiocytes induced by oxazolone (Fig. 9F). The percentages of inhibition for this effect were  $78 \pm 7\%$  and  $85 \pm 4\%$ , for R715 and HOE140, respectively.

The mast cell numbers were assessed in toluidine blue-stained slides. As expected, oxazolone triggered a significant increase in the numbers of mast cells, an effect that remained unaffected in animals that received R715 or HOE140 by i.p. (Fig. 10A-E), or i.d. (Fig. 10F-J) routes of administration.

### 3.6. Evaluation of the metalloproteinase ADAMTS5

Immunohistochemical analysis of the expression of ADAMTS5 in skin sections did not show any significant difference between the vehicle- and oxazolone treated mice. The systemic (Fig. 11A) or the local (Fig. 11B) administration of R715 and HOE140 also lacked any significant effect on the expression of this metalloproteinase, except by a reduction of ADAMTS5 immunopositivity in animals that had been treated with HOE140 (50 nmol/kg), by the i.p. route (Fig. 11A).

## 4. Discussion

Atopic dermatitis (also named atopic eczema) is a chronic inflammatory skin disorder presenting intermittent eczematous lesions and intense pruritus, which affects 1/5 of the population living in developed countries [28]. Topical ointments, corticosteroids, and calcineurin inhibitors represent the first line of treatment for atopic dermatitis, although the systemic administration of immunosuppressant

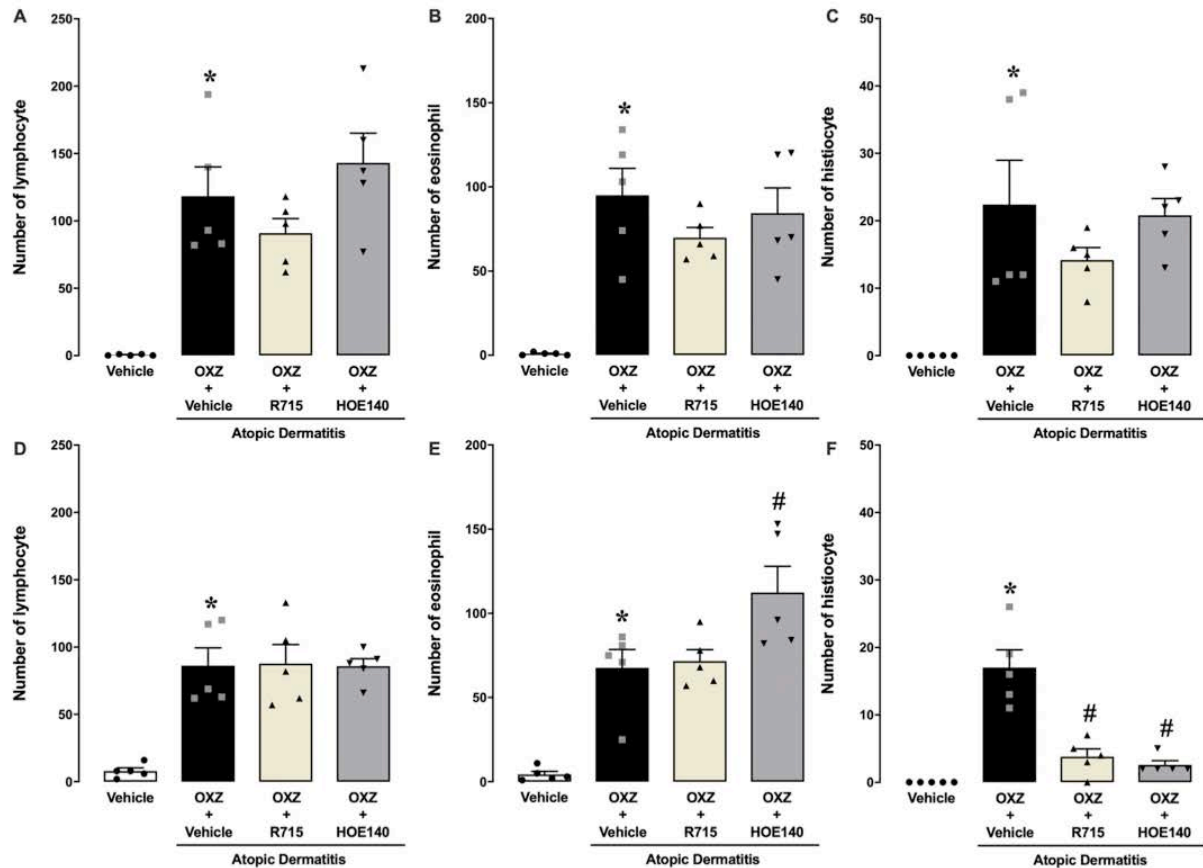


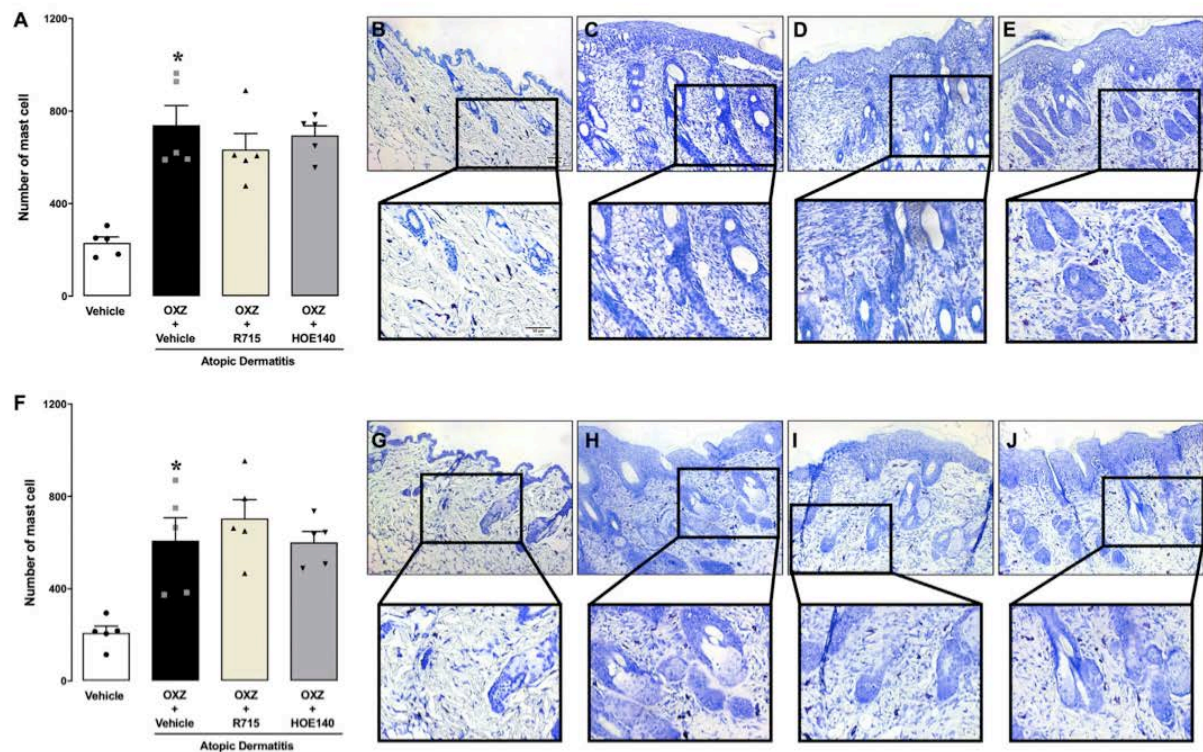
Fig. 9. Effects of kinin antagonists on the inflammatory cell infiltrate in oxazolone-induced atopic dermatitis. Effects of the systemic repeated treatment with the selective B<sub>1</sub> R715 (438 nmol/kg; i.p.) or B<sub>2</sub> HOE140 (50 nmol/kg; i.p.) receptor antagonists, given on days 8, 10, 13 and 15, in the numbers of lymphocytes (A), eosinophils (B) and histiocytes (C) in the skin. Effects of the local repeated treatment with the selective B<sub>1</sub> R715 (30 nmol/site; i.d.) or B<sub>2</sub> HOE140 (3 nmol/site; i.d.) receptor antagonists, given on days 10 to 16, in the number of lymphocytes (D), eosinophils (E) and histiocytes (F) in the skin.  $n = 5$  mice per group, \* $P < 0.05$  vs vehicle-treated group; # $P < 0.05$  vs control oxazolone-treated group (one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test). (OXZ; oxazolone).

drugs is required for refractory cases [29]. Furthermore, a series of biologic agents targeting cytokines, chemokines, IgE and the JAK-STAT pathway, among others, have demonstrated beneficial effects for the management of this condition. However, due to its intricate pathophysiology, atopic dermatitis remains without cure, markedly compromising the life quality of the affected individuals [30].

BK and its receptors have been implicated in several allergy-related conditions (for review see: Ricciardolo et al. [7]), despite the few studies investigating its possible relevance in atopic dermatitis. To our knowledge, only one study demonstrated that BK application into the lesional skin of patients with atopic dermatitis led to an intense pruritic response when compared to a mild reaction in healthy volunteers [9]. Herein, we tested the effects of selective kinin B<sub>1</sub> or B<sub>2</sub> receptor antagonists in a mouse model of atopic dermatitis evoked by the repeated administration of oxazolone to the neck dorsal skin. We have also evaluated whether the induction of atopic dermatitis might lead to central and peripheral alterations of kinin receptor expression.

As discussed above, intense itching sensation is a hallmark of atopic dermatitis, which can aggravate the skin lesions, what is related to the itch-scratch cycle [31,32]. The mechanisms underlying atopic dermatitis-related pruritus are not currently clear, but they likely involve peripheral and central mechanisms of sensitization [30]. Herein, we evaluated to what extent the induction of atopic dermatitis might alter the kinin receptor distribution in peripheral and central sites implicated

in itch transmission, including the skin, spinal cord, DRG and brain cortex [27,33,34]. Our results showed that oxazolone-induced atopic dermatitis was accompanied by a marked increase in the scratching behavior in mice. Of note, the protocols of sensitization and challenge with oxazolone led to a marked upregulation of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors in the lesional skin, allied to downregulation of both receptors in the mouse DRG, according to the assessment by immunohistochemistry. Conversely, the immunopositivity for either kinin receptor remained unaltered in the brain cortex or the thoracic spinal cord of animals with atopic dermatitis. An upregulation of B<sub>1</sub> receptors in the mouse skin, more specifically at keratinocytes, has also been detected after the induction of contact dermatitis by DCP [12], supporting somewhat our data. In our study, both kinin receptors are probably upregulated in keratinocytes in the epidermis, whereas the profuse immunolabelling in the dermis does not permit to conclude that receptor expression is increased in a particular cell type. Thus, kinin receptors might be upregulated in either resident or infiltrating cells in dermis and epidermis of mice submitted to the oxazolone model, although further co-localization experiments are still necessary to confirm this proposition. Concerning the results on DRG, most literature studies demonstrate an upregulation of kinin receptors after the induction of chronic pain [35], instead of a reduction of kinin receptors, as observed by us after oxazolone application. Indeed, we are not able to explain the mechanisms underlying the downregulation of kinin receptors in DRG after



**Fig. 10.** Effects of kinin antagonists on mast cell numbers in oxazolone-induced atopic dermatitis in mice. (A) Effects of the systemic repeated treatment with the selective B<sub>1</sub> R715 (438 nmol/kg; i.p.) or B<sub>2</sub> HOE140 (50 nmol/kg; i.p.) receptor antagonists, given on days 8, 10, 13 and 15, in dermal mast cell numbers. Representative images of toluidine blue-stained skin sections in the vehicle-treated group (B), oxazolone-treated group (C), oxazolone-treated group pre-treated with the B<sub>1</sub> R715 (D) or the B<sub>2</sub> HOE140 (E) receptor antagonists. (F) Effects of the local repeated treatment with the selective B<sub>1</sub> R715 (30 nmol/site; i.d.) or B<sub>2</sub> HOE140 (3 nmol/site; i.d.) receptor antagonists, given on days 10 to 16, in dermal mast cell numbers. Representative images of toluidine blue-stained skin sections in the vehicle-treated group (G), oxazolone-treated group (H), oxazolone-treated group pre-treated with the B<sub>1</sub> R715 (I), or B<sub>2</sub> HOE140 (J) receptor antagonists.  $n = 5$  mice per group, \* $P < 0.05$  vs vehicle-treated group (one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test). Original magnification  $\times 200$  and  $\times 400$ , scale bar (—) 50  $\mu\text{m}$ . (OXZ; oxazolone). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

induction of atopic dermatitis, and further studies on this matter are still required.

Considering the impacts of pruritus in the quality of life of patients with atopic dermatitis, the identification of novel potential tools for treating this issue is of great interest. Thus, we evaluated whether the pharmacological inhibition of kinin receptors might prevent the scratching behavior in the experimental model of oxazolone-induced atopic dermatitis. As a first approach, we tested the effects of the B<sub>1</sub> R715 or B<sub>2</sub> HOE140 receptor antagonists, given in a single i.p. dose, 30 min before the pruritus assessment. In this protocol of treatment, both antagonists failed to alter the oxazolone-induced itching. Considering the chronic pattern of this model, we also evaluated the effects of a repeated protocol of treatment with R715 or HOE140, dosed i.p. Whilst R715 was not able to modify the number of scratching bouts elicited by oxazolone, the administration of HOE140 partially reduced this behavior. Our data corroborate the previous publication by Hayashi and Majima [11] showing that B<sub>2</sub>, but not B<sub>1</sub> receptor antagonists, prevented the itching attacks induced by deoxycholic acid in mice. In our experimental paradigm, the modest effects of HOE140 might be justified by the schedule administration adopted by us: the antagonists were dosed one day before the last four applications of oxazolone, but not at the day of pruritus evaluation. It is tempting to suggest that long-term protocols of treatment with the kinin antagonists might present a superior inhibition. As the first line treatment for atopic dermatitis is centered on topical agents, we also tested to what extent the i.d. repeated treatment with R715 or HOE, dosed every day, during

the last seven days of the oxazolone challenge protocol. Nonetheless, this treatment approach failed to alter the scratching behavior.

To gain further insights into the relevance of kinins in atopic dermatitis, we decided to perform an additional evaluation of the macroscopic and microscopic changes in the skin of mice submitted to the oxazolone model. The sensitization and challenge with oxazolone led to various alterations featuring atopic dermatitis [28], such as middle to severe clinical lesions, besides plasma extravasation. Moreover, a detailed microscopic evaluation revealed an epidermis lichenification and edema, with the dermal infiltration of lymphocytes, eosinophils, histiocytes and mast cells, with the presence of elongated rete ridges and numerous inflamed hair follicles. In relation to the effects of repeated protocols of treatment with B<sub>1</sub> or B<sub>2</sub> receptor antagonists, the i.p. administration of R715 partially reduced the plasma extravasation, whereas the i.d. application of either R715 or HOE140 markedly reduced the number of histiocytes. A clinical study demonstrated that histiocytes are the second most predominant cell population in atopic dermatitis, according to the evaluation of the lesional skin of ten patients [36]. Thus, the reduction of this cell population by the local application of B<sub>1</sub> or B<sub>2</sub> kinin antagonists in oxazolone-treated mice deserves further investigation, by using flow cytometry and specific markers. The other evaluated parameters were not modified by R715 or HOE140, in either protocol of systemic or local repeated administration. Again, this might be an indicant ion that additional experiments using long-term treatment protocols with kinin antagonists are required. These schedules of treatment must include not only additional

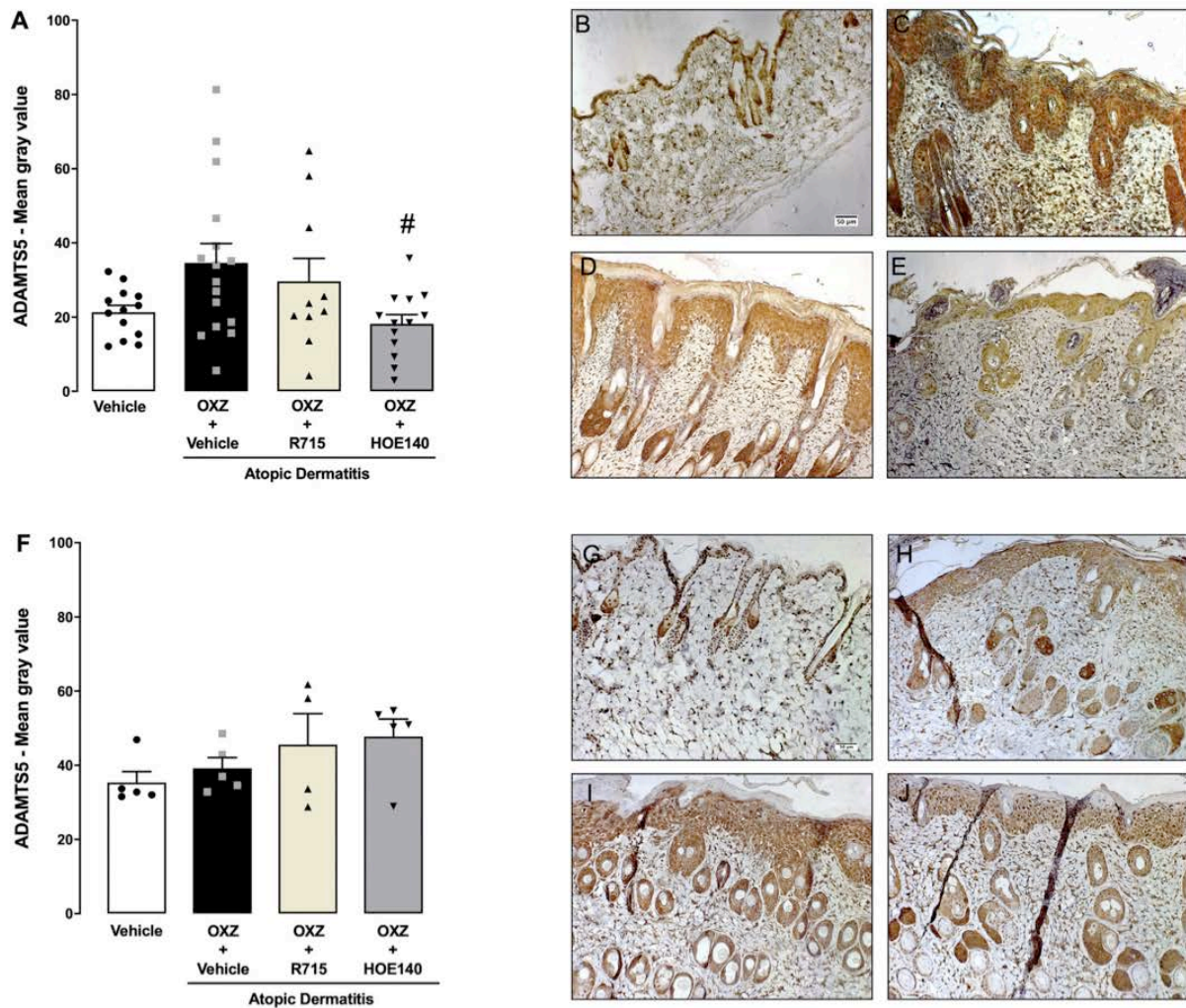


Fig. 11. Immunopositivity for the metalloproteinase ADAMTS5 in the skin of mice submitted to the model atopic dermatitis by oxazolone. (A) Effects of the systemic repeated treatment with the selective B<sub>1</sub> R715 (438 nmol/kg; i.p.) or B<sub>2</sub> HOE140 (50 nmol/kg; i.p.) receptor antagonists, given on days 8, 10, 13 and 15, in the immunolabelling for ADAMTS5 in the skin. Representative images of ADAMTS5 immunopositivity in the vehicle-treated group (B), oxazolone-treated group (C), oxazolone-treated group pre-treated with the B<sub>1</sub> R715 (D) or B<sub>2</sub> HOE140 (E) receptor antagonists (original magnification  $\times 200$ ). (F) Effects of the local repeated treatment with the selective B<sub>1</sub> R715 (30 nmol/site; i.d.) or B<sub>2</sub> HOE140 (3 nmol/site; i.d.) receptor antagonists, given on days 10 to 16, in the immunolabelling for ADAMTS5 in the skin. Representative images of ADAMTS5 immunopositivity in the vehicle-treated group (G), oxazolone-treated group (H), oxazolone-treated group pre-treated with the B<sub>1</sub> R715 (I) or B<sub>2</sub> HOE140 (J) receptor antagonists. Original magnification  $\times 200$ , scale bar (—) 50  $\mu\text{m}$ .  $n = 5\text{--}16$  mice per group,  $\#P < 0.05$  vs oxazolone-treated group (one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test). (OXZ; oxazolone).

days of treatment along the induction of atopic dermatitis by oxazolone, but also the administration of antagonists twice a day, or even the combined treatment with B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> kinin receptor antagonists. Alternatively, the use of non-peptide, instead of peptide antagonists could represent an interesting strategy. An intriguing result showed a significant elevation of eosinophil numbers in oxazolone-treated mice that received the B<sub>2</sub> antagonist HOE140 i.d. A similar effect has been demonstrated before in a mouse model of lung inflammation elicited by ovalbumin in mice, in which the treatment with HOE140 led to an increase of eosinophils in the bronchoalveolar lavage fluid [37].

ADAMTS5 is a metalloproteinase present in the skin of humans and mice, which has been linked with the process of dermal wound healing [38]. Herein, the immunopositivity of this enzyme was slightly, but not significantly increased in the skin of oxazolone-treated mice, in comparison to the vehicle group. The hair shaving could explain the

absence of great differences between these two groups. However, the i.p. repeated treatment with HOE140 promoted a significant reduction of ADAMTS5 immunolabelling in oxazolone-treated animals. One might conclude that this effect correlates with the mild anti-pruritic effects observed for HOE140 dosed at the same treatment scheme. Thus, a reduction of scratching bouts might ameliorate the eczematous lesions in oxazolone-induced atopic dermatitis, as indicated by the reduced ADAMTS5 expression in animals pre-treated with HOE140, but not R715.

Collectively, the present study shows a comprehensive characterization of the mouse model of atopic dermatitis, induced by oxazolone application into the neck dorsal skin. Additionally, we have observed an upregulation of kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors in the skin of oxazolone-treated mice, with a reduction of both receptors in the DRG. This is a clue indicating the relevance of the kinin system in atopic dermatitis

pathology. Regarding the treatment with the kinin antagonists, the effects were quite modest and distinct for B<sub>1</sub> or B<sub>2</sub> receptor antagonists, also showing different actions depending on the route of administration, i.e., dosed i.p. or i.d. Thus, it is possible to assume that B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors might display distinct roles in atopic dermatitis and that repeated administration i.p. reaches sites of action that are not affected by i.d. administration, an vice-versa. An example of that is the reduction of pruritus by HOE140 given i.p. vs the marked reduction of histiocytes by the i.d. administration of either antagonist. Nevertheless, these hypotheses remain to be confirmed by additional studies, with different schemes of treatment with kinin antagonists and the investigation of in-depth mechanisms by the use of other techniques, such as flow cytometry and ELISA.

### Acknowledgements

We would like to thank Mrs. Janaína Pasetti Nunes for her valuable technical assistance in histological processing (Laboratory of Oral Pathology/PUCRS). We also thank the staff of the Centre of Experimental Biological Models (CeMBE/PUCRS) for animal care. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) Finance Code 001, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), in addition to a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) research grant “Expansão da Infraestrutura Multiusuária de Pesquisa na PUCRS (MULTIPUCRS)” # 01.13.0292-00 (Brazil). P.B.P., R.D.S.F. and A.P.A.D. are a PhD student receiving grants from CAPES. M.M.C. (CNPq) is Research Career Awardees of CNPq. This work received financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS; grant number 17/2551-0001057-4), Brazil.

### References

- [1] J. Calixto, D. Cabrini, J. Ferreira, M. Campos, Kinins in pain and inflammation, *Pain*. 87 (2000) 1–5.
- [2] R.C. Dutra, Kinin receptors: key regulators of autoimmunity, *Autoimmun. Rev.* 16 (2017) 192–207, <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2016.12.011>.
- [3] A. Kaplan, K. Joseph, M. Silverberg, Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease, *J. Allergy Clin. Immunol.* 109 (2002) 195–209, <https://doi.org/10.1067/mai.2002.121316>.
- [4] R. Costa, D. Marotta, M. Manjavachi, E. Fernandes, J. Lima-Garcia, A. Paszcuk, N. Quintão, L. Juliano, S. Brain, J. Calixto, Evidence for the role of neurogenic inflammation components in trypsin-elicited scratching behaviour in mice, *Br. J. Pharmacol.* 154 (2008) 1094–1103, <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.172>.
- [5] M. El-Kady, Z. Girgis, E. Abd El-Rasheed, O. Shaker, M. Attallah, A. Soliman, Role of selective blocking of bradykinin receptor subtypes in attenuating allergic airway inflammation in Guinea pigs, *Eur. J. Pharmacol.* 788 (2016) 152–159, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.06.024>.
- [6] M. Guilarte, A. Sala-Cunill, O. Luengo, M. Labrador-Horrillo, V. Cardona, The mast cell, contact, and coagulation system connection in anaphylaxis, *Front. Immunol.* 8 (2017) 1–6, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00846>.
- [7] F.L.M. Ricciardolo, G. Folkerts, A. Folino, B. Mognetti, Bradykinin in asthma: modulation of airway inflammation and remodelling, *Eur. J. Pharmacol.* 827 (2018) 181–188, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.03.017>.
- [8] A. Kanani, S.D. Betschel, R. Warrington, Urticaria and angioedema, *Allergy, Asthma Clin. Immunol.* 14 (2018) 1–13, <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0288-z>.
- [9] M. Hosogi, M. Schmelz, Y. Miyachi, A. Ikoma, Bradykinin is a potent pruritogen in atopic dermatitis: a switch from pain to itch, *Pain* 126 (2006) 16–23, <https://doi.org/10.1016/j.pain.2006.06.003>.
- [10] J. Liang, Y. He, W. Ji, Bradykinin-evoked scratching responses in complete Freund's adjuvant-inflamed skin through activation of B1 receptor, *Exp. Biol. Med.* 237 (2012) 318–326, <https://doi.org/10.1258/ebm.2011.011308>.
- [11] I. Hayashi, M. Majima, Reduction of sodium deoxycholic acid-induced scratching behaviour by bradykinin B2 receptor antagonists, *Br. J. Pharmacol.* 126 (1999) 197–204.
- [12] Y. Liu, J. Liu, M. Li, S. Dai, J. Liang, W. Ji, The effect of kinin B1 receptor on chronic itching sensitization, *Mol. Pain* 11 (2015) 1–9, <https://doi.org/10.1186/s12990-015-0070-x>.
- [13] Y. Tsukumo, D. Harada, H. Manabe, Pharmacological characterization of itch-associated response induced by repeated application of Oxazolone in mice, *J. Pharmacol. Sci.* 262 (2010) 255–262, <https://doi.org/10.1254/jphs.10050FP>.
- [14] M.M. Campos, J.B. Calixto, Involvement of B1 and B2 receptors in bradykinin-induced paw oedema, *Br. J. Pharmacol.* 114 (1995) 1005–1013.
- [15] E. Fernandes, G. Passos, M. Campos, J. Araújo, J. Pesquero, M. Avellar, M. Teixeira, J. Calixto, Mechanisms underlying the modulatory action of platelet activating factor (PAF) on the upregulation of kinin B1 receptors in the rat paw, *Br. J. Pharmacol.* 139 (2003) 973–981, <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705314>.
- [16] J. Ferreira, K. Trichês, R. Medeiros, J. Calixto, Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase c activation in mice, *Pain* 117 (2005) 171–181, <https://doi.org/10.1016/j.pain.2005.06.001>.
- [17] N.L.M. Quintão, G.F. Passos, R. Medeiros, A.F. Paszcuk, F.L. Motta, J.B. Pesquero, M.M. Campos, J.B. Calixto, Neuropathic pain-like behavior after brachial plexus avulsion in mice: the relevance of Kinin B1 and B2 receptors, *J. Neurosci.* 28 (2008) 2856–2863, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4389-07.2008>.
- [18] I.S. Maciel, V.M. Azevedo, T.C. Pereira, M.R. Bogo, A.H. Souza, M.V. Gomez, M.M. Campos, The spinal inhibition of n-type voltage-gated CALCIUM CHANNELS selectively prevents scratching behavior in mice, *Neuroscience* 277 (2014) 794–805, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.07.065>.
- [19] S.Y. Kang, H.W. Jung, J.H. Nam, W.K. Kim, J. Kang, Y. Kim, C. Cho, C.W. Cho, Y. Park, H.S. Bae, Effects of the fruit extract of *Tribulus terrestris* on skin inflammation in mice with Oxazolone-induced atopic dermatitis through regulation of Calcium Channels, Orai-1 and TRPV3, and mast cell activation, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2017 (2017) 1–12, <https://doi.org/10.1155/2017/8312946>.
- [20] P.J.S. Pereira, F.N. Dornelles, D.S. Santos, J.B. Calixto, F.B. Morrone, M.M. Campos, Nociceptive and inflammatory responses induced by formalin in the orofacial region of rats: effect of anti-TNF  $\alpha$  strategies, *Int. Immunopharmacol.* 9 (2009) 80–85, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.10.001>.
- [21] D. Whiting, Histopathologic features of alopecia areata: a new look, *Arch. Dermatol.* 139 (2003) 1555–1559, <https://doi.org/10.1001/archderm.139.12.1555>.
- [22] K. Jung, Y. Lee, Y. Ryu, J. Kim, H. Kim, B. Kim, H. Kang, Y. Park, Effects of topically applied rapamycin and mycophenolic acid on TNCB-induced atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice, *Int. Immunopharmacol.* 26 (2015) 432–438, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.03.007>.
- [23] Y. Hwang, B. Chang, T. Kim, S. Kim, Ameliorative effects of green tea extract from tannase digests on house dust mite antigen-induced atopic dermatitis-like lesions in NC/Nga mice, *Arch. Dermatol. Res.* (2019), <https://doi.org/10.1007/s00403-018-01886-6>.
- [24] L. Togni, M.C. De Abreu, A.H. Augustin, R.S.M. Braccini, M.M. Campos, Characterization of a rat model with temporomandibular joint osteoarthritis following a surgical anterior disc displacement, *Am. J. Transl. Res.* 10 (2018) 3806–3817.
- [25] R.D.S. Freitas, K.M. Costa, N.F. Nicoletti, L.W. Kist, M. Bogo, M. Campos, Omega-3 fatty acids are able to modulate the painful symptoms associated to cyclophosphamide-induced-hemorrhagic cystitis in mice, *J. Nutr. Biochem.* 27 (2016) 219–232, <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.09.007>.
- [26] N. Nicoletti, J. Sánchez, V. da Silva, M. Roxo, N. Ferreira, R. de Moraes, J. Pesquero, M. Campos, R. Couture, F. Morrone, Primary role for Kinin B1 and B2 receptors in glioma proliferation, *Mol. Neurobiol.* 54 (2017) 7869–7882, <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0265-9>.
- [27] J.S. Lee, J.S. Han, K. Lee, J. Bang, H. Lee, The peripheral and central mechanisms underlying itch, *BMB Rep.* 49 (2016) 474–487.
- [28] S. Weidinger, N. Novak, Atopic dermatitis, *Lancet.* 387 (2015) 1109–1122, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00149-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00149-X).
- [29] S. Kapur, W. Watson, S. Carr, Atopic dermatitis, *Allergy, Asthma Clin. Immunol.* 14 (2018), <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0281-6>.
- [30] A. Otsuka, T. Nomura, P. Rerknimitr, J.A. Seidel, T. Honda, K. Kabashima, The interplay between genetic and environmental factors in the pathogenesis of atopic dermatitis, *Immunol. Rev.* 278 (2017) 246–262, <https://doi.org/10.1111/imr.12545>.
- [31] G. Yosipovitch, A. Papoiu, What causes itch in atopic dermatitis? *Curr Allergy Asthma Rep* 8 (2008) 306–311.
- [32] M.R. Mack, B.S. Kim, The itch-scratch cycle: a Neuroimmune perspective, *Trends Immunol.* 39 (2018) 980–991, <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.10.001>.
- [33] R. LaMotte, X. Dong, M. Ringkamp, Sensory neurons and circuits mediating itch, *Nat. Rev. Neurosci.* 15 (2014) 19–31, <https://doi.org/10.1038/nrn3641>.
- [34] G. Yosipovitch, J.D. Rosen, T. Hashimoto, Itch: from mechanism to (novel) therapeutic approaches, *J. Allergy Clin. Immunol.* 142 (2018) 1375–1390, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.09.005>.
- [35] M. Petcu, J.P. Dias, B. Ongali, G. Thibault, W. Neugebauer, R. Couture, Role of kinin B1 and B2 receptors in a rat model of neuropathic pain, *Int. Immunopharmacol.* 8 (2008) 188–196, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2007.09.009>.
- [36] M.R.A. Hussein, W.M. Abdel-magid, R. Saleh, E. Nada, Phenotypic characteristics of the immune cells in allergic contact dermatitis, atopic dermatitis and pityriasis rosea, *Pathol. Oncol. Res.* 15 (2009) 73–79, <https://doi.org/10.1007/s12253-008-9103-3>.
- [37] R.G. Landgraf, A.A. Steil, P. Sirois, S. Jancar, Modulation of allergic and immune complex-induced lung inflammation by bradykinin receptor antagonists, *Inflamm. Res.* 53 (2004) 78–83, <https://doi.org/10.1007/s00011-003-1226-0>.
- [38] J. Velasco, J. Li, L. DiPietro, M. Stepp, J. Sandy, A. Plaas, Adamts5 deletion blocks murine dermal repair through CD44-mediated aggrecan accumulation and modulation of transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) signaling, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 26016–26027, <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.208694>.

## 2.2 RESULTADOS ADICIONAIS

Durante a realização dos experimentos, também foi investigada a relação entre os receptores de cininas e o prurido agudo induzido pela aplicação intratecal de GRP em camundongos. Para tal, foi realizada a administração de diferentes doses de agonistas e antagonistas do GRPR e dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para as cininas, por diferentes vias. Nesses experimentos, foram utilizados camundongos machos CF-1 (25 a 30g), provenientes do Centro de Modelos Biológicos Experimentais (CeMBE, PUCRS; Porto Alegre, RS). Os animais foram mantidos no Vivário do Prédio 14, da PUCRS em microisoladores (marca Tecniplast<sup>®</sup>) até atingirem o peso desejado, com temperatura controlada (22±1°C) e ciclo claro-escuro de 12h (luzes acesas a partir das 7h; luzes apagadas a partir das 19h). Os animais foram mantidos em grupos de quatro em gaiolas apropriadas para roedores, preenchidas com forragem para esses. Os animais receberam ração peletizada e água filtrada *ad libitum*.

Os experimentos foram conduzidos no CeMBE, localizado Prédio 14, da PUCRS. Durante os procedimentos experimentais, a temperatura do laboratório foi mantida em 22±1°C. Foi utilizado um tempo mínimo de adaptação ao novo ambiente de pelo menos 1h. Para eutanásia, foi utilizada a inalação com sevoflurano, método altamente recomendado, que apresenta rapidez e eficácia. Os procedimentos experimentais seguiram as recomendações para o cuidado com animais de laboratório e normas éticas para a experimentação em animais conscientes, do Guia de Uso e Cuidado com Animais Laboratoriais do *National Institutes of Health* (NIH) dos Estados Unidos da América. Foram respeitados os preceitos apresentados na Lei Nº 11.794, de 9 de outubro de 2008 e na Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos, do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (15/00489) (ANEXO B).

Para indução do comportamento de coçar (*scratching behavior*), foi utilizada a metodologia previamente descrita na literatura<sup>64,69,70,125,126</sup>. Dois dias antes da realização dos experimentos, os animais tiveram o dorso tricotomizado com um depilador elétrico (PHILIPS SERIES 3000). No dia dos experimentos, os animais foram colocados individualmente em funis de vidro invertidos, posicionados em frente a um espelho, para auxiliar a visualização completa, nos quais foram aclimatizados por pelo menos 60min antes da indução do comportamento de coçar. Após esse período de habituação, cada animal foi removido brevemente e injetado por via intratecal (i.t.) com 6µl de PBS contendo GRP 1nmol/sítio. O GRP (*CAS Number* 130308-48-4) foi obtido com a *Tocris Bioscience* (Bristol, UK).

Imediatamente após a injeção, os animais foram devolvidos ao funil e observados durante um período de 60min. O comportamento de coçar foi quantificado pela contagem do número de acessos de coceira com as patas dianteiras e/ou traseiras próximos à região dorsal do pescoço. Para as patas dianteiras, foram considerados apenas os acessos de coceira atrás das orelhas (região do pescoço), mas não sobre as orelhas ou a face. Os resultados foram contabilizados como número de acessos de coceira em 60min.

Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média. A análise estatística dos resultados foi realizada por meio do teste *one-way* ANOVA, seguido pelo Teste de Comparação Múltipla de Bonferroni. Valores de *P* menores do que 0,05 foram considerados como indicativos de significância. Os gráficos foram elaborados utilizando o software GraphPad Prism® 8.0.

O agonista do B<sub>1</sub>R (des-Arg<sup>9</sup>-BK) e agonista do B<sub>2</sub>R (BK) foram administrados pela via i.t. para verificar se a coadministração desses poderia potencializar o prurido induzido por baixas doses de GRP. Conforme mostra a tabela 1, O GRP na dose de 0.3nmol/sítio aumentou os acessos de coceira, já a coadministração de diferentes doses dos agonistas dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de cininas com GRP não foi capaz de potencializar os acessos de coceira.



**Tabela 1** – Associação dos agonistas dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de cininas e GRPR

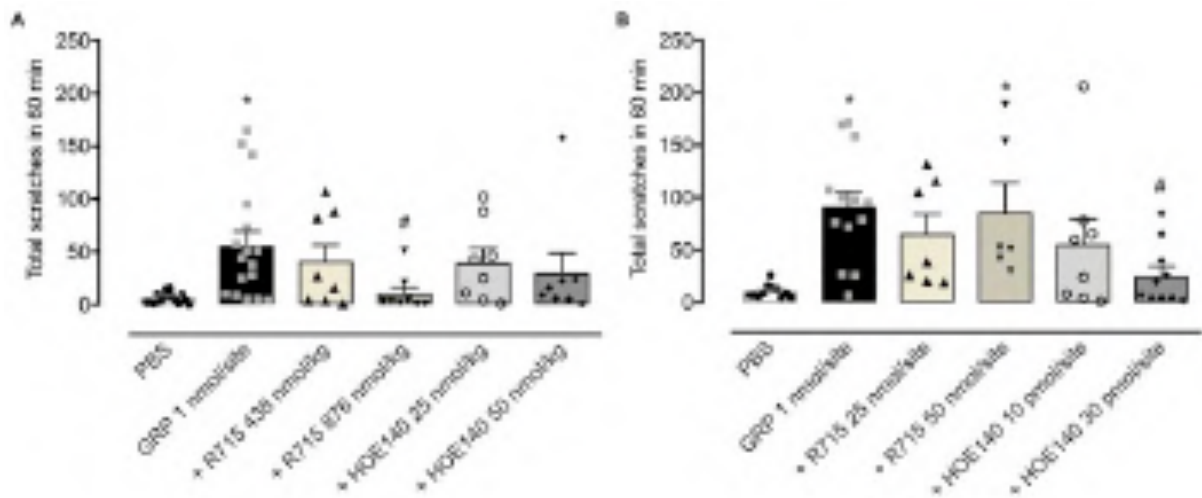
Biological peptides	No. of scratching bouts
PBS	11 ± 1,165
GRP 0,1nmol	46,33 ± 13,05
GRP 0,3nmol	96 ± 21,83*
Des-Arg <sup>9</sup> -BK 1nmol	13,2 ± 2,939
Des-Arg <sup>9</sup> -BK 3nmol	7 ± 2,041
BK 0,3nmol	12,6 ± 5,288
BK 1nmol	6,25 ± 2,462
GRP 0,1nmol associated BK 0,3nmol	35,67 ± 8,425
GRP 0,1nmol associated Des-Arg <sup>9</sup> -BK 1nmol	13 ± 1,958
GRP 0,3nmol associated BK 1nmol	10,67 ± 3,774
GRP 0,3nmol associated Des-Arg <sup>9</sup> -BK 3nmol	39,5 ± 26,58

Número total dos acessos de coceira após a injeção (i.t.) de diferentes peptídeos biológicos. O dado representa a média e o erro padrão da média.  $n=4-8$  camundongos por grupo. \* $P<0.05$ , foi significativamente diferente do grupo PBS.

A administração sistêmica do antagonista dos receptores B<sub>1</sub>, o R715 (876nmol/kg; 30min antes do GRP), produziu uma redução estatisticamente significativa do comportamento de coçar causado pelo GRP (Figura 1A). Já a dose mais baixa de R715 (438nmol/kg) e ambas doses de HOE140 (25nmol/kg e 50nmol/kg) não modificaram os acessos de coceira dos animais de forma significativa.

A coadministração (i.t.) de GRP (1nmol/sítio) com HOE140 (30pmol/sítio), entretanto, apresentou uma redução estatisticamente significativa dos acessos de coceira (Figura 1B). Contudo, a coadministração de GRP com R715 (25nmol/sítio ou 50nmol/sítio) ou HOE140 (10pmol/sítio) não modificou o comportamento de coçar.

**Figura 1** - Acessos de coceira em modelo de prurido agudo induzido por GRP



Número total dos acessos de coceira induzido por GRP (1nmol/sítio, i.t.) associado ao (A) tratamento i.p. com os antagonistas dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de cininas, o R715 (438nmol/kg ou 876nmol/kg, i.p.) e o HOE140 (25nmol/kg ou 50nmol/kg, i.p.), respectivamente; ou (B) coadministrados com os antagonistas dos receptores B<sub>1</sub> (R715, 25nmol/sítio ou 50nmol/sítio, i.t.) e B<sub>2</sub> (HOE140, 10pmol/sítio ou 30pmol/sítio, i.t.). Cada coluna representa a média e as barras verticais representam o erro padrão da média. \* $P < 0.05$ , foi significativamente diferente do grupo PBS; # $P < 0.05$ , foi significativamente diferente do grupo GRP.

Os resultados do presente estudo indicam que os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de cininas estão envolvidos com a sensação pruriginosa induzida pelo GRP, confirmando os dados prévios da literatura que indicam a participação do sistema cininérgico com modelos de prurido induzido por CFA<sup>105,106,127</sup>, DCP<sup>101</sup> e por tripsina ou SLIGRL-NH<sub>2</sub><sup>102</sup>. Entretanto, considerando os resultados apresentados, os receptores B<sub>2</sub> parecem estar envolvidos nos efeitos do GRP ao nível espinhal, enquanto o sítio de ação dos receptores B<sub>1</sub> ainda precisa ser melhor investigado.

Em um trabalho publicado em 1999, os acessos de coceira induzidos pelo ácido deoxicólico em camundongos foram revertidos após a administração subcutânea do HOE140, assim como pelo FR173657, administrado por via oral, ambos antagonistas dos receptores B<sub>2</sub><sup>103</sup>. Corroborando esses achados, camundongos *knockout* para os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> apresentaram uma redução da sensação pruriginosa induzida por tripsina e SLIGRL-NH<sub>2</sub>,

ambas moléculas ativadoras de PAR-2, bem como pelo composto 48/80, que leva a degranulação de mastócitos. Já o prurido induzido por ácido deoxicólico e por cloroquina demonstrou ter relação apenas com os receptores B<sub>2</sub>. Além disso, a injeção intraperitoneal do antagonista dos receptores B<sub>1</sub>, SSR240612 (mas não o antagonista peptídico, des-Arg<sup>9</sup>-Leu<sup>8</sup>-BK), da mesma forma que os antagonistas do B<sub>2</sub>R, HOE140 ou FR173657, reduziram o comportamento de coçar induzido por tripsina e SLIGRL-NH<sub>2</sub><sup>102,104</sup>. No trabalho de Feng e colaboradores<sup>127</sup>, os autores afirmam que os receptores de cininas podem apresentar resultados diferentes em um modelo de prurido induzido por CFA. Em seu estudo, eles demonstraram que o antagonista do receptor B<sub>1</sub>, o R892, fora capaz de reduzir os acessos de coceira, ao passo que o antagonista do receptores B<sub>2</sub>, o HOE140, provocara um aumento da resposta pruriceptivas.

O presente trabalho é o primeiro estudo que investiga a participação dos receptores cininérgicos no prurido induzido pela aplicação i.t. de GRP. Nesse modelo, a participação dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> parece diferir em comparação com modelos de prurido induzidos pela aplicação intradérmica de agentes indutores de coceira.

Para melhor avaliar a relação entre o sistema cininérgico e o GRPR, foi verificada a expressão dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de cininas em um modelo de dermatite atópica, induzida por aplicações repetidas de oxazolona, associado ao tratamento crônico com antagonista do GRPR, o PD176252, na dose de 5mg/kg, pela via i.p.. Para indução de dermatite atópica, os animais foram sensibilizados por uma aplicação tópica de oxazolona 0,5% (10µl/sítio). Sete dias depois (dia 0), foi iniciado o protocolo de desafio, através da aplicação da mesma quantidade de oxazolona, em intervalos de 2-3 dias, por 16 dias (dias 2, 4, 7, 9, 11, 14 e 16). O antagonista do GRPR, PD176252 (5mg/kg), foi administrado por via i.p. nos dias 8, 10, 13 e 15. Os animais controle receberam solução salina (NaCl 0,9%) pela mesma vias de

administração. No dia seguinte à última aplicação da oxazolona, os animais foram eutanasiados e as amostras de pele foram coletadas para análise de imunistoquímica.

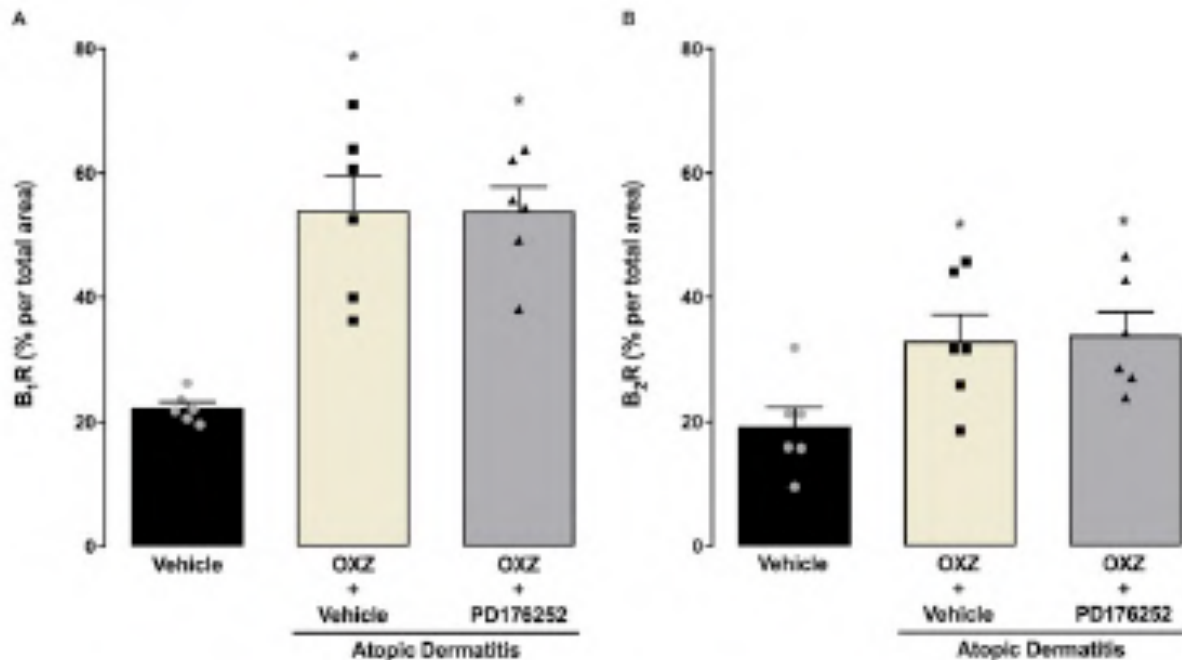
Para essa análise, os cortes teciduais foram realizados com espessura de 5µm, montados sobre lâminas preparadas com solução de ATPS (3-aminopropyltriethoxysilene; Sigma-Aldrich) a 5%, em acetona PA, e mantidas em estufa (50°C) durante 1h para fixação dos cortes. Após fixação, os cortes foram desparafinizados em xilol e re-hidratados por passagens sucessivas em etanol em concentrações decrescentes (etanol absoluto, etanol 90%, 80% e 70%). Com o objetivo de eliminar reações inespecíficas falso-positivas, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena. Para tanto, as lâminas foram imersas em solução de peróxido de hidrogênio 1,5% e metanol absoluto (v/v), por 20min, com posterior lavagem com água destilada. Previamente à incubação com os anticorpos primários, as lâminas foram submetidas ao tratamento para reativação antigênica com a finalidade de recuperar os sítios antigênicos mascarados pela fixação e inclusão do tecido em formol e parafina. Para este fim, foi utilizada uma solução composta por 180ml de ácido cítrico 0,1M e 820ml de citrato de sódio 0,1M (pH 6,0). As lâminas foram imersas nessa solução de reativação antigênica diluída 1:10 em água destilada e mantidas em banho-maria ajustado para 95–98°C, durante 45min. Logo após, ainda como parte do processo térmico de reativação antigênica, as lâminas foram retiradas do banho-maria, mantidas durante 20min em temperatura ambiente e lavadas com água destilada. Após a lavagem das lâminas, as mesmas foram submersas em PBS. A imunodeteção foi realizada utilizando o anticorpo policlonal *anti-B<sub>1</sub> Bradykinin Receptor* (Alomone Labs, Jerusalém, Israel) e o anticorpo policlonal *anti-B<sub>2</sub> Bradykinin Receptor* (Alomone labs, Jerusalem, Israel). A solução contendo o anticorpo foi adicionada sobre os cortes teciduais e as lâminas foram mantidas em câmara úmida (2–8°C), de 12 a 16h. A seguir, as lâminas foram lavadas com tampão PBS em temperatura ambiente. Após a lavagem, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG/IgM conjugado com

um polímero de peroxidase (En Vision Plus; Dako Cytomation) em câmara úmida, durante 1h, em temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizadas duas lavagens com PBS por 5min, em temperatura ambiente. As amostras foram submetidas a uma revelação colorimétrica com kit comercial (Dako Cytomation), através de uma solução cromógena contendo 0,03% de 3,3'-diaminobenzidina (3,3,4,4'-tetraaminobiphenyltetrahydrochloride), previamente diluída em tampão imidazol (pH 7,2) e peróxido de hidrogênio a 0,3%. Após a revelação, foi realizada a contra-coloração das lâminas com solução de hematoxilina de Harris, desidratação através de passagem das lâminas em concentrações crescentes de etanol (etanol 70%, 80%, 90% e etanol absoluto), diafanização em xilol e montagem em Entellan (Merck, SP, Brasil). Para cada reação foi utilizado um controle negativo na ausência do anticorpo primário<sup>69</sup>.

As imagens foram obtidas através do Microscópio *Zeiss Axio Imager M2* (Carl Zeiss, Gottingen, Germany). As figuras digitalizadas foram transferidas para um computador e a análise das mesmas foi realizada através do programa NIH ImageJ 1.36b (National Institutes of Health, Maryland, EUA), em que o plug-in *Immunohistochemistry Image Analysis Toolbox* foi utilizado para detectar a marcação dos anticorpos. Em seguida, uma nova imagem era criada, apenas com a marcação de interesse, e a área positiva para o anticorpo era registrada, gerando um percentual da área total positiva para os receptores B<sub>1</sub> ou B<sub>2</sub> de cininas.

Como mostra a figura 2, o modelo de dermatite atópica aumentou a expressão dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de cininas. Entretanto, o tratamento crônico com o PD176252, na dose de 5mg/kg, não foi capaz de reverter o quadro.

**Figura 2** - Expressão cutânea dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de cininas após o tratamento crônico com PD176252 (5mg/kg)



Percentual da área positiva para a marcação do (A) receptor B<sub>1</sub> de cininas e do (B) receptor B<sub>2</sub> de cininas. Cada coluna representa a média dos animais e as barras verticais representam o erro padrão da média. \* $P < 0.05$ , foi significativamente diferente do grupo PBS; # $P < 0.05$ , foi significativamente diferente do grupo GRP.

Foi demonstrado em pacientes com dermatite atópica que a ionização<sup>4</sup> de BK nas lesões cutâneas é capaz de aumentar a sensação pruriginosa<sup>18</sup> e que há relação entre o sistema cininérgico com modelos de dermatite de contato induzido por DCP<sup>101</sup>. Em adição, em outro estudo, os pacientes com dermatite atópica apresentaram níveis séricos de GRP maiores do que pacientes saudáveis<sup>128</sup>. Nos ensaios pré-clínicos, camundongos Cnv-NC/Nga, uma cepa de animais que em determinadas condições desenvolvem naturalmente lesões similares à dermatite atópica, apresentaram uma maior quantidade de terminações nervosas GRP<sup>+</sup> na pele quando comparados a animais do grupo controle<sup>57</sup>.

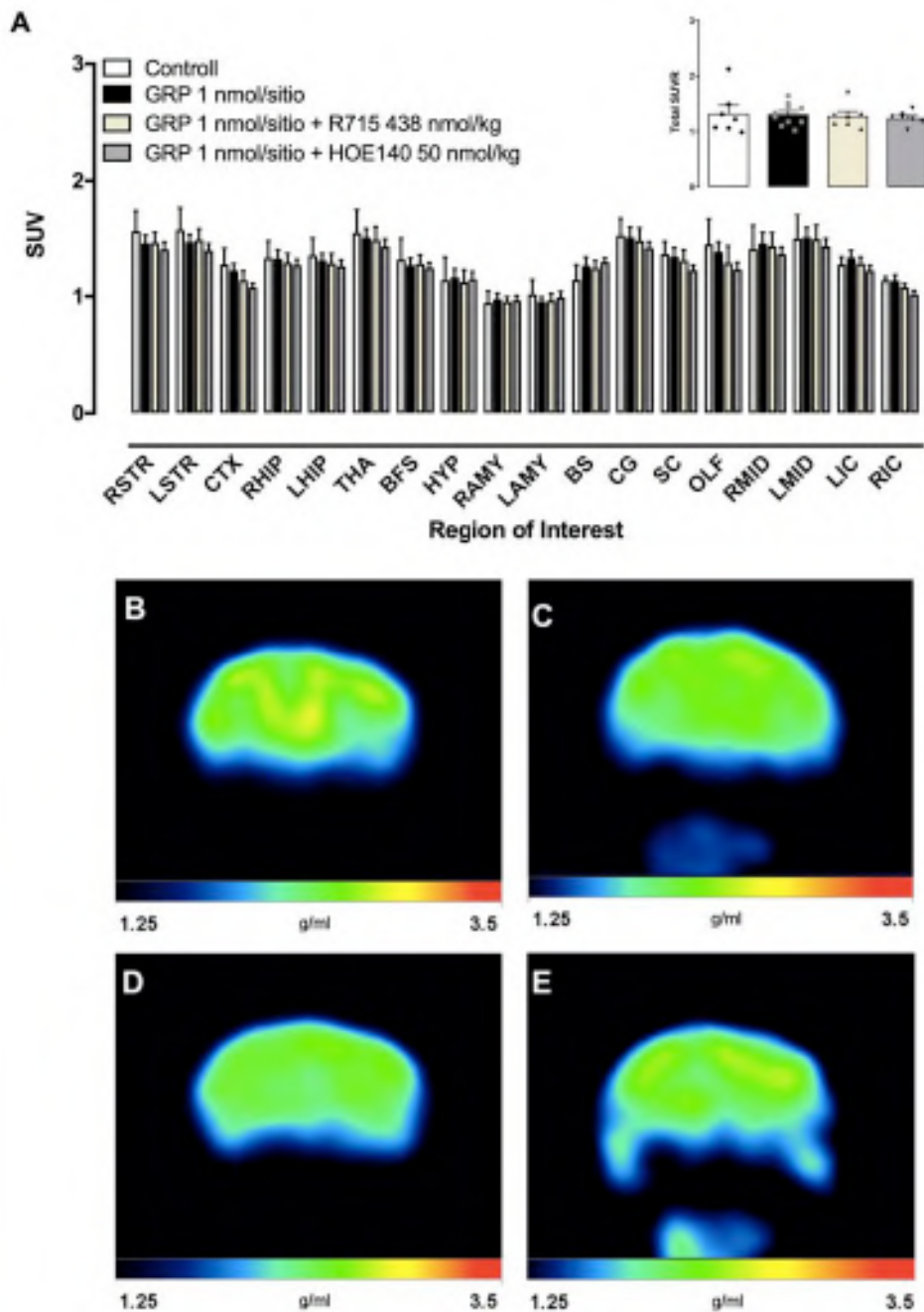
<sup>4</sup> Abordagem que utiliza a corrente galvânica para aumentar a permeação de substâncias através da pele.

A IL-22 é uma citocina que contribui para a patofisiologia da dermatite atópica, sendo considerada um potencial alvo terapêutico<sup>129</sup>. Em um modelo de dermatite atópica utilizando camundongos transgênicos que aumentam a expressão de IL-22 na pele, os pesquisadores descrevem que esses apresentavam maior expressão do GRP, bem como de seu receptor nos queratinócitos da pele. Além disso, foi identificado que a gravidade da doença correlacionava-se com o número de células GRP<sup>+</sup><sup>130</sup>. Entretanto, nas condições avaliadas no presente trabalho, o tratamento crônico com o antagonista do GRPR não modificou a expressão dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de cininas na pele.

No que se refere às modificações centrais que ocorrem durante a sensação pruriginosa<sup>42,131</sup>, no presente trabalho, foi avaliada a atividade cerebral dos camundongos, após 10min do tratamento com GRP (1nmol/sítio, i.t.), em animais pré-tratados com os antagonistas dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de cininas (30min antes da administração do GRP), pela via i.p.. Os animais foram transportados do Vivário 1, do Prédio 14, para o Instituto do Cérebro por equipe especializada e treinada pelo CeMBE. Os animais foram anestesiados individualmente com isoflurano e o radioisótopo <sup>18</sup>F foi administrado por via endovenosa. Cada camundongo foi colocado no equipamento (LabPET-4, TriFoil Imaging, Northridge, CA, USA) com o dorso voltado para o aparato, sob efeito de anestesia durante todo o procedimento. O camundongo permaneceu em uma placa aquecida a 36°C. Nesses experimentos, inicialmente, foi avaliada a atividade cerebral de animais 10min após a injeção i.t. de GRP 1nmol/sítio. Além disso, foram avaliados os efeitos do tratamento i.p. com os antagonistas seletivos dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de cininas, R715 e Hoe140, respectivamente<sup>132</sup>.

Conforme mostra a figura 3, os tratamentos não modificaram a atividade cerebral nas estruturas anatômicas avaliadas.

**Figura 3 - Atividade neural após o tratamento com GRP**



(A) Captação média de glicose do cérebro, medida 10min após o tratamento com GRP (1nmol/sítio, i.t.), associado aos antagonistas dos receptores B<sub>1</sub> (R715, 438nmol/kg, i.p.) ou B<sub>2</sub> (HOE140, 50nmol/kg, i.p.), administrados 30min antes da injeção do GRP em camundongos machos CF-1. Cada coluna representa a média dos animais e as barras verticais representam o erro padrão da média. Imagens representativas do microPET do grupo controle (B), grupo tratado com GRP (C), grupo tratado com GRP associado com R715 (D) ou HOE140 (E). Os dados são expressos como a média e o erro padrão da média ( $n=7-10$  camundongos por grupo). Abreviaturas: RSTR, estriado direito; LSTR, estriado esquerdo; CTX, córtex; RHIP, hipocampo direito; LHIP, hipocampo esquerdo; THA, tálamo; CB, cerebelo; BFS, prosencéfalo basal; HYP, hipotálamo; RAMY, amígdala direita; LAMY, amígdala esquerda; BS, tronco cerebral; CG, giro cingulado; SC, colículo superior; OLF, áreas olfativas; RMID,



mesencéfalo direito; LMID, mesencéfalo esquerdo; LIC, colículo inferior esquerdo; RIC, colículo inferior direito.

Embora não se saiba quais são todas as regiões neurais envolvidas nos mecanismos centrais do prurido, algumas já foram relatadas. Foi relatado que a via espinoparabraquial é ativada durante a sensação pruriginosa induzida por histamina e cloroquina<sup>84</sup>. Ademais, o tálamo, o córtex somatossensorial, diversas regiões do sistema límbico, regiões motoras, córtex cingulado e insular, entre outras, são ativadas durante a coceira, promovendo a percepção, a resposta motora e a sensação de alívio após coçar<sup>42,133</sup>.

Pacientes com coceira crônica apresentam uma maior atividade cerebral em regiões relacionadas com o sistema motor e de recompensa<sup>134</sup>, assim como pacientes com dermatite atópica possuem maior atividade no tálamo, córtex somatossensorial, córtex pré-frontal e motor, giro frontal superior, ínsula, cerebelo e no globo pálido<sup>135</sup>. Em outro estudo, os autores citam que pacientes com dermatite atópica exibem atividade no córtex cingulado anterior, posterior, retrosplenial, no córtex pré-frontal, núcleo caudado contralateral e putâmen, córtex insular anterior e posterior<sup>136</sup>. No presente estudo, contudo, os animais com dermatite atópica induzida por oxazolona, nas condições avaliadas, não apresentaram uma diferença estatisticamente significativa quando comparados com o grupo controle.

O conjunto de resultados obtidos indica o envolvimento dos receptores de B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de cininas no modelo de prurido induzido por GRP. Os receptores B<sub>1</sub> parecem ter um papel relevante ao nível periférico, enquanto os receptores B<sub>2</sub> parecem agir com os receptores GRPR ao nível espinhal. Entretanto, experimentos adicionais estão em andamento para melhor compreender a possível relação entre os receptores de cininas e o GRPR.

**Capítulo III**

---

**3 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

**REFERÊNCIAS**

**ANEXOS**

---

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A dermatite atópica é uma doença cutânea, de caráter crônico, que atinge até 20% das crianças e 10% dos adultos, afetando negativamente a qualidade de vida de um indivíduo. Considerando que as abordagens terapêuticas para a dermatite atópica encontram-se limitadas, torna-se necessário o desenvolvimento de pesquisas que objetivam elucidar melhor o quadro e propor novos alvos farmacológicos para o seu tratamento.

No presente trabalho, o modelo de dermatite atópica induzida por oxazolona em camundongos machos CF-1 aumentou a expressão dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de cininas na pele, bem como reduziu a expressão de ambos os receptores no DRG. Além disso, no que se refere a sensação pruriginosa, o tratamento crônico pela via sistêmica com o antagonista do receptor B<sub>2</sub> de cininas, o HOE140, reverteu parcialmente os acessos de coceiras no grupo de dermatite atópica induzida por oxazolona. Dessa forma, os resultados obtidos demonstram que os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de cininas possuem papel importante na patofisiologia da dermatite atópica, sugerindo que ambos podem ser potenciais alvos terapêuticos para esta patologia.

A análise histológica realizada demonstrou que apesar de haver aumento significativo no infiltrado inflamatório na região da pele afetada dos animais com dermatite atópica, o tratamento crônico pela via sistêmica com o R715 ou o HOE140 não alterou esse parâmetro. Por outro lado, o tratamento local crônico (via intradérmica) com HOE140, antagonista do receptor B<sub>2</sub>, induziu um aumento importante de eosinófilos, ao passo que ambos antagonistas dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> reduziram de maneira significativa a quantidade de histiócitos no sítio de lesão, demonstrando que existe uma relação interessante dos receptores cininérgicos com o sistema imune neste modelo de dermatite atópica. Portanto, a fim de compreender melhor as modificações celulares que ocorreram no local, outros experimentos devem ser realizados, tais como a medição de citocinas pró-inflamatórias e a caracterização da migração de células por citometria de fluxo.

Os resultados comportamentais e histológicos do presente trabalho corroboram outros achados que demonstram a divergência entre o papel dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de cininas em modelos de prurido agudo e crônico<sup>100-105</sup>, salientando a importância de pesquisas acerca do assunto. Porém, para melhor compreender a participação dos receptores cininérgicos no modelo de dermatite atópica induzida por oxazolona ainda são necessários estudos que avaliem outros paradigmas farmacológicos, como o tratamento diário com o antagonista do receptor B<sub>1</sub>, o R715, e o antagonista do receptor B<sub>2</sub>, o HOE140, tanto pela via sistêmica quanto tópica; além de realizar o tratamento combinado com ambos antagonistas dos receptores cininérgicos. Em adição, a utilização de animais *knockout* para os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de cininas também seria uma abordagem experimental válida.

De forma interessante, o tratamento crônico sistêmico com o antagonista do receptor B<sub>2</sub>, o HOE140, reduziu de maneira significativa a expressão da metaloproteinase ADAMTS5 na pele dos camundongos com dermatite atópica induzida por oxazolona, demonstrando a possível relação do receptor B<sub>2</sub> de cininas com o reparo tecidual. Entretanto, novos estudos devem ser realizados para melhor compreender esse mecanismo e seu impacto nas lesões cutâneas, da mesma forma que deve-se verificar a influência do receptor B<sub>2</sub> sobre outras metaloproteinases na pele. Ainda, complementando a hipótese da relação entre as cininas e as metaloproteinases, seria necessário verificar a síntese e a organização do colágeno na pele.

Vale ressaltar que foi possível verificar a relação dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de cininas com o modelo de prurido agudo induzido pelo GRP, sendo que esse peptídeo também foi relacionado com a patofisiologia da dermatite atópica. Embora o tratamento crônico com o antagonista do GRPR, o PD176252, não tenha modificado a expressão dos receptores cininérgicos na pele, outras pesquisas devem ser realizadas a fim de compreender a relação entre os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> e o GRPR. Seria importante verificar a expressão dos receptores de cininas no DRG após o tratamento crônico com o antagonista do GRPR, da mesma forma

que seria interessante verificar se a modulação farmacológica dos receptores cininérgicos poderia modificar a expressão do GRPR em outros tecidos.

Por fim, considerando os resultados obtidos no estudo, torna-se necessário o desenvolvimento de pesquisas adicionais que possam elucidar o papel dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> na patofisiologia da dermatite atópica, uma vez que foi observado que existe uma relação importante entre os receptores de cininas e a patologia estudada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Otsuka, A. *et al.* The interplay between genetic and environmental factors in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Immunol Rev.* **278**, 246–262 (2017).
2. Kapur, S., Watson, W. & Carr, S. Atopic dermatitis. *Allergy Asthma Clin Immunol* **14**, (2018).
3. Yang, E., Sekhon, S., Sanchez, I., Beck, K. & Bhutani, T. Recent Developments in Atopic Dermatitis. *Pediatrics.* **142**, (2018).
4. Weidinger, S., Beck, L. A., Bieber, T., Kabashima, K. & Irvine, A. D. Atopic dermatitis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **4**, (2018).
5. LePoidevin, L., Lee, D. & Shi, V. A comparison of international management guidelines for atopic dermatitis. *Pediatr Dermatol.* 1–30 (2018). doi:10.1111/pde.13678.
6. Weidinger, S. & Novak, N. Atopic dermatitis. *Lancet.* **387**, 1109–1122 (2015).
7. Peng, W. & Novak, N. Pathogenesis of atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy.* **45**, 566–574 (2015).
8. Tsakok, T., Woolf, R., Smith, C., Weidinger, S. & Flohr, C. Atopic dermatitis: the skin barrier and beyond. *Br J Dermatol.* (2018). doi:10.1111/bjd.16934.
9. Eyerich, K. & Novak, N. Immunology of atopic eczema: overcoming the Th1/Th2 paradigm. *Allergy* **68**, 974–982 (2013).
10. Kezic, S. *et al.* Skin barrier in atopic dermatitis. *Front Biosci (Landmark Ed).* **19**, 542–556 (2014).
11. Nomura, T. & Kabashima, K. Advances in atopic dermatitis in 2015. *J. Allergy Clin. Immunol.* **138**, 1548–1555 (2016).
12. Furue, M., Yamamura, K., Kido-Nakahara, M., Nakahara, T. & Fukui, Y. Emerging role of interleukin-31 and interleukin-31 receptor in pruritus in atopic dermatitis. *Allergy.* **73**, 29–36 (2018).
13. Kamo, A., Tominaga, M., Tenggara, S., Ogawa, H. & Takamori, K. Inhibitory effects of UV-based therapy on dry skin-inducible nerve growth in acetone-treated mice. *J. Dermatol. Sci.* **62**, 91–97 (2011).
14. Urashima, R. & Mihara, M. Cutaneous nerves in atopic dermatitis. A histological, immunohistochemical and electron microscopic study. *Virchows Arch.* **432**, 363–370 (1998).
15. Tominaga, M., Tenggara, S., Kamo, A., Ogawa, H. & Takamori, K. Psoralen-ultraviolet A therapy alters epidermal Sema3A and NGF levels and modulates epidermal

- innervation in atopic dermatitis. *J Dermatol Sci.* **55**, 40–46 (2009).
16. Han, L. & Dong, X. Itch mechanisms and circuits. *Annu Rev Biophys.* **43**, 331–355 (2014).
  17. Ikoma, A., Steinhoff, M., Ständer, S., Yosipovitch, G. & Schmelz, M. The neurobiology of itch. *Nat Rev Neurosci.* **7**, 535–547 (2006).
  18. Hosogi, M., Schmelz, M., Miyachi, Y. & Ikoma, A. Bradykinin is a potent pruritogen in atopic dermatitis: A switch from pain to itch. *Pain* **126**, 16–23 (2006).
  19. Elmariah, S. B. Adjunctive Management of Itch in Atopic Dermatitis. *Dermatol. Clin.* **35**, 373–394 (2017).
  20. Bae, I. *et al.* Immunohistological comparison of cutaneous pathology of three representative murine atopic dermatitis models. *J Dermatol Sci.* **59**, 57–60 (2010).
  21. Zachariassen, L. F. *et al.* Sensitivity to oxazolone induced dermatitis is transferable with gut microbiota in mice. *Sci Rep.* **7**, 1–11 (2017).
  22. Liu, B. *et al.* TRPA1 controls inflammation and pruritogen responses in allergic contact dermatitis. *FASEB J.* **27**, 3549–63 (2013).
  23. Barr, T. *et al.* PAR2 Pepducin-Based Suppression of Inflammation and Itch in Atopic Dermatitis Models. *J. Invest. Dermatol.* **139**, 412–21 (2019).
  24. Ewald, D. A. *et al.* Major differences between human atopic dermatitis and murine models, as determined by using global transcriptomic profiling. *J. Allergy Clin. Immunol.* **139**, 562–571 (2017).
  25. Bautista, D., Wilson, S. & Hoon, M. Why we scratch an itch: the molecules, cells and circuits of itch. *Nat Neurosci.* **17**, 175–182 (2014).
  26. LaMotte, R., Dong, X. & Ringkamp, M. Sensory neurons and circuits mediating itch. *Nat Rev Neurosci.* **15**, 19–31 (2014).
  27. Metz, M. & Ständer, S. Chronic pruritus – pathogenesis , clinical aspects and treatment. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* **24**, 1249–1260 (2010).
  28. Misery, L. *et al.* Neuropathic pruritus. *Nat Rev Neurol.* **10**, 408–16 (2014).
  29. Patel, K. N. & Dong, X. Itch: Cells, Molecules, and Circuits. *ACS Chem Neurosci.* **2**, 17–25 (2011).
  30. Weisshaar, E. *et al.* The symptom of itch in medical history: highlights through the centuries. *Int J Dermatol.* **48**, 1385–1394 (2009).
  31. Paus, R., Schmelz, M., Bíró, T. & Steinhoff, M. Review series Frontiers in pruritus research: scratching the brain for more effective itch therapy. *J Clin Invest.* **116**, 1174–86 (2006).

32. Yosipovitch, G. & Samuel, L. Neuropathic and psychogenic itch. *Dermatol Ther.* **21**, 32–41 (2008).
33. Wolff, K., Johnson, R. & Saavedra, A. *Dermatologia de Fitzpatrick: Atlas e texto.* (2015).
34. Kanani, A., Betschel, S. D. & Warrington, R. Urticaria and angioedema. *Allergy, Asthma Clin. Immunol.* **14**, 1–13 (2018).
35. Kremer, A., Bolier, R., van Dijk, R., Oude Elferink, R. & Beuers, U. Advances in Pathogenesis and Management of Pruritus in Cholestasis. *Dig Dis.* **32**, 637–645 (2014).
36. Lerner, E. A. Pathophysiology of Itch. *Dermatol. Clin.* **36**, 175–177 (2018).
37. Tuckett, R. P. Itch Evoked by Electrical Stimulation of the Skin. *J. Invest. Dermatol.* **79**, 368–373 (1982).
38. Schmelz, M., Schmidt, R., Bickel, A., Handwerker, H. O. & Torebjörk, H. E. Specific C-Receptors for Itch in Human Skin. *J Neurosci.* **17**, 8003–8008 (1997).
39. Schmelz, M. *et al.* Chemical Response Pattern of Different Classes of C-Nociceptors to Pruritogens and Algogens. *J Neurophysiol.* **89**, 2441–2448 (2003).
40. Steinhoff, M., Buddenkotte, J. & Lerner, E. A. Role of mast cells and basophils in pruritus. *Immunol Rev.* **282**, 248–264 (2018).
41. Han, S., Mancino, V. & Simon, M. I. Phospholipase C $\beta$ 3 Mediates the Scratching Response Activated by the Histamine H1 Receptor on C-Fiber Nociceptive Neurons. *Neuron.* **52**, 691–703 (2006).
42. Dong, X. & Dong, X. Peripheral and Central Mechanisms of Itch. *Neuron* **98**, 482–494 (2018).
43. Jeffery, J., Kim, S. & Chen, Z.-F. Itch signaling in the nervous system. *Physiol.* **26**, 286–292 (2011).
44. Xie, W. *et al.* Genetic alteration of phospholipase C  $\beta$ 3 expression modulates behavioral and cellular responses to mu opioids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**, 10385–10390 (1999).
45. Hefti, F. F. *et al.* Novel class of pain drugs based on antagonism of NGF. *Trends Pharmacol Sci.* **27**, 85–91 (2006).
46. Woo, D. H. *et al.* Direct activation of Transient Receptor Potential Vanilloid. *Mol Pain.* **15**, 1–15 (2008).
47. Lewis, D., Huang, S. & Duvic, M. Inflammatory cytokines and peripheral mediators in the pathophysiology of pruritus in cutaneous T-cell lymphoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* **32**, 1652–1656 (2018).



48. Song, J. *et al.* Pruritus: Progress toward Pathogenesis and Treatment. *Biomed Res Int.* **2018**, (2018).
49. Yosipovitch, G., Rosen, J. D. & Hashimoto, T. Itch: From mechanism to (novel) therapeutic approaches. *J. Allergy Clin. Immunol.* **142**, 1375–1390 (2018).
50. Gupta, K. & Harvima, I. Mast cell-neural interactions contribute to pain and itch. *Immunol Rev.* **282**, 168–187 (2018).
51. Liu, Q. *et al.* The distinct roles of two GPCRs, MrgprC11 and PAR2, in itch and hyperalgesia. *Sci Signal.* **4**, (2011).
52. Bader, M., Alenina, N., Andrade-Navarro, M. A. & Santos, R. A. MAS and its related G protein-coupled receptors, Mrgprs. *Pharmacol Rev* **66**, 1080–1105 (2014).
53. Liu, Q. *et al.* Sensory neuron-specific GPCR Mrgprs are itch receptors mediating chloroquine-induced pruritus. *Cell.* **139**, 1353–1365 (2009).
54. Reddy, V. B. *et al.* Redefining the concept of protease-activated receptors: cathepsin S evokes itch via activation of Mrgprs. *Nat. Commun.* **6**, 1–10 (2015).
55. Baraniuk, J. N. Rise of the Sensors: Nociception and Pruritus. *Curr Allergy Asthma Rep* **12**, 104–114 (2012).
56. Dhand, A. & Aminoff, M. J. The neurology of itch. *Brain* **137**, 313–22 (2014).
57. Tominaga, M., Ogawa, H. & Takamori, K. Histological characterization of cutaneous nerve fibers containing gastrin-releasing peptide in NC/Nga mice: an atopic dermatitis model. *J Invest Dermatol.* **129**, 2901–2905 (2009).
58. Merali, Z., McIntosh, J. & Anisman, H. Role of bombesin-related peptides in the control of food intake. *Neuropeptides.* **33**, 376–386 (1999).
59. Gonzalez, N., Moody, T., Igarashi, H., Ito, T. & Jensen, R. Bombesin-related peptides and their receptors: recent advances in their role in physiology and disease states. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* **15**, 58–64 (2008).
60. Jensen, R., Battey, J., Spindel, E. & Benya, R. International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian bombesin receptors: nomenclature, distribution, pharmacology, signaling, and functions in normal and disease states. *Pharmacol Rev.* **60**, 1–42 (2008).
61. Sayegh, A. I. The Role of Bombesin and Bombesin-Related Peptides in the Short-term Control of Food Intake. *Prog Mol Biol Transl Sci.* **114**, 343–370 (2013).
62. Takanami, K. & Sakamoto, H. The Gastrin-Releasing Peptide Receptor (GRPR) in the Spinal Cord as a Novel Pharmacological Target. *Curr Neuropharmacol.* **12**, 434–443 (2014).
63. Cevikbas, F., Steinhoff, M. & Ikoma, A. Role of Spinal Neurotransmitter Receptors in

- Itch : New Insights into Therapies and Drug Development. *CNS Neurosci Ther* **17**, 742–749 (2011).
64. Sun, Y.-G. & Chen, Z.-F. A gastrin-releasing peptide receptor mediates the itch sensation in the spinal cord. *Sun, YG Chen, ZF* **448**, 3 (2007).
  65. Schöfl, C. *et al.* Generation of repetitive Ca<sup>2+</sup> transients by bombesin requires intracellular release and influx of Ca<sup>2+</sup> through voltage-dependent and voltage independent channels in single HIT cells. *Cell Calcium*. **19**, 485–93. (1996).
  66. Nishino, H., Tsunoda, Y. & Owyang, C. Mammalian bombesin receptors are coupled to multiple signal transduction pathways in pancreatic acini. *Am J Physiol*. **274**, 525–34 (1998).
  67. Rozengurt, E. V. Gastrointestinal peptide signaling through tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins. *Am J Physiol*. **275**, 177–82 (1998).
  68. Ishola, T., Kang, J., Qiao, J., Evers, B. & Chung, D. Phosphatidylinositol 3-kinase regulation of gastrin-releasing peptide-induced cell cycle progression in neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta*. **1770**, 927–932 (2007).
  69. Pereira, P. *et al.* Inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase  $\gamma$  reduces pruriceptive, inflammatory, and nociceptive responses induced by trypsin in mice. *Pain* **152**, 2861–2869 (2011).
  70. Pereira, P. J. S. *et al.* Neurobiology of Disease GRPR / PI3K $\gamma$ : Partners in Central Transmission of Itch. *J. Neurosci*. **35**, 16272–16281 (2015).
  71. Sukhtankar, D. D. & Ko, M.-C. Physiological Function of Gastrin-Releasing Peptide and Neuromedin B Receptors in Regulating Itch Scratching Behavior in the Spinal Cord of Mice. *PLoS One*. **8**, 1–8 (2013).
  72. Patricio, E. S. *et al.* Mechanisms Underlying the Scratching Behavior Induced by the Activation of Proteinase-Activated Receptor-4 in Mice. *J. Invest. Dermatol*. **135**, 2484–2491 (2015).
  73. Machado, G., Danesi, G., Pereira, P. & Campos, M. Blockage of gastrin-releasing peptide receptor by PD176252 ameliorates acute and chronic pruritus in mice. in *XLVII Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental* (2015).
  74. Ross, S. E. Pain and itch: insights into the neural circuits of aversive somatosensation in health and disease. *Curr. Opin. Neurobiol*. **21**, 880–887 (2011).
  75. Ross, S. E. *et al.* Loss of Inhibitory Interneurons in the Dorsal Spinal Cord and Elevated Itch in Bhlhb5 Mutant Mice. *Neuron* **65**, 886–898 (2010).
  76. Kardon, A. *et al.* Dynorphin Acts as a Neuromodulator to Inhibit Itch in the Dorsal

- Horn of the Spinal Cord. *Neuron*. **82**, 573–586 (2014).
77. Pereira, P. J. S. & Lerner, E. A. Interneurons Scratch an Itch. *Neuron* **82**, 503–505 (2014).
  78. AKIYAMA, T., CARSTENS, M. I., PIECHA, D., STEPAN, S. & CARSTENS, E. Nalfurafine suppresses pruritogen- and touch-evoked scratching behavior in models of acute and chronic itch in mice. *Acta Derm Venereol.* **95**, 147–150 (2015).
  79. Maurer, M. *et al.* New topics in bradykinin research. *Allergy*. **66**, 1397–1406 (2011).
  80. Melmon, K. & Cline, M. Kinins. *Am J Med.* **43**, 153–60 (1967).
  81. Takano, M. & Matsuyama, S. Intracellular and nuclear bradykinin B2 receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **732**, 169–172 (2014).
  82. Marceau, F. & Regoli, D. Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. *Nat Rev Drug Discov.* **3**, 845–52 (2004).
  83. Regoli, D. & Barabé, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev.* **32**, 1–46 (1980).
  84. Mu, D. *et al.* A central neural circuit for itch sensation. *Science*. **357**, 695–699 (2017).
  85. Qadri, F. & Bader, M. Kinin B1 receptors as a therapeutic target for inflammation. *Expert Opin. Ther. Targets* **22**, 31–44 (2018).
  86. Steinhoff, M. *et al.* Neurophysiological, neuroimmunological, and neuroendocrine basis of pruritus. *J Invest Dermatol.* **126**, 1705–1718 (2006).
  87. Campos, M., Leal, P., Yunes, R. & Calixto, J. Non-peptide antagonists for kinin B 1 receptors: new insights into their therapeutic potential for the management of inflammation and pain. *Trends Pharmacol Sci.* **27**, 646–51 (2006).
  88. Dutra, R. C. Kinin receptors: Key regulators of autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* **16**, 192–207 (2017).
  89. Liao, J. K. & Homcy, C. J. The G proteins of the G alpha i and G alpha q family couple the bradykinin receptor to the release of endothelium-derived relaxing factor. *J Clin Invest.* **92**, 2168–2172 (1993).
  90. Ricciardolo, F. L. M., Folkerts, G., Folino, A. & Mognetti, B. Bradykinin in asthma: Modulation of airway inflammation and remodelling. *Eur J Pharmacol.* **827**, 181–188 (2018).
  91. Liebmann, C. *et al.* Dual bradykinin B2 receptor signalling in A431 human epidermoid carcinoma cells: activation of protein kinase C is counteracted by a GS-mediated stimulation of the cyclic AMP pathway. *Biochem J.* **313**, 109–118 (1996).
  92. Calixto, J., Cabrini, D., Ferreira, J. & Campos, M. Kinins in pain and inflammation.

- Pain* **87**, 1–5 (2000).
93. Scharfstein, J., Ramos, P. I. P. & Barral-Netto, M. G Protein-Coupled Kinin Receptors and Immunity Against Pathogens. *Adv Immunol.* **136**, 29–84 (2017).
  94. Ferreira, J., Silva, G. L. & Calixto, J. Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B2 kinin receptor activation in mice. *Br J Pharmacol.* **141**, 787–794 (2004).
  95. Mizumura, K., Sugiura, T., Katanosaka, K., Banik, R. K. & Kozaki, Y. Excitation and sensitization of nociceptors by bradykinin: what do we know ? *Exp Brain Res.* **196**, 53–65 (2009).
  96. Axelrod, J. Receptor-mediated activation of phospholipase A<sub>2</sub> and arachidonic acid release in signal transduction. *Biochem Soc Trans.* **18**, 503–7 (1990).
  97. Ignarro, L., Byrns, R., Buga, G. & Wood, K. Mechanisms of endothelium-dependent vascular smooth muscle relaxation elicited by bradykinin and VIP. *Am J Physiol.* **253**, 1074–82 (1987).
  98. Ehrenfeld, P. *et al.* Kinin B1 receptor activation turns on exocytosis of matrix metalloprotease-9 and myeloperoxidase in human neutrophils: involvement of mitogen-activated protein kinase family. *J Leukoc Biol.* **86**, 1179–1189 (2009).
  99. Wallengren, J. Neuroanatomy and neurophysiology of itch. *Dermatol Ther.* **18**, 292–303 (2005).
  100. Fu, K., Qu, L., Shimada, S., Nie, H. & LaMotte, R. Enhanced scratching elicited by a pruritogen and an algogen in a mouse model of contact hypersensitivity. *Neurosci Lett.* **579**, 190–194 (2014).
  101. Liu, Y. *et al.* The effect of kinin B1 receptor on chronic itching sensitization. *Mol. Pain* **11**, 1–9 (2015).
  102. Costa, R. *et al.* The role of kinin B 1 and B 2 receptors in the scratching behaviour induced by proteinase-activated receptor-2 agonists in mice. *Br J Pharmacol.* **159**, 888–897 (2010).
  103. Hayashi, I. & Majima, M. Reduction of sodium deoxycholic acid-induced scratching behaviour by bradykinin B2 receptor antagonists. *Br J Pharmacol.* **126**, 197–204 (1999).
  104. Costa, R. *et al.* Evidence for the role of neurogenic inflammation components in trypsin-elicited scratching behaviour in mice. *Br J Pharmacol* **154**, 1094–1103 (2008).
  105. Liang, J., He, Y. & Ji, W. Bradykinin-evoked scratching responses in complete Freund's adjuvant-inflamed skin through activation of B1 receptor. *Exp Biol Med* **237**,

- 318–326 (2012).
106. Chen, Y. *et al.* Role of ERK1/2 activation on itch sensation induced by bradykinin B1 activation in inflamed skin. *Exp Ther Med.* **12**, 627–632 (2016).
  107. Soley Bda, S. *et al.* Kinin receptors in skin wound healing. *JJ Dermatol Sci.* **82**, 95–105 (2016).
  108. Matus, C. *et al.* Activation of the human keratinocyte B1 bradykinin receptor induces expression and secretion of metalloproteases 2 and 9 by transactivation of epidermal growth factor receptor. *Exp Dermatol.* **25**, 694–700 (2016).
  109. Depetri, F., Tedeschi, A. & Cugno, M. Angioedema and emergency medicine: From pathophysiology to diagnosis and treatment. *Eur. J. Intern. Med.* 0–1 (2018).  
doi:10.1016/j.ejim.2018.09.004
  110. Misra, L., Khurmi, N. & Trentman, T. Angioedema: Classification, management and emerging therapies for the perioperative physician. *Indian J Anaesth.* **60**, 534–41 (2016).
  111. Heapy, C. G. *et al.* Differential sensitivity of antinociceptive assays to the bradykinin antagonist Hoe 140. *Br J Pharmacol.* **108**, 209–213 (1993).
  112. Hock, F. *et al.* Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vitro studies. *Br J Pharmacol.* **102**, 769–773 (1991).
  113. Costa, R. *et al.* Kinin Receptors Sensitize TRPV4 Channel and Induce Mechanical Hyperalgesia: Relevance to Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy in Mice. *Mol Neurobiol.* **55**, 2150–2161 (2018).
  114. Cicardi, M., Suffritti, C., Perego, F. & Caccia, S. Novelty in the Diagnosis and Treatment of Angioedema. *J Investig Allergol Clin Immunol.* **26**, 212–221 (2016).
  115. Bartal, C., Zeldetz, V., Stavi, V. & Barski, L. The role of icatibant-the B2 bradykinin receptor antagonist-in life-threatening laryngeal angioedema in the ED. *Am. J. Emerg. Med.* **33**, 479.e1-479.e3 (2015).
  116. Farkas, H., Debreczeni, M. & Köhalmi, K. Investigational drugs in phase I and phase II clinical trials for hereditary angioedema. *Expert Opin Investig Drugs.* **27**, 87–103 (2018).
  117. Hahn, J. *et al.* Angioedema. *Dtsch Arztebl Int.* **114**, 489–496 (2017).
  118. Morgan, B. Hereditary Angioedema — Therapies Old and New. *N Engl J Med* **363**, 581–583 (2010).
  119. Holm, J. & Ovesen, T. Increasing rate of angiotensin-converting enzyme inhibitor-related upper airway angio-oedema. *Dan Med J.* **59**, A4449. (2009).

120. Baş, M. *et al.* A randomized trial of icatibant in ACE-inhibitor-induced angioedema. *N Engl J Med.* **372**, 418–25 (2015).
121. Cicardi, M. *et al.* Icatibant, a new bradykinin-receptor antagonist, in hereditary angioedema. *N Engl J Med.* **363**, 532–41 (2010).
122. Riedl, M. A. *et al.* Treatment patterns and healthcare resource utilization among patients with hereditary angioedema in the United States. *Orphanet J Rare Dis.* **13**, 1–7 (2018).
123. Campos, R. *et al.* Icatibant, an inhibitor of bradykinin receptor 2, for hereditary angioedema attacks: prospective experimental single-cohort study. *Sao Paulo Med J.* **132**, 261–265 (2014).
124. Zuraw, B. Hereditary Angioedema. *N Engl J Med.* **359**, 1027–1036 (2008).
125. Andoh, T., Kuwazono, T., Lee, J. & Kuraishi, Y. Peptides Gastrin-releasing peptide induces itch-related responses through mast cell degranulation in mice. *Peptides* **32**, 2098–2103 (2011).
126. Maciel, I. S. *et al.* THE SPINAL INHIBITION OF N-TYPE VOLTAGE-GATED CALCIUM CHANNELS SELECTIVELY PREVENTS SCRATCHING BEHAVIOR IN MICE. *Neuroscience* **277**, 794–805 (2014).
127. Feng, J. *et al.* The kinin B1 receptor mediates allodynia in a murine model of inflammation. *Neurosci. Lett.* **560**, 31–35 (2014).
128. Kagami, S. *et al.* Serum gastrin-releasing peptide levels correlate with pruritus in patients with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* **133**, 1673–1675 (2013).
129. Jin, M. & Yoon, J. From Bench to Clinic: the Potential of Therapeutic Targeting of the IL-22 Signaling Pathway in Atopic Dermatitis. *Immune Netw.* **18**, 1–11 (2018).
130. Lou, H. *et al.* Expression of IL-22 in the Skin Causes Th2-Biased Immunity, Epidermal Barrier Dysfunction and Pruritus via Stimulating Epithelial Th2 Cytokines and the GRP Pathway. *J Immunol.* **198**, 2543–2555 (2017).
131. Ehling, S., Butler, A., Thi, S., Ghashghaei, H. T. & Bäumer, W. To scratch an itch: Establishing a mouse model to determine active brain areas involved in acute histaminergic itch. *IBRO Reports* **5**, 67–73 (2018).
132. Baptista, P. *et al.* Antidepressant Effects of Ketamine Are Not Related to 18 F-FDG Metabolism or Tyrosine Hydroxylase Immunoreactivity in the Ventral Tegmental Area of Wistar Rats. *Neurochem Res.* **40**, 1153–64 (2015).
133. Carstens, E. & Akiyama, T. Central Mechanisms of Itch. *Curr Probl Dermatol.* **50**, 11–17 (2016).

134. Mochizuki, H. *et al.* Scratching Induces Overactivity in Motor-Related Regions and Reward System in Chronic Itch Patients. *J. Invest. Dermatol.* **135**, 2814–2823 (2015).
135. Schneider, G. *et al.* Significant differences in central imaging of histamine-induced itch between atopic dermatitis and healthy subjects. *Eur J Pain.* **12**, 834–841 (2008).
136. Ishiuchi, Y. *et al.* Distinct patterns of brain activity evoked by histamine-induced itch reveal an association with itch intensity and disease severity in atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* **161**, 1072–1080 (2009).

## ANEXOS



## ANEXO A

De: **International Immunopharmacology** Evisesupport@elsevier.com  
Assunto: Your co-authored submission  
Data: 2 de fevereiro de 2019 19:25  
Para: priscillabpail@gmail.com



Dear Miss. Pail,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: International Immunopharmacology

Title: The role of kinin B1 and B2 receptors in the mouse model of oxazolone-induced atopic dermatitis

Corresponding Author: Maria Martha Campos

Co-Authors: Ana Paula Aquistapase Dagnino, Priscilla B. Pail, Gabriela W. Neculqueo, Giovana P. Maccari, Pedro Chagastelles, Raquel D. S. Freitas

Maria Martha Campos submitted this manuscript via Elsevier's online submission system, EVISE®. If you are not already registered in EVISE®, please take a moment to set up an author account by navigating to [http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL\\_ACR=INTIMP](http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=INTIMP)

If you already have an ORCID, we invite you to link it to this submission. If the submission is accepted, your ORCID will be transferred to ScienceDirect and CrossRef and published with the manuscript.

To link an existing ORCID to this submission, or sign up for an ORCID if you do not already have one, please click the following link: [Link ORCID](#)

What is ORCID?

ORCID is an open, non-profit, community-based effort to create and maintain a registry of unique researcher identifiers and a transparent method of linking research activities and outputs to these identifiers.

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our ORCID help page: [http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/2210/p/7923](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923)

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author directly at [camposmmartha@yahoo.com](mailto:camposmmartha@yahoo.com).

Thank you,  
International Immunopharmacology

**This message was sent automatically. Please do not reply**

## ANEXO B



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 109/2015 - CEUA

Porto Alegre, 18 de dezembro de 2015.

Prezado Sr(a). Pesquisador(a),

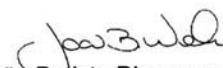
A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 15/00489 intitulado **“Relação entre os receptores B1/B2 de cininas e o receptor do peptídeo liberador de gastrina (GRPR) em diferentes modelos de coceira em camundongos: interface cutânea e neural”**.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está **autorizada** a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Nº de Animais	Espécie	Duração do Projeto
585	Mus musculus	12/2015 – 03/2019

Atenciosamente,

  
Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber  
Coordenador da CEUA/PUCRS

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Maria Martha Campos

INTOX

Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central

Av. Ipiranga, 6681 – P. 99 – Portal Tecnopuc – sala 1512

CEP: 90619-900 – Porto Alegre/RS

Fone: (51) 3353-6365

E-mail: [ceua@pucrs.br](mailto:ceua@pucrs.br)

### ANEXO C

O manuscrito “*Effect of the bradykinin 1 receptor antagonist SSR240612 after oral administration in Mycobacterium tuberculosis-infected mice*” dos autores Valnês S. Rodrigues-Junior, Priscilla B. Pail, Anne D. Villela, Virgínia C. A. Falcão, Adílio S. Dadda, Bruno L. Abbadi, João B. Pesquero, Diógenes S. Santos, Luiz A. Basso, Maria M. Campos (2018), foi publicado no periódico *Tuberculosis (Edinb)*, com fator de impacto de 2.727.



Contents lists available at ScienceDirect

## Tuberculosis

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/tube](http://www.elsevier.com/locate/tube)

Drug Discovery and Resistance

Effect of the bradykinin 1 receptor antagonist SSR240612 after oral administration in *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice

Valnês S. Rodrigues-Junior<sup>a,b</sup>, Priscilla B. Pail<sup>c</sup>, Anne D. Villela<sup>a,b</sup>, Virgínia C.A. Falcão<sup>a,c</sup>, Adílio S. Dadda<sup>a,c</sup>, Bruno L. Abbadí<sup>a,c</sup>, João B. Pesquero<sup>d</sup>, Diógenes S. Santos<sup>a,c</sup>, Luiz A. Basso<sup>a,b,c</sup>, Maria M. Campos<sup>a,b,c,e,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF) and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS, Porto Alegre, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS, Porto Alegre, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Biofísica, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>e</sup> Instituto de Toxicologia e Farmacologia, PUCRS, Porto Alegre, Brazil

## ARTICLE INFO

Keywords:  
Tuberculosis  
Drug development  
Kinin receptors  
SSR240612

## ABSTRACT

The role, if any, played by the kinin system in tuberculosis infection models, either *in vivo* or *in vitro*, was investigated. The effects of *Mycobacterium tuberculosis* infection on C57BL/6 wild type, B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>, B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> and double B<sub>1</sub>R/B<sub>2</sub>R knockout mice were evaluated. Immunohistochemistry analysis was carried out to assess B<sub>1</sub>R and B<sub>2</sub>R expression in spleens and lungs of *M. tuberculosis*-infected mice. In addition, *in vitro* experiments with *M. tuberculosis*-infected macrophages were performed. The *in vivo* effects of HOE-140 and SSR240612 on the mice model of infection were also evaluated. Infected B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> mice exhibited increased splenomegaly, whereas decreased spleen weight in infected double B<sub>1</sub>R/B<sub>2</sub>R knockout mice was observed. The bacterial load, determined as colony-forming units, did not differ in the spleens and lungs of the studied mouse strains. Importantly, immunohistochemical analysis revealed that B<sub>1</sub>R was upregulated in both spleens and lungs of infected mice. *M. tuberculosis*-infected macrophages incubated with SSR240612, alone or in combination with des-Arg<sup>9</sup>-BK, for four days, displayed a marked inhibitory effect on CFU counts. However, the pre-incubation of the selective B<sub>1</sub>R (des-Arg<sup>9</sup>-BK and SSR240612) and B<sub>2</sub>R (BK and HOE-140) agonists and antagonists, respectively, did not significantly affect the bacterial loads. A statistically significant reduction in the CFU of *M. tuberculosis* in lungs and spleens of animals treated with SSR240612, but not with HOE-140, was observed. Further efforts should be pursued to clarify whether or not SSR240612 might be considered an option for the treatment of tuberculosis.

## 1. Introduction

Tuberculosis (TB), caused by *Mycobacterium tuberculosis*, is a fatal infectious disease that resulted in more deaths than HIV in 2015, an estimated 1.4 million people [1]. Despite some progress in the pipeline for new drug candidates and regimens, there is still a critical need for the development of new drugs to treat TB [1], and improvements in our understanding of *M. tuberculosis* metabolism can aid the development of innovative strategies to combat this disease. Kinins and their receptors (B<sub>1</sub>R and B<sub>2</sub>R) are implicated in physiological and pathological processes, including infections [2–11]. Importantly, constitutive B<sub>2</sub>R and inducible B<sub>1</sub>R were found to play an important role in modulating the inflammatory process induced by injection of *Mycobacterium bovis*

bacillus Calmette-Guérin *in vivo* [12]. Accordingly, the use of kinin antagonists has been considered an interesting alternative to treat inflammatory and infectious conditions [2,13–15]. However, our understanding about the role of kinin system in the pathogenesis of intracellular organisms is still limited [3–7]. It was recently reported the quantification of circulating levels of B<sub>2</sub>R and B<sub>1</sub>R agonists, bradykinin (BK) and des-Arg<sup>9</sup>-BK, in a cohort of 13 patients with active TB [16]. BK and des-Arg<sup>9</sup>-BK concentrations seem to decrease as the patient shifts from pretreatment to early stage of therapy, to extended phase of dosing, and to treatment completion, suggesting a possible role of kinin system in human tuberculosis [16]. This work describes, to the best of our knowledge, the first study on the role of B<sub>1</sub>R and B<sub>2</sub>R during *M. tuberculosis* infection, and the assessment of effects of both B<sub>1</sub>R and B<sub>2</sub>R

\* Corresponding author. Av. Ipiranga 6681, Tecnopuc, Prédio 92A, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.  
E-mail address: [maria.campos@pucrs.br](mailto:maria.campos@pucrs.br) (M.M. Campos).

agonists and antagonists in models of TB infection.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Agonists and antagonists

BK, des-Arg<sup>9</sup>-BK, and HOE-140 were purchased from Bachem Americas Inc. (Bachem, USA); SSR240612 was donated by Sanofi (Sanofi Research, Paris, France).

### 2.2. Mice

C57BL/6 B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>, B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>, and B<sub>1</sub>B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> (knockout) and wild-type C57BL/6 originated from breeding colonies donated by Dr. J. B. Pesquero (Unifesp, São Paulo, Brazil) were maintained in our animal facilities. For mice infections, male and female CF1 mice (25–30 g) obtained from the Central Biotery of PUCRS (CeMBE, Brazil) were employed. Mouse experiments were performed at Preclinical Tests Laboratory, located at INCT-TB-PUCRS. Animals were maintained at temperature- (22 ± 1 °C) and humidity-controlled room, with a 12/12 h light/dark cycle, and food and water available *ad libitum*. The current Brazilian guidelines for the care and use of animals for scientific and didactic procedures, from the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA, Brazil), was followed. The local Animal Ethics Committee approved the experimental protocol for infection (CEUA 14/00415). The ARRIVE Guidelines to report *in vivo* experiments [17] were followed.

### 2.3. Bacteria and macrophages

Virulent *M. tuberculosis* H37Rv laboratorial strain was maintained in Ogawa medium at 4 °C and subcultured in 7H9 media supplemented with tween 80 (0.05%) and albumin dextrose-catalase (ADC) liquid medium. *M. tuberculosis* inoculum was prepared as previously described [18]. The macrophage murine cell line RAW 264.7 (obtained from Cell Bank of Rio de Janeiro) was cultured in DMEM media (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotics (penicillin-streptomycin). The cells were maintained in culture bottles at 37 °C in humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>.

### 2.4. Infection of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor deleted mice

Knockout (B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>, B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>, and B<sub>1</sub>B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>) and wild-type C57BL/6 mice were anaesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (100 mg/kg, Cristália) and xylazine (10 mg/kg, Vetbrands), and subsequently infected (through the retro-orbital venous plexus) with 10<sup>6</sup> viable *M. tuberculosis* H37Rv cells [18,19]. Four weeks after infection, mice were euthanized by isoflurane (Cristália) inhalation, and spleens and left lungs were removed under aseptic conditions. Spleens had their weights measured (in mg). The bacterial loads were determined by plating serial dilutions of lung and spleen homogenates on Middlebrook 7H10 agar (Difco) plates containing 10% OADC enrichment (Becton Dickinson). Plates were incubated at 37 °C for 3 weeks in a 5% CO<sub>2</sub> environment prior to counting colony forming units (CFU).

### 2.5. Effect of the agonists and antagonists in RAW 264.7 cell viability

The direct effect of the agonists and antagonists in RAW 264.7 viability was evaluated by the MTT method [20]. For this assay, RAW 264.7 cells (2000 cells/well, in a 96-well microtiter plate) were incubated with different concentrations of BK, des-Arg<sup>9</sup>-BK, HOE-140, and SSR240612 [20], for 96 h. These cells were incubated with MTT (1 mg/mL) for 2 h. The formazan crystals were dissolved in DMSO, and the absorbance of this solution was measured at 595 nm (Spectra Max M2e, Molecular Devices, USA). Three different assays were performed,

in triplicates.

### 2.6. *M. tuberculosis* susceptibility assay

Determination of *M. tuberculosis* susceptibility to the agonists and antagonists was carried out in 96-well plates. BK, des-Arg<sup>9</sup>-BK, HOE-140, and SSR240612 were diluted in Middlebrook 7H9 medium containing 10% ADC to concentrations up to 500 nM, 500 nM, 50 μM, and 250 μM, respectively. The *M. tuberculosis* suspension was diluted in Middlebrook 7H9 broth containing 10% ADC to achieve an optical density value of 0.006 at 600 nm, and 100 μl was then added to each well. The plates were covered, sealed with parafilm and incubated at 37 °C. After 7 days of incubation, 60 μl of 0.01% resazurin solution was added to each well and incubated for additional two days at 37 °C [19]. At least three tests were independently carried out.

### 2.7. Infection experiments using macrophages

For the first *in vitro* infection test, macrophages were seeded in 24-well culture plates at a density of 10<sup>5</sup> cells per well in DMEM medium (with 10% FBS, without antibiotics) and incubated for 24 h at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. The cells were then washed with 0.9% NaCl to remove non-adherent cells and pre-incubated with BK (3 nM), des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nM), HOE-140 (1 μM), and SSR240612 (10 μM), for 30 min, in DMEM medium. Infection of RAW 264.7 cells with *M. tuberculosis* H37Rv was performed at a multiplicity of infection of 1:1, for 3 h at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. Infected RAW 264.7 cells were washed three times with 0.9% saline solution to remove extracellular bacteria, followed by the addition of 1 ml 0.025% SDS dissolved in sterile 0.9% saline solution to lyse macrophages [21]. Lysates were serially diluted and plated on Middlebrook 7H10 Agar with 10% OADC. CFU was determined after incubation of plates for 21 days at 37 °C.

For the second experiment, RAW 264.7 cells were infected with *M. tuberculosis* H37Rv for 3 h, followed by washing extracellular bacteria. The cells were then treated with the tested substances in DMEM medium: BK (3 nM), des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nM), HOE-140 (1 μM), and SSR240612 (10 μM). After 4 days, macrophages were then lysed with 0.025% SDS, and these suspensions were diluted and plated on Middlebrook 7H10 Agar containing OADC, prior to CFU counting.

### 2.8. Expression analysis of B<sub>1</sub>R and B<sub>2</sub>R in infected mice

Twenty-eight CF1 mice were used to assess B1R and B2R immunopositivity in spleens and lungs. Mice were divided into three groups: I. intravenously infected with *M. tuberculosis* H37Rv (10<sup>2</sup> bacteria in 200 μl), II. intravenously infected with *M. tuberculosis* H37Rv (10<sup>4</sup> bacteria in 200 μl), III. intravenous injection of 200 μl of NaCl 0.9% sterile solution. Mice were euthanized by isoflurane inhalation [18], 15 or 30 days post infection. Lungs and spleens were removed and fixed with 10% buffered formalin for 24 h and then processed for immunohistochemistry as described previously [22]. The antibodies employed were polyclonal rabbit anti-B1R (1:200, Cat#: ABR-011; Lot ABR011AN0150; Alomone Labs, Jerusalem, Israel), and polyclonal rabbit anti-B2R (1:200, Cat#: ABR-012; Lot ABR012AN0102; Alomone Labs, Jerusalem, Israel). To determine the B<sub>1</sub>R- and B<sub>2</sub>R-immunopositive cells, digitized TIFF images were transferred to a computer and analyzed using Image NIH Image J 1.36b Software (NIH, Bethesda, MD, USA). A specific plugin was used to determine the immunopositivity for B<sub>1</sub>R or B<sub>2</sub>R.

### 2.9. Treatment with SSR240612 or HOE-140 *in vivo*

Twenty CF1 mice were anaesthetized and intravenously injected with 10<sup>5</sup> *M. tuberculosis* H37Rv [18,19]. Mice were randomly divided into four groups with five animals each after six days post-infection. Three groups received treatments for three weeks (5 doses/week):

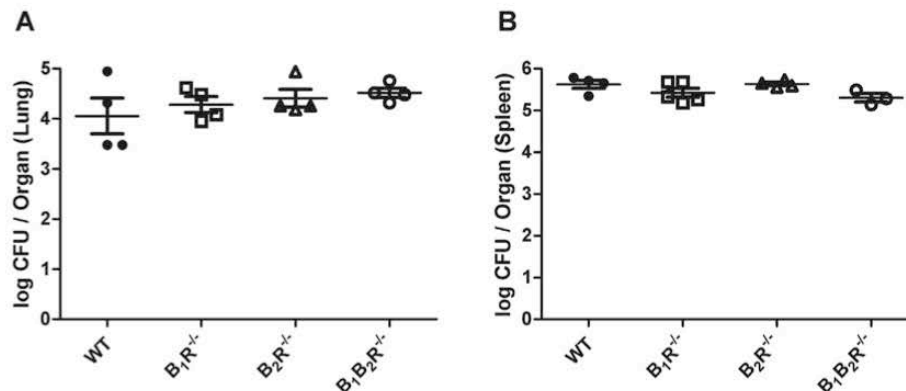


Fig. 1. Infection of mice lacking bradykinin  $B_1$  and  $B_2$  receptors with *M. tuberculosis* H37Rv. Effects of *M. tuberculosis* infection in bacterial loads of lungs (A) and spleens (B) in  $B_1$  and  $B_2$  receptor knockout mice. Bacterial counts recovered from infected mice were firstly converted into logarithms of CFU ( $\log_{10}$  CFU). Data were evaluated by ANOVA, followed by Dunnett's post-test, using GraphPad Prism 5.0.

SSR240612 (5 mg/kg/day, oral gavage), HOE-140 (0.13 mg/kg/day, intraperitoneal), or the combination of SSR240612 plus HOE-140. Prior to administration, SSR240612 and HOE-140 solutions were freshly prepared. The untreated group received the vehicle (0.9% NaCl solution) during the treatment period. Mice were euthanized by isoflurane inhalation, three days after the last administrations. The treatment efficacy was assessed on the basis of lung and spleen CFU counts.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Infection of $B_1$ and $B_2$ receptor deleted mice

The first goal was to evaluate the outcomes of *M. tuberculosis* infection in mice with genic deletion of  $B_1R$  and  $B_2R$ . The colony-forming units (CFU) counts in spleens and lungs were not significantly different among all the experimental groups (Fig. 1). Interestingly, there was a decrease ( $P < .01$ ) in the spleen weight of infected double  $B_2R/B_1R$ -KO mice, which might suggest that the excessive splenomegaly ( $P < .001$ ) observed in the  $B_2R$  knockout mice was due to a compensatory up-regulation of  $B_1R$ , as suggested for other experimental results [23]. Similarly,  $B_2R$  knockout mice infected with *Leishmania chagasi* displayed increased spleen weights [5], suggesting a protective role for  $B_2R$  during infection. In this regard,  $B_2R$  seems to play, at least in part, a protective role in renal tissue [24,25]. It is important to point out that different outcomes might be obtained if mice were infected via aerosol or intranasal routes.

#### 3.2. Effects of the agonists and antagonists on RAW 264.7 cell viability

Prior to infection experiments using macrophages (RAW 264.7 cells), the direct effect of the agonists and antagonists in RAW 264.7 viability was evaluated. Concentrations of each agonist/antagonist that did not affect macrophage viability in up to fifteen per cent of untreated controls (Table 1) were chosen for macrophage infection experiments to avoid false positive results.

#### 3.3. *M. tuberculosis* susceptibility results

*M. tuberculosis* was not susceptible to the concentrations of agonists and antagonists tested, which suggests that the minimum inhibitory concentration values are larger than 500 nM for BK or des-Arg<sup>9</sup>-BK, larger than 50  $\mu$ M for HOE-140, and larger than 250  $\mu$ M for SSR240612.

Table 1

Viability of RAW 264.7 cells after incubation with different concentrations of bradykinin, des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin, HOE-140 and SSR240612.

Substance	Concentration	% of cell viability $\pm$ SEM <sup>a</sup>
Bradykinin	3 nM	102 $\pm$ 2
Bradykinin	10 nM	115 $\pm$ 9
Bradykinin	30 nM	114 $\pm$ 3
Bradykinin	100 nM	97 $\pm$ 3
des-Arg <sup>9</sup> -bradykinin	3 nM	108 $\pm$ 8
des-Arg <sup>9</sup> -bradykinin	10 nM	118 $\pm$ 22
des-Arg <sup>9</sup> -bradykinin	30 nM	109 $\pm$ 2
des-Arg <sup>9</sup> -bradykinin	100 nM	94 $\pm$ 5
HOE-140	1 $\mu$ M	104 $\pm$ 6
HOE-140	10 $\mu$ M	84 $\pm$ 7
HOE-140	100 $\mu$ M	81 $\pm$ 5
SSR240612	1 $\mu$ M	98 $\pm$ 7
SSR240612	10 $\mu$ M	99 $\pm$ 3
SSR240612	30 $\mu$ M	114 $\pm$ 19
SSR240612	100 $\mu$ M	73 $\pm$ 17

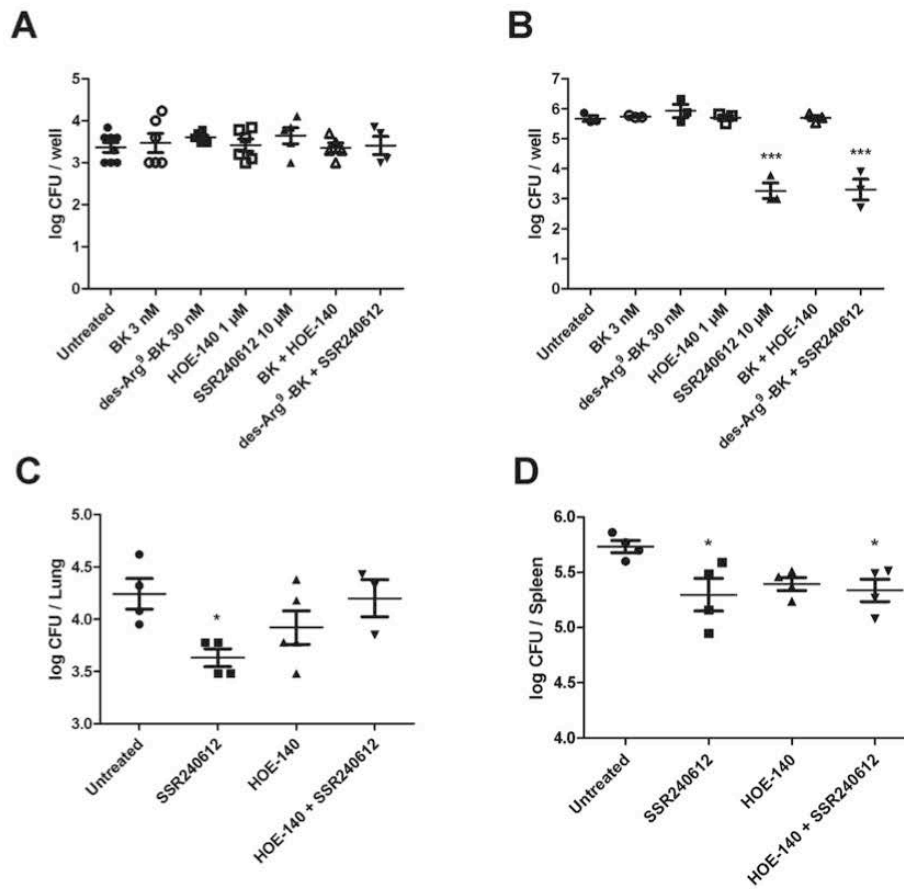
<sup>a</sup> Untreated control wells were considered as 100% of cell viability.

#### 3.4. Infection experiments using macrophages

The first experiment was aimed at evaluating the effects of the pre-incubation of RAW 264.7 cells with BK, des-Arg<sup>9</sup>-BK, HOE-140, and SSR240612, for 30 min, before infection. The results demonstrate that incubation of the selective  $B_1R$  (des-Arg<sup>9</sup>-BK and SSR240612) and  $B_2R$  (BK and HOE-140) agonists and antagonists, respectively, was not able to significantly affect the bacterial loads, when the ligands were incubated before infection (Fig. 2A).

The second experimental design was aimed at investigating the effects of the incubation (for 96 h) with BK, des-Arg<sup>9</sup>-BK, HOE-140, and SSR240612, when these substances were added after infection. Noteworthy, the incubation of SSR240612, alone or in combination with des-Arg<sup>9</sup>-BK, for four days, displayed a marked inhibitory effect on the CFU counts, when tested in the virulent *M. tuberculosis* H37Rv strain (Fig. 2B).

To assess whether or not the activation of kinin receptors could modify the profile of *M. tuberculosis* macrophage infection, the effects of the agonists were tested. Although  $B_2$  kinin receptor might undergo desensitization, this is mainly observed by the incubation of elevated concentrations or by repeated exposure to this agonist. Conversely,  $B_1$  receptors do not seem to be subject to desensitization, differently from  $B_2$  receptors [26]. It is possible that different data may be found upon addition of captopril to BK experiments, but captopril might display effects on the infection per se. For the  $B_1$  agonist des-Arg<sup>9</sup>-BK, the half-



**Fig. 2.** Effects of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor agonists (des-Arg<sup>9</sup>-BK and BK) and antagonists (SSR240612 and HOE-140) in macrophages infected with *M. tuberculosis* and activity of SSR240612 in infected mice. *M. tuberculosis*-loads in RAW 264.7 cells pretreated (A) and treated (B) with bradykinin (3 nM), des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin (30 nM), HOE-140 (1 μM), and SSR240612 (10 μM). CFU counts in lungs (C) and spleens (D) from *M. tuberculosis*-infected mice after treatment with SSR240612 (5 mg/kg, po) or/and HOE-140 (0.13 mg/kg, ip). \*\*\**P* < .001 \**P* < .05 compared to untreated group. Data were evaluated by ANOVA, followed by Dunnett's post-test, using GraphPad Prism 5.0.

life is generally superior to BK, and in most cases no enzyme inhibitor is used before des-Arg<sup>9</sup>-BK incubation.

### 3.5. Expression analysis of B<sub>1</sub>R and B<sub>2</sub>R in infected mice

Kinin B<sub>1</sub>R and B<sub>2</sub>R expression was evaluated in mice infected with *M. tuberculosis* H37Rv. Immunohistochemistry analysis revealed that B<sub>1</sub> receptors are up regulated in spleens (Fig. 3) and lungs (Fig. 4), after 15 and 30 days post infection, respectively, in mice infected with 100 or 1000 bacteria. On the other hand, B<sub>2</sub>R expression appears not to have been altered in spleens (Fig. 3) and lungs (Fig. 4). Similar results have been reported for macrophages from granulomatous lesions in other inflammatory disorder such as Crohn's disease [27]. Accordingly, the results here reported point to B<sub>1</sub>R as a potential target for anti-tuberculosis drug development.

### 3.6. Efficacy of SSR240612 in vivo

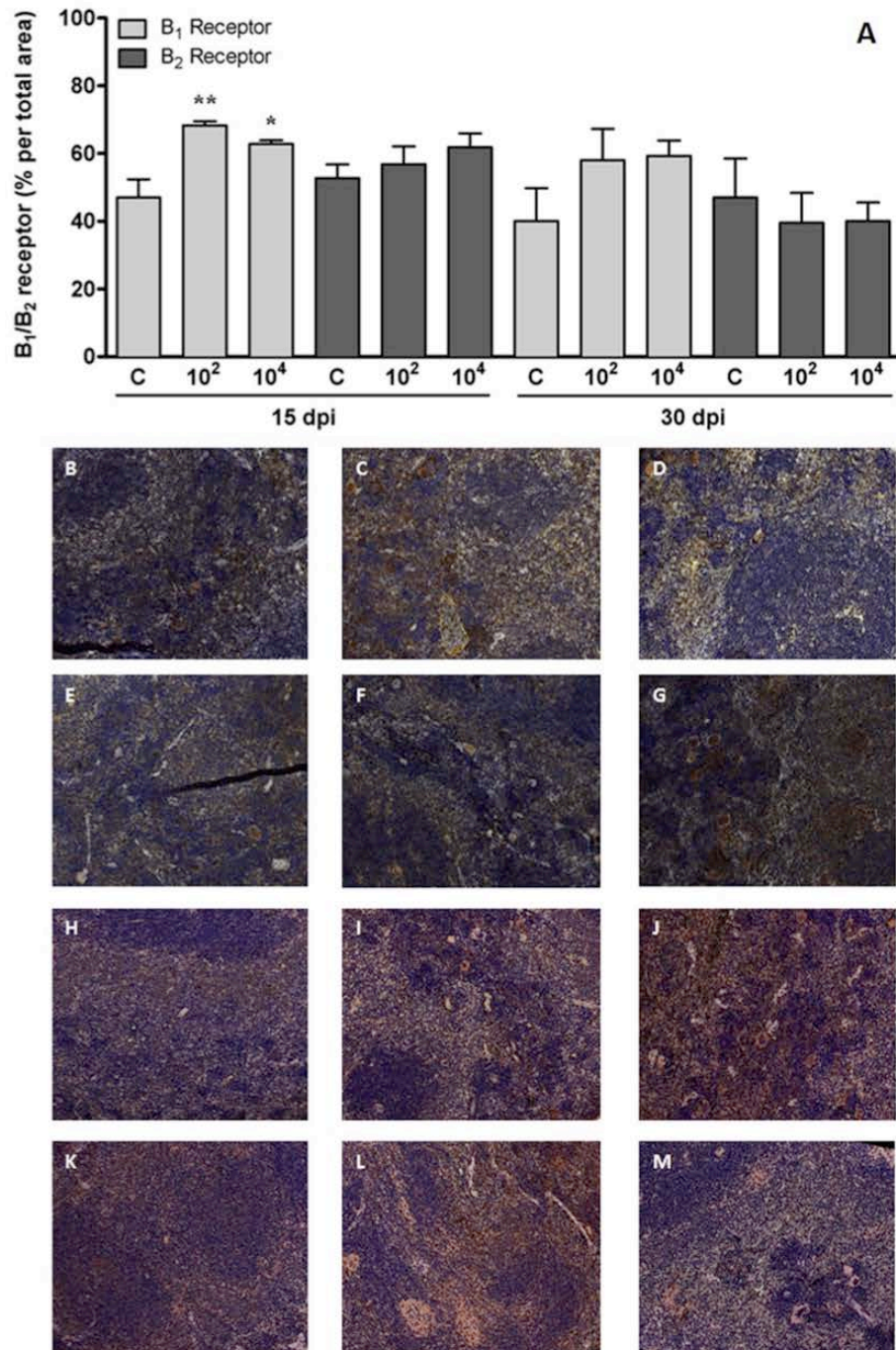
The *in vivo* activities of SSR240612 and HOE-140 in *M. tuberculosis*-infected mice were also investigated. Statistically significant reductions in the CFU counts of *M. tuberculosis* were observed in lungs (Fig. 2C) and spleens (Fig. 2D) from SSR240612-treated mice. Moreover, the group that was treated with the combination of SSR240612 plus HOE-

140 had statistically significant lower CFU load in the spleens (Fig. 2D), compared to the untreated group. These results are in agreement with the protein expression data, lending further support for the proposal of B<sub>1</sub>R as a molecular target for new drugs to treat TB.

It is important to consider that knockout animals may develop compensating mechanisms [22,23], that might explain, at least in part, the differences observed when comparing data with antagonist treatments and knockout animals. The results here described provide experimental evidence on the likely relevance of kinin receptors, more specifically B<sub>1</sub>R, in the mechanisms of pathogenesis of tuberculosis infection. Accordingly, further efforts focusing on SSR240612 as a strategy to treat human tuberculosis appear worth pursuing.

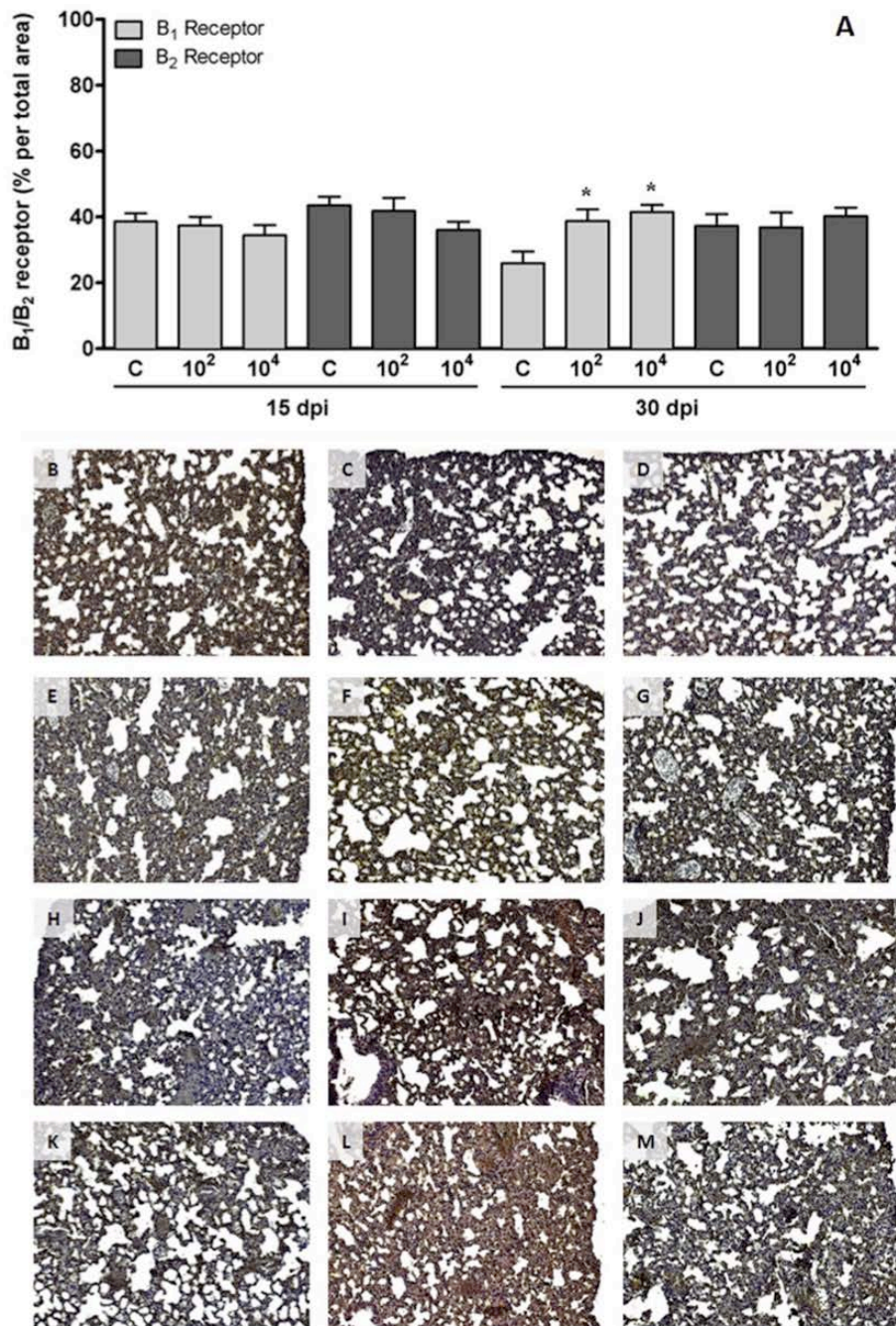
### Acknowledgments

This work was supported by Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES/FUNTEC; grant number 14.2.0914.1) and National Institute of Science and Technology on Tuberculosis (Dicit/SCTIE/MS-MCT-CNPq-FNDTC-CAPES), Brazil. This work was also supported by National Council for Scientific and Technological Development of Brazil (CNPq) [grant number 404440/2016-9 to V.S.R.-J.J., D.S.S. and L.A.B. also acknowledge grants awarded by FINEP and FAPERGS-CNPq-PRONEX-2009. D.S.S., L.A.B., J.P. and M.M.C. are



**Fig. 3.** Kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor expression in mice infected with *M. tuberculosis*. Immunolabelling for B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors in spleens of *M. tuberculosis*-infected mice (with 10<sup>2</sup> or 10<sup>4</sup> bacteria), 15 or 30 days post-infection (dpi) (A). Representative images of immunohistochemistry analysis for B<sub>1</sub> receptors in spleens, 15 dpi (B, C and D), and 30 dpi (H, I and J); and B<sub>2</sub> receptor, 15 dpi (E, F and G) and 30 dpi (K, L and M). \*\**P* < .01 \**P* < .05 compared to non-infected control mice. Data were evaluated by ANOVA, followed by Dunnett's post-test, using GraphPad Prism 5.0. The columns represent an experimental N = 4 to 5 per group and the vertical lines indicate the standard error of the mean.





**Fig. 4.** Kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor expression in mice infected with *M. tuberculosis*. Immunolabelling for B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors in lungs of *M. tuberculosis*-infected mice (with 10<sup>2</sup> or 10<sup>4</sup> bacteria), 15 or 30 days post-infection (dpi) (A). Representative images of immunohistochemistry analysis for B<sub>1</sub> receptors in lungs, 15 dpi (B, C and D), and 30 dpi (H, I and J); and B<sub>2</sub> receptor, 15 dpi (E, F and G) and 30 dpi (K, L and M). \**P* < .05 compared to non-infected control mice. Data were evaluated by ANOVA, followed by Dunnett's post-test, using GraphPad Prism 5.0. The columns represent an experimental N = 4 to 5 per group and the vertical lines indicate the standard error of the mean.

research career awardees of the National Council for Scientific and Technological Development of Brazil (CNPq). V.R.-J. acknowledges a scholarship awarded by FAPERGS-CAPES (DOCFIX, 05/2013). We would like to thank Mrs. Janaína Silva for her excellent technical

assistance in immunohistochemical analysis.

## References

- [1] WHO. Global tuberculosis report 2016. 2016.
- [2] Campos MM, Leal PC, Yunes RA, Calixto JB. Non-peptide antagonists for kinin B<sub>1</sub> receptors: new insights into their therapeutic potential for the management of inflammation and pain. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27:646–51.
- [3] Scharfstein J, Schmitz V, Morandi V, Capella MM, Lima AP, Morrot A, et al. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors. *J Exp Med* 2000;192:1289–300.
- [4] Scharfstein J, Andrade D. Infection-associated vasculopathy in experimental Chagas Disease: pathogenic roles of endothelin and kinin pathways. *Adv Parasitol* 2011;76:101–27.
- [5] Nico D, Feijó DF, Maran N, Morrot A, Scharfstein J, Palatnik M, et al. Resistance to visceral leishmaniasis is severely compromised in mice deficient of bradykinin B2-receptors. *Parasites Vectors* 2012;5:261–8.
- [6] Schmitz V, Almeida LN, Svensjö E, Monteiro AC, Köhl Jörg, Scharfstein J. C5a and bradykinin receptor cross-talk regulates innate and adaptive immunity in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 2014;193:3613–23.
- [7] Monteiro AC, Schmitz V, Morrot A, de Arruda LB, Nagajothi F, Granato A, et al. Bradykinin B2 Receptors of dendritic cells, acting as sensors of kinins proteolytically released by *Trypanosoma cruzi*, are critical for the development of protective type-1 responses. *PLoS Pathog* 2007;3:1730–44.
- [8] Bengtson SH, Phagoo SB, Norrby-Teglund A, Pahlman L, Mörgelin M, et al. Kinin receptor expression during *Staphylococcus aureus* infection. *Blood* 2006;108:2055–63.
- [9] Dornelles FN, Santos DS, Van Dyke TE, Calixto JB, Batista Jr. EL, Campos MM. In vivo up-regulation of kinin B<sub>1</sub> receptors after treatment with *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in rat paw. *J Pharmacol Exp Therapeut* 2009;330:756–63.
- [10] Ramani K, Garg AV, Jawale CV, Conti HR, Whibley N, Jackson EK, et al. The kallikrein-kinin system: a novel mediator of IL-17 driven anti-*Candida* immunity in the kidney. *PLoS Pathog* 2016;12:e1005952.
- [11] Qadri F, Rimmelle F, Mallis L, Häuser W, Dendorfer A, Jöhren O, et al. Acute hypothalamo-pituitary-adrenal axis response to LPS-induced endotoxemia: expression pattern of kinin type B1 and B2 receptors. *Biol Chem* 2016;397:97–109.
- [12] Campos MM, Henriques MGMO, Calixto JB. The role of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> kinin receptors in oedema formation after long-term treatment with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG). *Br J Pharmacol* 1997;120:502–8.
- [13] Whalley ET, Figueroa CD, Gera L, Bhoola KD. Discovery and therapeutic potential of kinin receptor antagonists. *Expert Opin Drug Discov* 2012;7:1129–48.
- [14] Laine O, Leppänen I, Koskela S, Antonen J, Mäkelä S, Sinisalo M, et al. Severe *Puumala virus* infection in a patient with lymphoproliferative disease treated with ibrutinib. *Infect Dis* 2015;47:107–11.
- [15] Murugesan P, Jung B, Lee D, Khang G, Doods H, Wu D. Kinin B1 receptor inhibition with B11 13823 reduces inflammatory response, mitigates organ injury, and improves survival among rats with severe sepsis. *J Infect Dis* 2016;213:532–40.
- [16] Qian X, Nguyen DTM, Li Y, Lyu J, Graviss EA, Hu TY. Predictive value of serum bradykinin and desArg9-bradykinin levels for chemotherapeutic responses in active tuberculosis patients: a retrospective case series. *Tuberculosis* 2016;101:2109–18.
- [17] Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. National centre for the replacement, refinement and reduction of animals in research. Animal research: reporting in vivo experiments—the ARRIVE guidelines. *J Cerebr Blood Flow Metabol* 2011;31:991–3.
- [18] Rodrigues-Junior VS, Santos Jr. A, Santos AJ, Schneider CZ, Calixto JB, Sousa EHS, et al. Activity of IQG-607, a new orally active compound, in a murine model of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Int J Antimicrob Agents* 2012;40:182–5.
- [19] Rodrigues-Junior VS, Villela AD, Gonçalves RSB, Abbadi BL, Trindade RV, López-Gavín A, et al. Mefloquine and its oxazolidinone derivative compound are active against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains and in a murine model of tuberculosis infection. *Int J Antimicrob Agents* 2016;48:203–7.
- [20] Nicoletti NF, Erig TC, Zanin RF, Pereira TCB, Bogo MR, Campos MM, et al. Mechanisms involved in kinin-induced glioma cells proliferation: the role of ERK1/2 and PI3K/Akt pathways. *J Neuro Oncol* 2014;120:235–44.
- [21] Rodrigues-Junior VS, Santos Jr. AA, Villela AD, Belardinelli JM, Morbidoni HR, Basso LA, et al. IQG-607 abrogates the synthesis of mycolic acids and displays intracellular activity against in infected *Mycobacterium tuberculosis* macrophages. *Int J Antimicrob Agents* 2014;43:82–5.
- [22] Nicoletti NF, Sénécal J, da Silva VD, Roxo M, Ferreira NP, Leite R, et al. Primary role for kinin B1 and B2 receptors in glioma proliferation. *Mol Neurobiol* 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-016-0265-9>.
- [23] Duka A, Kintsurashvili E, Duka I, Ona D, Hopkins TA, Bader M, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition after experimental myocardial infarct: role of the kinin B1 and B2 receptors. *Hypertension* 2008;51:1352–7.
- [24] Kakoki M, McGarrah RW, Kim HS, Smithies O. Bradykinin B1 and B2 receptors both have protective roles in renal ischemia/reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci Unit States Am* 2007;104:7576–81.
- [25] Buléon M, Allard J, Jaafar A, Pradadaude F, Dickson Z, Ranera MT, et al. Pharmacological blockade of B2-kinin receptor reduces renal protective effect of angiotensin-converting enzyme inhibition in db/db mice model. *Am J Physiol Ren Physiol* 2008;294:F1249–56.
- [26] Duchene J, Ahluwalia A. The kinin B<sub>1</sub> receptor and inflammation: new therapeutic target for cardiovascular disease. *Curr Opin Pharmacol* 2009;9:125–31.
- [27] Stadnicki A, Pastucha E, Nowaczyk G, Mazurek U, Plewka D, Machnik G, et al. Immunolocalization and expression of kinin B1R and B2R receptors in human inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;289:G361–6.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Pró-Reitoria de Graduação  
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar  
Porto Alegre - RS - Brasil  
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564  
E-mail: [prograd@pucrs.br](mailto:prograd@pucrs.br)  
Site: [www.pucrs.br](http://www.pucrs.br)