

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA

Camila Camponogara Dalla Pozza

**ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO
ANQUIRINA 1 E EFEITO FARMACOLÓGICO DA DIOSMETINA NA
QUEIMADURA DE PELE INDUZIDA PELA RADIAÇÃO UVB EM
CAMUNDONGOS**

Santa Maria, RS
2021

Camila Camponogara Dalla Pozza

**ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO ANQUIRINA
1 E EFEITO FARMACOLÓGICO DA DIOSMETINA NA QUEIMADURA DE PELE
INDUZIDA PELA RADIAÇÃO UVB EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor (a) em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.**

Orientadora: Prof^a Dr^a. Sara Marchesan de Oliveira

Santa Maria, RS
2021

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Dalla Pozza, Camila
Envolvimento do Receptor de Potencial Transitório
Anquirina 1 e Efeito Farmacológico da Diosmetina na
Queimadura de Pele Induzida pela Radiação UVB em
Camundongos / Camila Dalla Pozza.- 2021.
155 p.; 30 cm

Orientadora: Sara Marchesan de Oliveira
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica, RS, 2021

1. Radiação Ultravioleta 2. Inflamação 3. Estresse
oxidativo 4. HC-030031 5. Diosmetina I. Marchesan de
Oliveira, Sara II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, CAMILA DALLA POZZA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Camila Camponogara Dalla Pozza

**ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO ANQUIRINA
1 E EFEITO FARMACOLÓGICO DA DIOSMETINA NA QUEIMADURA DE PELE
INDUZIDA PELA RADIAÇÃO UVB EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor (a) em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.**

Aprovada em 14 de outubro de 2021

Sara Marchesan Oliveira

Sara Marchesan de Oliveira, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Cássia Regina da Silva

Cássia Regina da Silva, Dra. (UFU) – Videoconferência

Mauro Oliveira

Mauro Schneider Oliveira, Dr. (UFSM) – Videoconferência

Michel Fleith Otuki

Michel Fleith Otuki, Dr. (UFPR) – Videoconferência

Micheli Mainardi Pillat

Micheli Mainardi Pillat, Dra. (UFSM) – Videoconferência

Santa Maria, RS

2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus e a Jesus Cristo, os quais estiveram presentes em todos os momentos, guiando e iluminando meus passos, para que sempre o melhor acontecesse.

À minha orientadora Sara Marchesan de Oliveira primeiramente pela oportunidade de participar dos estudos do LabNeuro durante minha graduação, mestrado e doutorado. Se hoje estou concretizando este importante passo em minha vida profissional, foi graças à oportunidade e acolhida que me deste. Agradeço por estar sempre disponível para sanar quaisquer dúvidas, pela preocupação e zelo. Agradeço também pela sua excelente orientação, um grande exemplo, o qual permeará como espelho em minha vida profissional.

À minha família, meu alicerce, não somente nos momentos de glória, mas também nos de adversidades. À minha mãe, Rejane, minha guerreira, meu exemplo de caráter, agradeço por sempre ter acreditado e apoiado os meus sonhos. Se hoje estou completando mais esta jornada, você, minha mãe, tem grande parte nisso, pois sempre fez florescer a importância do estudo, a curiosidade e a busca pelo conhecimento. Ao meu pai, Davi, pelas palavras de coragem, fé e perseverança, que não me fizeram desmorecer nos percalços encontrados. Ao meu irmão, Daniel, pela ajuda, companheirismo, paciência e carinho em todos os momentos. À minha vó, Ladir, pelas palavras amigas e confortantes, pela ajuda e zelo durante minha trajetória.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho, o meu agradecimento. Em especial, aos amigos e parceiros do LabNeuro, obrigada pela convivência e momentos passados juntos, os quais foram importantes para minha trajetória. Ao meu grupo de pesquisa, Indiara, Natháli, Evelyne, Maria Fernanda e Gabriela, obrigada pela convivência e parceria nos momentos de trabalho, bem como fora dele. Tenho certeza que todos os momentos e conquistas que passamos juntas ficarão eternamente marcados em minha vida.

Meu eterno agradecimento à Universidade Federal de Santa Maria, ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida e aos demais órgãos de fomento. Muito Obrigada!

RESUMO

ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO ANQUIRINA 1 E EFEITO FARMACOLÓGICO DA DIOSMETINA NA QUEIMADURA DE PELE INDUZIDA PELA RADIAÇÃO UVB EM CAMUNDONGOS

AUTORA: Camila Camponogara Dalla Pozza
ORIENTADORA: Sara Marchesan de Oliveira

A exposição excessiva à radiação ultravioleta tipo B (UVB) pode levar a diversas alterações na pele resultante dos processos oxidativos e inflamatórios instalados, esses, por sua vez, ocasionados pela ativação de receptores neuronais e não neuronais. Dentre estes, os receptores de potencial transitório do tipo vaniloide 1 (TRPV1) e anquirina 1 (TRPA1) apresentam um papel importante na indução e modulação de doenças inflamatórias cutâneas. Estudos já demonstraram a participação do canal TRPV1, mas não do canal TRPA1 na inflamação de pele induzida por radiação UVB. Assim, investigamos a participação do TRPA1 e o potencial anti-inflamatório e antioxidante tópico da diosmetina, um novo antagonista do TRPV1, em um modelo de queimadura solar induzido pela radiação UVB em camundongos. As orelhas dos camundongos *Swiss* machos foram expostas a uma fonte de radiação UVB única (0,5 J/cm²) ou repetida (3 exposições de 0,1 J/cm² em dias alternados). Formulações semissólidas (creme a base Lanette[®]) contendo HC-030031 (antagonista TRPA1; 0,01-1%), diosmetina (antagonista TRPV1; 0,01-1%) ou dexametasona (controle positivo; 0,5%) foram aplicadas topicamente (imediatamente após a radiação UVB). Avaliamos parâmetros inflamatórios (edema de orelha, atividades das enzimas mieloperoxidase e *N*-acetil- β -D-glicosaminidase, alterações histológicas e níveis de citocinas inflamatórias), oxidativos (quantificação de intermediários reativos de oxigênio e atividade das enzimas superóxido dismutase e NADPH oxidase) e proliferativos [hiperplasia epidermal (análise histológica) e níveis de antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e TRPA1 (análise imunohistoquímica)]. Verificamos a contribuição dos canais TRPA1 e TRPV1 neuronal e não neuronal sobre os parâmetros inflamatórios induzidos pela radiação UVB, através da dessensibilização das terminações nervosas cutâneas por resiniferatoxina (RTX; 50 μ g/kg s.c). No modelo de exposição única à radiação UVB, o tratamento tópico com um antagonista TRPA1 (HC-030031; 1%) ou com diosmetina (1%) reduziu o edema de orelha [inibição máxima (I_{max}) de 70 \pm 9% e 82 \pm 9%; respectivamente], a atividade da mieloperoxidase (I_{max} de 72 \pm 7% e 59 \pm 10%, respectivamente), o número de células inflamatórias infiltradas no tecido cutâneo (análise histológica), níveis de citocinas inflamatórias (MIP-2 e IL-1 β) e demais parâmetros oxidativos avaliados. A dexametasona tópica (0,5%) também se mostrou eficaz na redução dos parâmetros inflamatórios e oxidativos induzidos pela exposição única à radiação UVB. Já no modelo de exposição repetida à radiação UVB, o tratamento tópico com um antagonista TRPA1 (0,1%) reduziu o edema de orelha, a atividade da mieloperoxidase e *N*-acetil- β -D-glicosaminidase (I_{max} de 54 \pm 5%, 53 \pm 3% e 75 \pm 7%; respectivamente), o número de células infiltradas no tecido cutâneo, a hiperplasia epidermal, os níveis de PCNA (I_{max} de 74 \pm 3%) e o conteúdo do TRPA1 (I_{max} de 95 \pm 2%). A dexametasona tópica (0,5%) também reduziu os parâmetros inflamatórios e proliferativos induzidos pela exposição repetida à radiação UVB. A partir do processo de denervação por RTX, ambos os canais TRPA1 e TRPV1 não neuronal contribuíram, parcialmente, para o desenvolvimento do edema de orelha induzido pela exposição única à radiação UVB, enquanto que a infiltração de células inflamatórias foi majoritariamente mediada pelo TRPA1 e TRPV1 neuronal (expressos em fibras nervosas cutâneas). Assim, nós propomos que o canal TRPA1 induz estados patofisiológicos observados após a exposição à radiação UVB. Ainda, nosso estudo sugere que o flavonoide diosmetina pode ser uma terapia eficaz e promissora para as queimaduras de pele induzida pela radiação UVB.

Palavras-chave: Radiação Ultravioleta; Inflamação; Estresse oxidativo; HC-030031; Diosmetina; Resiniferatoxina.

ABSTRACT

ANKYRIN 1 TRANSIENT POTENTIAL RECEPTOR INVOLVEMENT AND PHARMACOLOGICAL EFFECT OF DIOSMETIN ON SKIN BURN INDUCED BY UVB RADIATION IN MICE

AUTHOR: Camila Camponogara Dalla Pozza

ADVISER: Sara Marchesan de Oliveira

Excessive exposure to type B ultraviolet radiation (UVB) can lead to several changes to the skin resulting from the oxidative and inflammatory processes installed through the neuronal and non-neuronal receptors activation. Among these, vanilloid 1 (TRPV1) and ankyrin 1 (TRPA1) transient potential receptors play an essential role in the induction and modulation of skin inflammatory diseases. Studies have already demonstrated the participation of the TRPV1 channel, but not the TRPA1 channel, in the skin inflammation induced by UVB radiation. Thus, we investigated the involvement of the TRPA1 and the topical anti-inflammatory and antioxidant potential of diosmetin, a novel TRPV1 antagonist, in a model of sunburn induced by UVB radiation in mice. Ears of male Swiss mice were exposed to a single (0.5 J/cm^2) or repeated (0.1 J/cm^2 ; three exposures on alternate days) UVB radiation source. Semisolid formulations (Lanette[®] based cream) containing HC-030031 (TRPA1 antagonist; 0.01-1%), diosmetin (TRPV1 antagonist; 0.01-1%) or dexamethasone (positive control; 0.5%) were topically applied (immediately after UVB radiation). We evaluated inflammatory parameters (ear edema, myeloperoxidase, and N-acetyl- β -D-glycosaminidase enzymes activities, histological changes, and inflammatory cytokines levels), oxidative (quantification of reactive oxygen intermediates and superoxide dismutase and NADPH oxidase enzymes activities), and proliferative [epidermal hyperplasia (histological analysis) and nuclear cell proliferation antigen (PCNA) and TRPA1 (immunohistochemical analysis) levels]. We verified the contribution of neuronal and non-neuronal TRPA1 and TRPV1 channels on inflammatory parameters induced by UVB radiation through desensitization of cutaneous nerve endings by resiniferatoxin (RTX; $50 \mu\text{g/kg s.c}$). In the single exposure to UVB radiation model, the topical treatment with a TRPA1 antagonist (HC-030031; 1%) or diosmetin (1%) reduced ear edema [maximum inhibition (I_{max}) of $70 \pm 9\%$ and $82 \pm 9\%$; respectively], myeloperoxidase activity (I_{max} of $72 \pm 7\%$ and $59 \pm 10\%$, respectively), the number of inflammatory cells infiltrated in the skin tissue (histological analysis), inflammatory cytokines levels (MIP-2 and IL-1 β) and other oxidative parameters evaluated. Topical dexamethasone (0.5%) was also effective in reducing inflammatory and oxidative parameters induced by a single exposure to UVB radiation. In the repeated exposure to UVB radiation model, topical treatment with TRPA1 antagonist (0.1%) reduced ear edema, myeloperoxidase activity, and N-acetyl- β -D-glycosaminidase (I_{max} of $54 \pm 5\%$, $53 \pm 3\%$, and $75 \pm 7\%$, respectively), the number of cells infiltrated in the skin tissue, epidermal hyperplasia and levels of PCNA (I_{max} of $74 \pm 3\%$) and TRPA1 (I_{max} of $95 \pm 2\%$). Topical dexamethasone (0.5%) also reduced the inflammatory and proliferative parameters induced by repeated exposure to UVB radiation. From the denervation process by RTX, both non-neuronal TRPA1 and TRPV1 channels partially contributed to the development of ear edema induced by a single exposure to UVB radiation. At the same time, the inflammatory cell infiltration was mainly mediated by neuronal TRPA1 and TRPV1 (cutaneous nerve fibers). Thus, we propose that the TRPA1 channel induces pathophysiological states observed after exposure to UVB radiation. Our study also suggests that flavonoid diosmetin may be an effective and promising therapy for skin burns induced by UVB radiation.

Keywords: Ultraviolet radiation; Inflammation; Oxidative stress; HC-030031; Diosmetin; Resiniferatoxin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura e componentes celulares residentes e infiltrantes da pele humana.....	31
Figura 2. Patofisiologia da queimadura de pele induzida pela radiação UVB.....	53
Figura 3. Interações neuroimune no tecido cutâneo.....	60
Figura 4. Divisão filogenética das subfamílias dos canais TRP em humanos (A), Representação espacial da estrutura e multimerização dos canais TRP (B), Características estruturais dos canais TRPV1 e TRPA1 (C).....	61
Figura 5. Expressão dos receptores de potencial transitório (TRP) em células da pele (residentes ou infiltrantes) e em fibras nervosas sensoriais cutâneas.....	64
Figura 6. Envolvimento do canal TRPA1 e efeito antioxidante e anti-inflamatório tópico da diosmetina na queimadura de pele induzida pela radiação UVB.....	118

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Certificados de aprovação do projeto e emenda realizados com animais experimentais pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria.....	153
ANEXO B – Permissões de uso dos artigos científicos na Tese.....	155

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARD	Domínio de Repetição de Anquirina (do inglês <i>Ankyrin Repeat Domain</i>)
CGRP	Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (do inglês <i>Calcitonin Gene Related Peptide</i>)
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Danos (do inglês <i>Damage-Associated Molecular Pattern</i>)
dDCs	Células Dendríticas Dermais (do inglês <i>Dermal Dendritic Cells</i>)
dWAT	Tecido Adiposo Branco Dérmico (do inglês <i>Dermal White Adipose Tissue</i>)
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
IL	Interleucina
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno (do inglês <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>)
MIP-2	Proteína Inflamatória de Macrófago 2 (do inglês <i>Macrophage Inflammatory Protein 2</i>)
MMPs	Metaloproteinases
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF- κ B	Fator Nuclear Kappa B (do inglês <i>Nuclear Factor Kappa B</i>)
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos (do inglês <i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>)
PRRs	Receptores de Reconhecimento de Padrão (do inglês <i>Pattern Recognition Receptors</i>)
SALT	Tecidos Linfoides Associados à Pele (do inglês <i>Skin-Associated Lymphoid Tissues</i>)
SOD	Superóxido dismutase
SP	Substância P
TGF	Fator de Crescimento Transformante (do inglês <i>Transforming Growth Factor</i>)
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa (do inglês <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>)
TRP	Receptor de Potencial Transitório (do inglês <i>Transient Receptor Potential</i>)
TRPA1	Receptor de Potencial Transitório tipo Vaniloide 1 (do inglês <i>Transient Receptor Potential Ankyrin 1</i>)
TRPC	Receptor de Potencial Transitório tipo Canônico (do inglês <i>Transient Receptor Potential Canonical</i>)
TRPM	Receptor de Potencial Transitório tipo Melastatina (do inglês <i>Transient Receptor Potential Melastatin</i>)
TRPML	Receptor de Potencial Transitório tipo Mucolipina (do inglês <i>Transient Receptor Potential Mucolipin</i>)
TRPN	Receptor de Potencial Transitório não Sensível ao Estímulo Mecânico (do inglês <i>Transient Receptor Potential no mechanopotential</i>)
TRPP	Receptor de Potencial Transitório tipo Policistina (do inglês <i>Transient Receptor Potential Polycystin</i>)
TRPV1	Receptor de Potencial Transitório tipo Anquirina 1 (do inglês <i>Transient Receptor Potential Vanilloid 1</i>)
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	17
2 INTRODUÇÃO	19
3 JUSTIFICATIVA	25
4 OBJETIVOS	27
4.1 OBJETIVO GERAL.....	27
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
5 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
5.1 PELE: FUNÇÃO E ESTRUTURA	29
5.1.1 Queratinócitos	34
5.1.2 Células Dendríticas	35
5.1.3 Macrófagos	39
5.1.4 Fibroblastos	41
5.1.5 Células T	43
5.2 PELE HUMANA X PELE DE CAMUNDONGO.....	44
5.3. RESPOSTA INFLAMATÓRIA.....	45
5.4 PATOFISIOLOGIA DA QUEIMADURA DE PELE INDUZIDA PELA RADIAÇÃO UVB.....	51
5.5 INTERAÇÕES NEUROIMUNE NA PELE	56
5.6 RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSITÓRIO (TRP).....	60
5.6.1 Participação dos canais TRPA1 e TRPV1 em patologias cutâneas	67
5.7 DIOSMETINA: UM NOVO ANTAGONISTA DO CANAL TRPV1.....	70
6 ARTIGOS CIENTÍFICOS	73
7 DISCUSSÃO	105
8 CONCLUSÃO	117
9 PERSPECTIVAS	119
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
ANEXO A	153
ANEXO B	155

1 APRESENTAÇÃO

Esta tese aborda o envolvimento do Receptor de Potencial Transitório Anquirina 1 (TRPA1) e o efeito farmacológico da diosmetina, um novo antagonista do Receptor de Potencial Transitório Vaniloide 1 (TRPV1), na queimadura de pele induzida pela radiação ultravioleta do tipo B (UVB) em camundongos. Ela encontra-se estruturada da seguinte forma:

Introdução, a qual contém uma apresentação mais sucinta sobre os temas abordados ao longo da tese.

Revisão Bibliográfica, a qual apresenta uma revisão da literatura, com temas relacionados à tese, descritos de forma mais aprofundada.

A metodologia utilizada e os resultados que compõem a tese estão apresentados na forma de **Artigos Científicos 1 e 2**, os quais encontram-se descritos na íntegra (Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão/Conclusão e Referências bibliográficas). Os mesmos já estão publicados nas revistas científicas Life Sciences (Artigo Científico 1; doi: 10.1016/j.lfs.2020.118557) e Inflammopharmacology (Artigo Científico 2; doi: 10.1007/s10787-021-00802-1).

Os itens **Discussão** e **Conclusão** apresentam comentários gerais e interpretações complementares acerca dos resultados contidos nos artigos científicos abordados na tese.

Referências Bibliográficas referem-se às citações presentes nos itens Introdução, Revisão Bibliográfica e Discussão desta tese.

Anexos, os quais constam o certificado e emenda de aprovação da Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) e as permissões para uso dos artigos científicos no corpo da tese.

2 INTRODUÇÃO

A pele é o órgão mais extenso do corpo humano (cerca de 2 m² no organismo de um adulto), sendo a superfície mais exposta ao ambiente externo (EYERICH et al., 2018). A pele é dividida em três camadas: epiderme (subdividida em estrato basal, espinhoso, granuloso e córneo), derme e hipoderme. Os queratinócitos são as células epidérmicas que majoritariamente compõem a epiderme. Entretanto, esta camada é composta ainda de outras células residentes (melanócitos, células de Langerhans e células T) (DI MEGLIO; PERERA; NESTLE, 2011; STONE et al., 2018). Abaixo da epiderme e separado pela junção dermoepidermal, encontra-se a derme (papilar e reticular), cuja estrutura é mais complexa à epiderme devido à diversidade de componentes celulares (células dendríticas dérmicas, células natural killer, fibroblastos, células T e B, mastócitos, macrófagos, e neutrófilos) e não celulares (apêndices cutâneos, vasos sanguíneos e linfáticos, fibras de colágeno e elastina) (KABASHIMA et al., 2019; NGUYEN; SOULIKA, 2019). Subjacente à derme, está a hipoderme, que além de atuar no armazenamento de energia, na imunidade cutânea, no suporte mecânico e na termoregulação, esta camada apresenta diversos componentes celulares (fibrócitos, adipócitos, células T e B e macrófagos) que auxiliam nestes processos (CHEN; ZHANG; GALLO, 2019; KABASHIMA et al., 2019).

O comportamento dinâmico e funcional das diferentes células que compõem a pele e seu padrão de distribuição nas estruturas do tecido cutâneo, faz deste tecido uma efetiva barreira protetora, com mecanismos de defesa e reparo bem regulados frente a agentes externos e/ou fatores ambientais, incluindo a radiação ultravioleta (UV) (PEGORARO et al., 2020). O sol emite três principais tipos de raios UV: UVA (320–400 nm), UVB (280–320 nm), and UVC (200–280 nm) (MARTINEZ et al., 2020). O alcance da radiação UV à superfície da terra é composto pelos raios UVA (400-320 nm) e UVB (320-290 nm). Da radiação UV que atinge a terra, 90% é do tipo UVA. A radiação UVA penetra profundamente na camada cutânea, atingindo epiderme e derme. Comparado à radiação UVB, a radiação UVA é mais eficaz em exercer o escurecimento da pele e, se a exposição se torna prolongada, essa também contribui para o processo de queimadura solar (ASSIS et al., 2018).

Por outro lado, a radiação UVB corresponde de 4% a 5% da radiação UV que atinge a terra. Entretanto, a radiação UVB é o principal constituinte ativo da luz solar responsável pelo desenvolvimento da queimadura de pele, uma vez que é considerada muito mais citotóxica e genotóxica do que a radiação UVA (JI et al., 2017; LAN et al., 2016; THIESEN et al., 2017).

Além disso, a radiação UVB atinge principalmente as camadas epidérmicas, levando a danos indiretos e diretos nas células ali presentes, como os queratinócitos. Embora os danos provocados pela radiação UVB concentrem-se nas camadas epidérmicas, 15% desta radiação também atinge células dermais, gerando também eventos biológicos adversos nesta camada cutânea (GEGOTEK et al., 2017). Ambas as radiações UVA e UVB causam danos cutâneos, incluindo reações inflamatórias/imunológicas e oxidativas. Entretanto, a habilidade da radiação UVB induzir queimadura solar é muito maior comparado à UVA (MARTINEZ et al., 2017; MUTHUSAMY; PIVA, 2010). O dano aos queratinócitos e a consequente produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e prostaglandinas pelas células residentes da pele, são mecanismos chave para a iniciação do processo inflamatório induzido pela exposição à radiação UVB (LEE et al., 2017; MUZAFFER et al., 2019; RYSER et al., 2014).

Uma exposição aguda à radiação UVB causa uma variedade de reações adversas à pele, resultante da instalação de um processo inflamatório, caracterizado pelo aparecimento de eritema e dilatação dos vasos sanguíneos cutâneos, sendo frequentemente seguidos pelo desenvolvimento de queimadura e edema (MUTHUSAMY; PIVA, 2010; ONO et al., 2012). Entretanto, a exposição repetida à radiação UVB, pode desencadear eventos inflamatórios crônicos associados à hiperplasia epidermal, fotocarcinogênese e fotoenvelhecimento, sendo esta última intimamente relacionada à perda da elasticidade da pele, consequente da degeneração de componentes da matrix extracelular (fibras colágenas e elásticas, proteoglicanos e glicosaminoglicanos) (LEE et al., 2015; MARTINEZ et al., 2017).

O desenvolvimento de queimadura solar induzida pela exposição à radiação UVB está associado, em parte, pela produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a depleção das reservas antioxidantes endógenas (MARTINEZ et al., 2016). A partir de moléculas químicas intracelulares, a radiação UVB induz à superprodução de EROs, incluindo ânion superóxido e oxigênio singlete, as quais são responsáveis pela iniciação do processo de estresse oxidativo. Estudos *in vitro* demonstram níveis detectáveis de ânion superóxido e oxigênio singlete, mesmo após três minutos de exposição à radiação UVB, atingindo um pico entre 15-30 minutos (YASUI et al., 2006). Dessa maneira, o processo de estresse oxidativo deflagrado amplifica o dano à pele induzido pela radiação UVB (BAEK et al., 2017; LEE et al., 2015; REN et al., 2016).

Além disso, o estresse oxidativo atua concomitantemente com o processo inflamatório, uma vez que as EROs ativam vias inflamatórias transcricionais, tais como fator nuclear Kappa B (NF- κ B), essas responsáveis pela expressão de mediadores inflamatórios e enzimas envolvidas em processos inflamatórios (LEE et al., 2015). Embora haja sistemas antioxidantes

que atuem na proteção do tecido frente aos danos causados pela radiação UVB, o desequilíbrio entre os mecanismos oxidantes e antioxidantes, juntamente com os processos inflamatórios instalados resulta no aparecimento de várias condições patológicas associadas à exposição excessiva ao sol, tais como fotocarcinogênese, fotodermatites e ceratose actínica (BORA et al., 2019; LI N., et al., 2018; MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004; ONO et al., 2012). Neste sentido, o entendimento sobre os diferentes mecanismos patofisiológicos observados na queimadura solar e, conseqüentemente, sua inter-relação se faz necessário.

As vias de interação entre as diferentes células inflamatórias/imunes residentes ou não da pele constituem a base teórica da patofisiologia das doenças inflamatórias de pele (PASPARAKIS; HAASE; NESTLE, 2014). Além disso, o sistema neuronal também contribui para a modulação dos processos patofisiológicos cutâneos, uma vez que a ativação de fibras nervosas sensoriais que inervam a pele desencadeia um processo conhecido como inflamação neurogênica cutânea (CHOI; NARDO, 2018; LOTTI; D'ERME; HERCOGOVÁ, 2014). Após um dano tecidual, a inflamação neurogênica contribui para a iniciação e manutenção do processo inflamatório (CHIU; VON HEHN; WOOLF, 2012). A inflamação neurogênica cutânea é induzida pela liberação de neuropeptídios, tais como substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), a partir de terminações nervosas sensoriais. Os neuropeptídios liberados ativam células residentes da pele como os mastócitos (causando sua degranulação), queratinócitos, macrófagos e células dendríticas, bem como células que infiltram o tecido lesado, como os neutrófilos, promovendo a liberação de mediadores inflamatórios que, por sua vez, ativam seus respectivos receptores alvos (GOUIN et al., 2017; PINHO-RIBEIRO; VERRI Jr; CHIU, 2017). Os neuropeptídios também causam alterações vasculares, promovendo vasodilatação, edema e a transmigração de leucócitos dos vasos sanguíneos em direção ao tecido lesado (GOUIN et al., 2017). Neste sentido, a interação do sistema nervoso e imunológico ocorre tanto localmente, em nível de inflamação neurogênica e ativação de células imunes/inflamatórias, quanto centralmente, controlando vias inflamatórias transcricionais, responsáveis pela produção de mediadores inflamatórios (PETERS et al., 2006).

Vários receptores são conhecidos por participar da inflamação neurogênica cutânea, tais como os receptores de potencial transitório (TRP) do tipo vaniloide 1 (TRPV1) e anquirina 1 (TRPA1), os quais são canais não-seletivos a cátions, mas preferenciais ao íon cálcio (GRACE et al., 2014). Os canais TRPV1 e TRPA1 são co-expressos em terminações nervosas sensoriais da pele e são ativados por diferentes estímulos nocivos mecânicos, químicos e físicos, além de substâncias endógenas e segundos mensageiros produzidos

durante uma lesão tecidual ou inflamação (GOUIN et al., 2017; NASSINI et al., 2014). Além da presença em sistemas neuronais, estes canais também são expressos a nível não neuronal, ou seja, em diferentes células residentes ou não da pele, como queratinócitos, melanócitos, fibroblastos, linfócitos, mastócitos, células dendríticas, células endoteliais, macrófagos e neutrófilos amplificando, dessa forma, o processo inflamatório (ACHANTA et al., 2018; DE LOGU et al., 2020; DENDA; TSUTSUMI, 2011; FUSI et al., 2014; HOU et al., 2017; YANG et al., 2015; ZHOU et al., 2018). Nesta perspectiva, a ampla distribuição dos canais TRP os torna fortes integradores das vias de sinalização neuroimune, o que explica a extensiva participação desses canais em diversos processos fisiológicos, bem como na patofisiologia de doenças de cunho inflamatório/imune (CAMPONOOGARA et al., 2019c, 2020; MORAN; SZALLASI, 2018; PARENTI et al., 2016; TÓTH et al., 2014; YOO et al., 2020; ZHOU et al., 2018, 2019).

Diversos estudos demonstram o envolvimento dos canais TRPA1 em processos inflamatórios de pele, como psoríase, dermatite atópica, dermatite de contato alérgica e irritante (ACHANTA et al., 2018; CAMPONOOGARA et al., 2019c; KODJI et al., 2019; SILVA et al., 2011). Além disso, Hill e Schaefer (2009) mostraram que o canal TRPA1 pode ser ativado pela radiação UVA, e que isso poderia ser mediado pela produção de EROs. Recentemente, outros estudos também relatam que o canal TRPA1 pode ser ativado diretamente pela radiação UVA e UVB em queratinócitos humanos (LIU et al., 2017) ou pela radiação UVB em sinaptossomas da medula espinal de camundongos (FIALHO et al., 2020). Com relação ao canal TRPV1, Lee et al. (2009; 2011) demonstraram que a radiação UV aumentou a expressão do canal TRPV1 e, conseqüentemente, o influxo de cálcio em células de queratinócitos humanos. Adicionalmente, o uso de antagonistas do TRPV1 suprimiu o aumento da espessura de pele (edema) e a expressão de substâncias inflamatórias induzidas pela radiação UV (LEE et al., 2011).

Além disso, o influxo de cálcio após a ativação do canal TRPV1 pela radiação UVB também promove a produção de EROs, disfunção mitocondrial e apoptose (HUANG et al., 2018, 2019). Conjuntamente, esses eventos celulares induzidos pela radiação UVB culminam no desenvolvimento de respostas inflamatórias e proliferativas, tais como: eritema, edema, infiltração de células inflamatórias, hiperplasia epidermal (diferenciação e proliferação aumentada de queratinócitos) e fotoenvelhecimento (CAMPONOOGARA et al., 2021; HOU et al., 2017; KANG et al., 2017; LEE et al., 2011, 2012). Neste sentido, embora já se tenha documentado na literatura a importância do canal TRPV1 na indução de diversos parâmetros observados na queimadura de pele induzida pela radiação UVB, até o momento, não existem

estudos que demonstrem o envolvimento do canal TRPA1, bem como o delineamento das funções desses canais a nível neuronal e não neuronal neste mesmo modelo de queimadura de pele. Desta maneira, o conhecimento dos mecanismos patofisiológicos associados à queimadura de pele induzida pela radiação UVB permite que moléculas antagonistas destes canais funcionem como potenciais terapias para o tratamento deste tipo de condição inflamatória de pele.

Recentemente, foi identificado um novo ligante antagonista do canal TRPV1, a diosmetina (3',5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona) (ADAMANTE et al., 2019). A diosmetina é a aglicona do flavonoide glicosídeo Diosmina, um princípio farmacologicamente ativo de medicamentos com efeitos vasoprotetores (POÓR et al., 2014). A diosmetina é encontrada em frutas cítricas, leguminosa de *Acacia farnesiana* Wild, folhas de *Olea europaea* L., bem como em outras espécies de plantas (CÉSPEDES et al., 2010; DE PRÁ et al., 2017; DOMÍNGUEZ et al., 2011; GATTUSO et al., 2006; MEIRINHOS et al., 2005; ROOWI; CROZIER, 2011; ZHAO et al., 2011). Estudos científicos demonstram que a diosmetina reduz diversos parâmetros inflamatórios e oxidativos (LIAO et al., 2014; LIU et al., 2018; YANG et al., 2017; YU et al., 2014; ZARAGOZÁ et al., 2020), e que muitos dos efeitos anti-inflamatórios da diosmetina são mediados pela inibição das vias de sinalização das proteínas quinases ativadas por mitógeno [MAPKs (JNK e p38)], NF- κ B e inflamassoma NLRP3 (LIU et al., 2018; YANG et al., 2017; YU et al., 2014). Além disso, foi encontrado que a diosmetina exibiu atividade anti-inflamatória em um modelo de inflamação de pele induzido pelo agente irritante 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato em camundongos (CÉSPEDES et al., 2010; SCHINELLA et al., 1998), bem como em modelos de dermatite atópica (LEE et al., 2020; PARK et al., 2020).

Baseado na diversidade de estudos demonstrando a eficácia da diosmetina em doenças inflamatórias em geral, e sabendo do envolvimento do canal TRPV1 na patofisiologia da queimadura de pele mediada pela radiação UVB, a diosmetina, como um ligante antagonista desse canal, poderia atuar como uma estratégia promissora de tratamento das lesões cutâneas evocadas pela exposição à radiação UVB.

3 JUSTIFICATIVA

A exposição excessiva à radiação solar causa uma variedade de reações adversas à pele, incluindo o desenvolvimento de queimaduras solares, devido à indução de respostas inflamatórias e imunes causadas especialmente pela radiação UVB (MARTINEZ et al., 2017; ONO et al., 2012). Acidentes por queimadura são considerados como o quarto tipo de trauma mais comum no mundo, representando o maior problema de saúde pública global (WHO, 2018). O Brasil está localizado em uma região geográfica que recebe irradiação solar intensa durante todo o ano e, principalmente, nas cidades situadas na região nordeste do Brasil, constata-se um elevado índice de radiação UV ao longo de todo ano, sendo considerado nível extremo pela Sociedade Brasileira de Dermatologia (MEYER et al., 2011; OLIVEIRA, 2014). É estimado que aproximadamente 1 milhão de acidentes por queimadura ocorra no país por ano (FRAGA et al., 2018). De um modo geral, segundo dados do Sistema Único de Saúde, de janeiro de 2020 a junho de 2021, foram registradas 1.312 mortes por queimaduras no Brasil (DATASUS, 2021).

Os jovens adultos são considerados os principais candidatos a sofrerem danos associados pela exposição cumulativa à radiação UV, uma vez que muitos trabalham ou praticam atividades de lazer em locais abertos e, por muitas vezes desprotegidos (URASAKI et al., 2016). Especialmente na cidade de Santa Maria (região sul do Brasil), 92,2% dos estudantes universitários reportaram pelo menos um episódio de queimadura solar durante a vida (DALLAZEM et al., 2019). Neste sentido, terapias farmacológicas são amplamente usadas para minimizar os sintomas decorrentes da queimadura solar (LOPES; MCMAHON, 2016). Atualmente, os glicocorticoides e os anti-inflamatórios não esteroidais dispõem-se como a terapia farmacológica disponível na clínica para o tratamento de diversas condições inflamatórias cutâneas e, diferentes estudos relatam a eficácia (tópica ou oral) dessas terapias no tratamento dos sinais/sintomas associados à queimadura de pele induzida pela radiação UVB (LOPES; MCMAHON, 2016; PEGORARO et al., 2020). Embora seja comprovada a efetividade dessas terapias, o uso prolongado pode vir associado a efeitos adversos tópicos e sistêmicos que limitam seu uso (HENGGE et al., 2006; ROTH, 2012; SIMPSON et al., 2014; UNZUETA; VARGAS, 2013). Desta forma, alternativas terapêuticas que mantenham a efetividade dos tratamentos atuais, porém com perfil de segurança superior são necessárias.

Considerando que a inflamação neurogênica cutânea seja um fator contribuinte na iniciação e amplificação da queimadura de pele induzida pela radiação UVB (LEGAT et al., 2002; SCHOLZEN et al., 1998), e que os canais TRPA1 e TRPV1 estejam envolvidos neste

processo (GOUIN et al., 2017), o bloqueio destes canais seria uma alternativa terapêutica interessante na atenuação das lesões cutâneas evocadas pela exposição à radiação UVB, esta proveniente da luz solar. Entretanto, até o momento, nenhum estudo relatou a participação do canal TRPA1 na indução dos diversos parâmetros (inflamatórios, oxidativos e proliferativos) associados à queimadura de pele induzida pela radiação UVB, apesar de seu envolvimento em outras doenças inflamatórias de pele já ter sido comprovado cientificamente (ACHANTA et al., 2018; LIU et al., 2013; SILVA et al., 2011). Neste sentido, a compreensão dos mecanismos patofisiológicos mediados pelo canal TRPA1 na queimadura de pele induzida pela radiação UVB se faz necessário, de modo que, o bloqueio deste canal seja uma estratégia promissora para o tratamento das queimaduras de pele induzidas pela exposição solar.

Em contrapartida, o envolvimento do canal TRPV1 na indução dos parâmetros inflamatórios, oxidativos e de fotoenvelhecimento associados à queimadura de pele evocada pela radiação UVB já está bem estabelecido (LEE et al., 2009, 2011, 2012; HOU et al., 2017; KANG et al., 2017). Nesse caso, antagonistas deste receptor, como a diosmetina (3',5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona), seriam uma alternativa terapêutica promissora no tratamento das queimaduras de pele induzidas pela exposição solar. Além de se comportar como ligante antagonista do canal TRPV1 (ADAMANTE et al., 2019), a diosmetina ainda poderia atenuar as lesões cutâneas acometidas pela exposição à radiação UVB, devido sua ampla ação anti-inflamatória e antioxidante (LIAO et al., 2014; LIU et al., 2018; YANG et al., 2017; YU et al., 2014; ZARAGOZÁ et al., 2020).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o envolvimento do canal TRPA1 e o potencial anti-inflamatório e antioxidante tópico da diosmetina, um flavonoide antagonista do canal TRPV1, na queimadura de pele induzida pela radiação UVB em camundongos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Avaliar o envolvimento do canal TRPA1 sobre parâmetros inflamatórios e oxidativos observados na queimadura de pele induzida pela exposição única à radiação UVB.
- II. Investigar o papel do canal TRPA1 sobre parâmetros inflamatórios e proliferativos observados na queimadura de pele induzida pela exposição repetida à radiação UVB.
- III. Verificar o efeito de um novo ligante antagonista TRPV1, a diosmetina, sobre parâmetros inflamatórios e oxidativos observados na queimadura de pele induzida pela exposição única à radiação UVB.
- IV. Investigar a participação dos canais TRPA1 e TRPV1 neuronal e não neuronal sobre parâmetros inflamatórios observados na queimadura de pele induzida pela exposição única à radiação UVB, após a denervação química de fibras nervosas sensoriais cutâneas.

5 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

5.1 PELE: FUNÇÃO E ESTRUTURA

A pele destaca-se como o órgão mais extenso do corpo humano (cerca de 2 m² no organismo de um adulto), sendo a superfície mais exposta ao ambiente externo (EYERICH et al., 2018). Neste sentido, a pele atua na linha de defesa primária contra invasão de patógenos (*Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium acnes*, *Corynebacterium minutissimum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Demodex folliculorum*, *Malassezia* spp.), exposição a agentes físicos (como a radiação UV), químicos (substâncias irritantes, haptenos), bem como outras agressões externas como venenos e toxinas, assegurando a manutenção da homeostasia, o reparo e a defesa do tecido cutâneo (DAINICHI; HANAKAWA; KABASHIMA, 2014; FINDLEY; GRICE, 2014; MATEJUK, 2018; NESTLE et al., 2009). Estes mecanismos de defesa decorrem-se de uma rede complexa, a qual compreende a funcionalidade da barreira cutânea, biomoléculas e a interação entre diferentes células inflamatórias/imunes residentes ou infiltrantes da pele (EYERICH et al., 2018; NGUYEN; SOULIKA, 2019). Além disso, o tecido cutâneo assegura a manutenção das funções fisiológicas do hospedeiro, prevenindo a perda de água transepidermal, estabilizando a temperatura corporal, permitindo a síntese de vitaminas e hormônios e atuando na percepção/transmissão de estímulos sensoriais (ABDALLAH; MIJOUIN; PICHON, 2017; ABRAIRA; GINTY, 2013; DI MEGLIO; PERERA; NESTLE, 2011).

A habilidade da pele humana em realizar diversas tarefas está intimamente relacionada com sua estrutura, a qual é composta por três camadas: epiderme, derme, e hipoderme (STONE et al., 2018; NGUYEN; SOULIKA, 2019). A epiderme, camada mais externa da pele, é subdividida em estrato basal, espinhoso, granuloso e córneo a partir da camada mais interna para a mais externa. A camada mais interna da epiderme (interface com a derme) é composta pelo estrato basal, esse responsável pela constante renovação celular (turnover) e por respostas imunes desencadeadas pelas células de Langerhans e células T (NESTLE et al., 2009; NGUYEN; SOULIKA, 2019). Os queratinócitos basais movem-se para a camada acima do estrato basal denominada de estrato espinhoso (também conhecido como camada de células espinhosas) para iniciar seu próximo ciclo de maturação (fase inicial de cornificação). Aqui, as células mudam sua forma estrutural (de colunar para poligonal) e sintetizam filamentos intermediários de queratina, bem como outros precursores proteicos e lipídicos. Já os queratinócitos situados no estrato granuloso, produzem ativamente proteínas e lipídios

queratinizados (JIANG et al., 2020). O produto final da maturação dos queratinócitos e as consequentes modificações estruturais (degradação, perda de organelas e secreção extracelular de lípidios) levam a formação do estrato córneo, constituído majoritariamente por corneócitos circundados por filamentos de queratina, involucrina e filagrina. Devido sua interface entre a pele e o ambiente externo, o estrato córneo torna-se crucial na função de barreira da pele (NATARAJAN et al., 2014; PROKSCH; BRANDNER; JENSEN, 2008) (Figura 1).

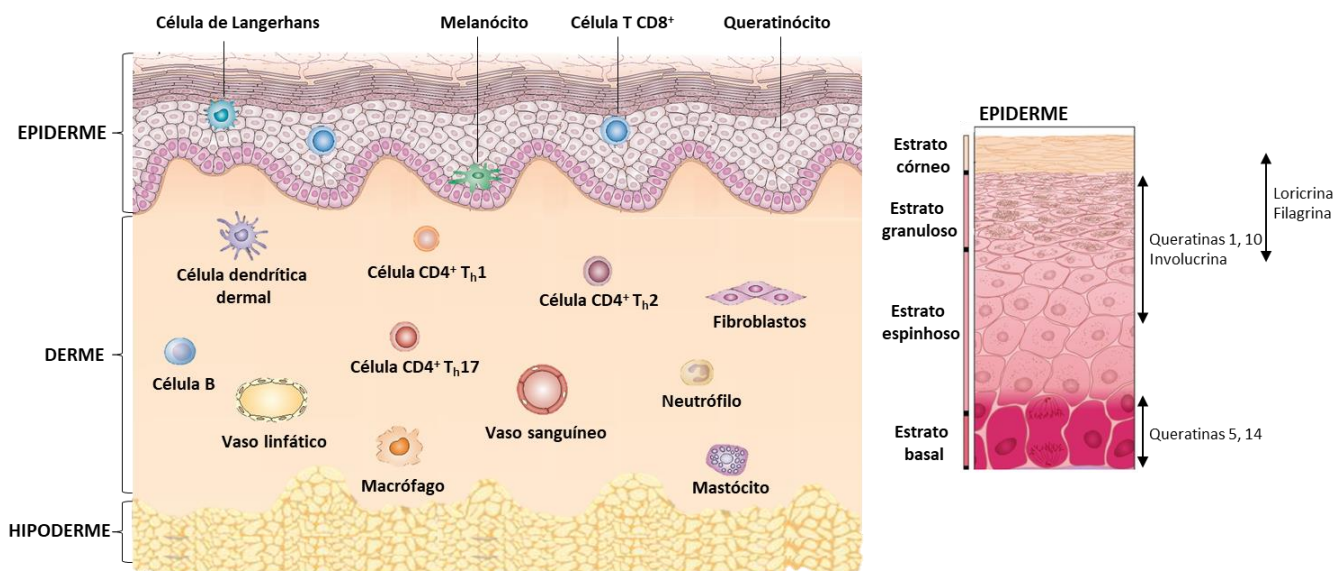
Estudos vêm demonstrando um comportamento dinâmico entre as ações das diferentes células da pele (residentes ou não) e seu padrão de distribuição nas estruturas do tecido cutâneo (DI MEGLIO; PERERA; NESTLE, 2011; NESTLE et al., 2009). Pasparakis et al. (2014) descreveu uma alternativa estrutural-anatômica da pele, subdividindo a epiderme em epitélio folicular (circundante ao folículo piloso) e epitélio interfolicular. Ambos os compartimentos apresentam o queratinócito como o tipo celular mais abundante. Embora também estejam presentes células imunes (células de Langerhans e células T), pouco se conhece sobre as diferenças funcionais entre esses dois compartimentos epiteliais em relação à imunidade da pele. Neste sentido, um melhor entendimento sobre a funcionalidade e comunicação entre as células da pele dispostas nesses compartimentos estruturais torna-se um pré-requisito para desenvolver estratégias que possibilitem conservar a integridade e função de barreira da pele, frente a possíveis danos químicos, físicos ou biológicos.

Abaixo da epiderme e separado pela junção dermoepidermal, encontra-se a camada dérmica (papilar e reticular), cuja estrutura é mais complexa à epiderme devido à diversidade de componentes celulares e não celulares (NESTLE et al., 2009). Em humanos, a derme papilar forma extensões que se comunicam com a epiderme, o que facilita o transporte de nutrientes, através de capilares sanguíneos, às camadas superiores. Em contrapartida, a derme reticular é caracterizada pela presença de apêndices cutâneos (folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas), vasos sanguíneos e linfáticos, terminações nervosas, e pela extensiva matriz extracelular, formada por fibras de colágeno e elastina. Esta matriz torna-se essencial na implantação dos processos inflamatório-imunes de pele, uma vez que fornece o suporte para infiltração de neutrófilos, macrófagos, células T e dentre outros tipos celulares ao tecido cutâneo (KABASHIMA et al., 2019; NGUYEN; SOULIKA, 2019). Entretanto, ambas as subcamadas dérmicas apresentam diversos tipos celulares residentes ou infiltrantes à pele, como células dendríticas dermais, células natural killer, fibroblastos, células T, células B, células linfoides inatas, mastócitos, macrófagos e neutrófilos (ABDALLAH; MIJOUIN;

PICHON, 2017; DI MEGLIO; PERERA; NESTLE, 2011; KABASHIMA et al., 2019) (Figura 1).

Subjacente à derme, está a hipoderme, a qual é composta por fibrócitos, adipócitos, células T, células B e macrófagos. Esta camada atua no armazenamento de energia, no suporte mecânico e na termorregulação (KABASHIMA et al., 2019; NGUYEN; SOULIKA, 2019). Estudos recentes demonstram que o tecido adiposo é capaz de exercer diversos papéis na imunidade cutânea, incluindo na defesa contra infecção por *Staphylococcus aureus*, uma vez que os adipócitos são capazes de produzir adipocinas e peptídeos antimicrobianos (CHEN; ZHANG; GALLO, 2019). Neste sentido, também tem sido reconhecido adipócitos residentes na derme (tecido adiposo branco dérmico; dWAT; do inglês “*dermal white adipose tissue*”). Embora o dWAT e subcutâneo não sejam fisicamente demarcados em humanos, provavelmente diferem em algumas funcionalidades. O dWAT tem sido uma camada imune subestimada, mas claramente importante para a pele. Além de contribuir para funções inerentes do tecido adiposo, o dWAT também exerce funções alternativas, tais como, no ciclo do cabelo, na cicatrização de feridas e na formação de tecido fibroso (CHEN; ZHANG; GALLO, 2019; ZWICK et al., 2019).

Figura 1 – Estrutura e componentes celulares residentes e infiltrantes da pele humana.



Fonte: Adaptado de Nestle et al., 2009.

Embora essas camadas anatômicas sejam críticas para a compreensão da organização e funcionalidade da pele, alguns estudos também dividem a pele em quatro níveis funcionais de barreira cutânea: microbiana, química, física e imune. Apesar de apresentarem características próprias, os componentes da barreira cutânea estão altamente interconectados. A camada mais externa da barreira cutânea compreende diversas comunidades microbianas (bactérias, fungos e vírus), que cobrem todas as áreas da superfície da pele (EYERICH et al., 2018). A fisiologia da pele (sítios úmidos, secos ou sebáceos) é o princípio organizador das comunidades bacterianas. Os sítios sebáceos (face e tronco) são dominados por espécies *Cutibacterium* e *Staphylococcus*, enquanto que *Corynebacterium*, *Staphylococcus* e beta-Proteobacteria são encontradas em áreas úmidas (axilas, dobras do cotovelo e joelho) (BELKAID; SEGRE, 2014; CHEN; FISCHBACH; BELKAID, 2018). Em contrapartida, os fungos do gênero *Malassezia* dominam locais do braço, enquanto que regiões dos pés são colonizadas por *Malassezia*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Epicoccum*, e outros (BELKAID; SEGRE, 2014). A interação da microbiota com os demais componentes da pele do hospedeiro promove a expressão de mediadores (peptídeos antimicrobianos, sistema complemento e citocinas), esses responsáveis pela ativação do sistema imunológico inato. Neste sentido, as inter-relações bem orquestradas entre os componentes da barreira cutânea e, conseqüentemente, a manutenção de sua integridade depende parcialmente da regulação da composição microbiana da pele (EYERICH et al., 2018; PRESCOTT et al., 2017).

A definição de barreira química é menos nítida comparada aos demais componentes da barreira cutânea, devido sua sólida conexão às barreiras física e microbiana. O componente químico de barreira é composto por fatores que contribuem para o pH ácido da superfície cutânea, tais como, lipídios do estrato córneo, e fatores de hidratação natural (aminoácidos e derivados resultantes da proteólise da filagrina). Mudanças no fator de hidratação natural pode alterar o pH cutâneo e, conseqüentemente, a composição lipídica do estrato córneo. Além disso, as glândulas sudoríparas também contribuem para o pH ácido da pele, através da produção de eletrólitos e ácido láctico (EYERICH et al., 2018). O pH da pele humana (5,4-5,9 nas camadas superiores) tem um papel central no funcionamento da barreira cutânea, uma vez que a formação da composição lipídica requer enzimas dependentes de pH ácido. A acidez do estrato córneo também é importante para manter a diversidade do microbioma cutâneo, favorecendo a colonização de bactérias comensais, como *Staphylococcus epidermidis* e das espécies *Corynebacterium*, e impedindo que cepas patogênicas (*Staphylococcus aureus*) estabeleçam infecções no hospedeiro (BELKAID; SEGRE, 2014; NGUYEN; SOULIKA, 2019).

A função da barreira química é dependente das células que compõe a barreira física da pele, essa, por sua vez, composta por corneócitos (estrato córneo) e queratinócitos (estrato granuloso). Esta interdependência ocorre pela participação dos queratinócitos na produção da composição lipídica (triglicerídeos e colesterol) e proteica (filagrina, involucrina, locrina e queratina) de barreira do estrato córneo (MATSUI; AMAGAI, 2015). Além disso, a função de barreira física da pele também depende de moléculas de adesão juncional (JAMs, do inglês “*Junctional Adhesion Molecule*”) e proteínas “tight junction” (claudinas, ocludinas e zona occludens), dispostas nas diferentes camadas da epiderme. Alterações na expressão ou função destes componentes de barreira estão associadas com a patogênese de dermatites de contato irritante e alérgica, atópica e na inflamação de pele induzida pela radiação ultravioleta tipo B (UVB) (BÄSLER; BRANDNER, 2016; DE BENEDETTO et al., 2011; EL-CHAMI et al., 2018; JIA et al., 2018).

Em contrapartida, a barreira imune representa a parte final do sistema de barreira cutânea (EYERICH et al., 2018). As respostas imunes da pele são executadas consecutivamente pelo sistema de imunidade inata e adaptativa. As reações inatas são rápidas, pouco discriminatórias e não exibem memória imunológica. Ao contrário, as respostas adaptativas exibem um alto grau de memória e especificidade, necessitando de um tempo maior para desenvolver-se (BANGERT; BRUNNER; STINGL, 2011). Em 1983, Streilein introduziu o termo Tecidos Linfoides Associados à Pele (SALT, do inglês “*Skin-Associated Lymphoid Tissues*”), baseado em observações sobre a existência de um sistema de defesa projetado especificamente para o tecido cutâneo (STREILEIN, 1983). Esse sistema é constituído por queratinócitos, células dendríticas (células apresentadoras de antígeno), conjunto de gânglios linfáticos e células T, o que introduz a ideia de que as células imunes trafegam de maneira direcionada entre a pele, os linfonodos e circulação periférica (BANGERT; BRUNNER; STINGL, 2011; NESTLE et al., 2009). Já em 2015, Ono e Kabashima propuseram que o sistema SALT poderia ser induzido sob condições inflamatórias locais, denominando-o iSALT. Esta é uma estrutura real que aparece, transitoriamente, em volta das vênulas pós-capilares em resposta a vários estímulos imunogênicos (KABASHIMA et al., 2019). Neste sistema, os macrófagos perivasculares e leucócitos infiltrados ao tecido cutâneo são inseridos juntamente com as células dendríticas dermais e células T, o que torna a estrutura iSALT um local para a uma apresentação de antígenos eficiente e ativação das células T de memória na pele (KABASHIMA et al., 2019; NATSUAKI et al., 2014).

A composição celular da barreira imune cutânea detecta eficientemente os sinais de perigo [padrões moleculares associados a danos (DAMPs, do inglês “*Damage-Associated*

Molecular Patterns”) ou a patógenos (PAMPs; do inglês “*Pathogen-Associated Molecular Patterns*”) e, subsequentemente, inicia uma resposta inflamatória/imune, a fim de reparar o dano à barreira cutânea e reestabelecer a homeostase tecidual (EYERICH et al., 2018). Dado que as células da barreira imune estão distribuídas por toda a pele, essa barreira está altamente interconectada com outros níveis da barreira cutânea. Nos últimos anos, houve um progresso considerável na compreensão das funções dos diferentes tipos de células da pele e dos mecanismos usados para orquestrar o comportamento do tecido cutâneo frente aos possíveis danos (MATEJUK, 2018; PASPARAKIS; HAASE; NESTLE, 2014).

5.1.1 Queratinócitos

Os queratinócitos constituem 95% da composição celular da epiderme, os quais se proliferam na camada basal e diferenciam em direção às camadas mais externas (estrato espinhoso, granuloso e córneo) da epiderme, contribuindo para a efetiva função de barreira física cutânea (Figura 1) (ABDALLAH; MIJOUIN; PICHON, 2017; WULLAERT; BONNET; PASPARAKIS, 2011). Em condições fisiológicas, a diferenciação dos queratinócitos leva uma semana na pele de camundongos e quatro semanas na pele humana. Entretanto, qualquer alteração no seu processo normal de diferenciação/maturação na epiderme, acarreta na perda da integridade de barreira cutânea, e consequentemente, no desenvolvimento de condições patológicas de pele (GONZALES; FUCHS, 2017). Devido sua localização na interface entre o ambiente externo e o restante do organismo, os queratinócitos são reconhecidos como iniciadores da resposta imune (“células sentinelas”), uma vez que detectam os estímulos ambientais (radiação UV, agentes químicos, físicos e componentes microbianos) e os transmitem às outras células imunes residentes da pele (KLICZNIK et al., 2018; PASPARAKIS; HAASE; NESTLE, 2014).

A detecção de sinais externos pelos queratinócitos resulta na ativação de sinalização celular intrínseca, com consequente produção de citocinas [interleucina (IL)-1, IL-6, IL-10, IL-18, fator de necrose tumoral (TNF)- α], quimiocinas (CXCL1, CXCL8 e CCL20) e fatores de crescimento [fator de crescimento transformante (TGF)- α , TGF- β e fator estimulador de colônias granulócitos e macrófagos]. Assim, a plasticidade dos queratinócitos na produção destes mediadores inflamatórios os torna componentes centrais na comunicação com os demais tipos celulares, e consequentemente, na regulação das respostas imunes e inflamatórias de pele (ABDALLAH; MIJOUIN; PICHON, 2017; CHAMBERS; VUKMANOVIC-STEJIC, 2019). Nesta perspectiva, a interação dos queratinócitos com as

células T também se torna crucial na modulação das respostas imunes adaptativas. Recentemente, foi proposto que os queratinócitos têm a capacidade de apresentar antígenos às células T CD4⁺ e CD8⁺ e de manter as células T de memória residentes no tecido cutâneo, evitando uma possível reinfecção, bem como permitindo uma resposta antimicrobiana mais rápida e eficaz (HIRAI et al., 2019; KLICZNIK et al., 2018). Além disso, vale ressaltar que os queratinócitos são uma fonte importante de peptídeos antimicrobianos, como β -defensinas e catelicidinas, os quais auxiliam na neutralização direta ou indireta (via recrutamento de células imunes) de patógenos, na angiogênese, na cicatrização de feridas e na função de barreira cutânea (AKIYAMA et al., 2014; CHESSA et al., 2020).

5.1.2 Células Dendríticas

5.1.2.1 Células de Langerhans

As células de Langerhans representam cerca de 2-4% da composição de células epidermais (taxa de meia-vida entre 53 e 78 dias) (Figura 1) (ABDALLAH; MIJOUIN; PICHON, 2017). Este tipo celular foi primeiramente descrito por Paul Langerhans, em 1890, como sendo parte do sistema nervoso periférico, devido sua morfologia “dendrítica” (CLAYTON et al., 2017). Entretanto, a partir de Silberberg, Baer and Rosenthal (1976), estudos têm considerado as células de Langerhans como originárias do sistema hematopoiético da medula óssea (COLLIN; MILNE, 2016; OTSUKA; EGAWA; KABASHIMA, 2018). Além disso, crescentes evidências indicam que as células de Langerhans são derivadas da linhagem de macrófagos, devido sua localização residente no tecido epidérmico, pela presença de genes de autorrenovação e pela expressão do fator de transcrição (Mafk) diferencial de macrófagos. Embora apresentem similaridades ontogênicas com macrófagos residentes, as células de Langerhans assumem fenótipos e funções de células dendríticas (CLAYTON et al., 2017; DECKERS; HAMMAD; HOSTE, 2018; WU et al., 2016). Fenotipicamente, as células de Langerhans expressam moléculas do complexo principal de histocompatibilidade II, CD11c (integrina αX), marcador hematopoiético CD45, moléculas de adesão celular-epitelial, E-caderina (conexão com queratinócitos) e receptores para captação de antígenos (Fc γ e Fc ϵ). Além disso, as células de Langerhans também expressam langerinas e proteínas CD1 (CD1a, CD1b e CD1c expressos somente em humanos), as quais estão envolvidas com a apresentação de antígenos às células T

(DECKERS; HAMMAD; HOSTE, 2018; MATEJUK, 2018; MERAD; GINHOUX; COLLIN, 2008).

Especificamente, as langerinas são consideradas como receptores de reconhecimento de padrão (PRRs, do inglês “Pattern Recognition Receptors”), as quais reconhecem os antígenos, endocitam e os trafegam para os grânulos de Birbeck (organela endossomal típica das células de Langerhans), esses responsáveis pelo processamento antigênico (ABDALLAH; MIJOUIN; PICHON, 2017; MERAD; GINHOUX; COLLIN, 2008). Além disso, estudos relatam que langerinas, como CD207 (expressa somente em camundongos), também estão envolvidas na formação dos grânulos de Birbeck (DECKERS; HAMMAD; HOSTE, 2018; TAKAHARA et al., 2002). Considerando sua localização na pele (estrato espinhoso da epiderme), as células de Langerhans são parte da barreira cutânea, uma vez que estão intimamente conectadas com os queratinócitos, através da expressão de proteínas “tight junction” (claudina-1 e zonula occludens-1). Além disso, as células de Langerhans detectam diversos sinais provenientes do ambiente, através da extensão de seus dendritos pelas junções intercelulares até o estrato córneo. Neste sentido, estas células também contribuem para a linha de defesa contra danos físicos/químicos ou patógenos, sendo consideradas componentes celulares chave nas respostas imunes inata e adaptativa (CLAYTON et al., 2017; SUMPTER; BALMERT; KAPLAN, 2019; WONG et al., 2019). A principal função das células de Langerhans é transportar os antígenos detectados e processados na pele aos linfonodos e, apresentá-los às células T CD4⁺ e CD8⁺ naive, promovendo a diferenciação de respostas imunes auxiliares (Th1, Th2, Th17 ou T_{reg}), bem como a indução de resposta imune citotóxica (célula T CD8⁺) (KAPLAN et al., 2019; KASHEM; HANIFFA; KAPLAN, 2017; KITASHIMA et al., 2018; MATSUI; MORI; IKEDA, 2015).

Inicialmente, em um estado estacionário, as células de Langerhans na pele são imaturas e apresentam baixos níveis de migração aos linfonodos, o que reflete sua capacidade em exercer uma tolerância imunológica frente aos sinais ambientais encontrados rotineiramente, e aos autoantígenos benignos (AUDIGER et al., 2017; KAPLAN, 2019). Entretanto, durante a inflamação, estas células passam por um processo de maturação, aumentam sua taxa de migração para os linfonodos e tornam-se altamente estimuladoras do sistema imunológico (KASHEM; HANIFFA; KAPLAN, 2017). Quando ativadas, as células de Langerhans maduras se desconectam dos queratinócitos e iniciam seu processo de migração para os linfonodos. Neste processo, os fibroblastos ativados durante a inflamação liberam a quimiocina CXCL12, a qual promove o aumento da expressão do receptor CXCR4 nas células de Langerhans. Esta etapa, juntamente com o aumento de metaloproteínases

(MMP-9 e MMP-2; por queratinócitos, células de Langerhans e fibroblastos), permitem a passagem das células de Langerhans para a derme. Na camada dérmica, estas células passam a expressar o receptor CCR7, permitindo sua responsividade às quimiocinas CCL19 e CCL21 (liberadas pelas células endoteliais linfáticas), e sua consequente migração, através dos vasos linfáticos, para os linfonodos (OTSUKA; EGAWA; KABASHIMA, 2018; SUMPTER; BALMERT; KAPLAN, 2019).

5.1.2.2 Células dendríticas dermais

As células dendríticas que residem na derme são conhecidas como células dendríticas dermais (dDCs; do inglês “*Dermal Dendritic Cells*”) (Figura 1). Ao contrário das células de Langerhans, todas as dDCs são derivadas da medula óssea (origem mieloide), e o repovoamento na pele ocorre aproximadamente a cada sete dias (NGUYEN; SOULIKA, 2019). Este tipo celular foi descoberto por Steinman e Cohn (1973). Em 2011, Steinman foi agraciado com o Prêmio Nobel de Medicina pela descoberta da célula dendrítica e seu papel na comunicação entre sistema imune inato e adaptativo (ABDALLAH; MIJOUIN; PICHON, 2017). O principal papel das dDCs é induzir imunidade específica contra patógenos, alérgenos, bem como promover a tolerância imunológica contra auto antígenos. Esta funcionalidade deve-se a habilidade destas células em apresentar antígenos e ativar as células T presentes na pele (células T de memória ou T_{reg}) ou nos gânglios linfáticos (células T naive) (HANIFFA et al., 2012; SUMPTER; BALMERT; KAPLAN, 2019). Após o contato com o alérgeno (respostas de hipersensibilidade de contato), os macrófagos dermais liberam CXCL2 que recrutam dDCs e células T para formar um aglomerado celular nas regiões perivasculares da pele, o que facilita a apresentação de antígenos e ativação das células T mediada pelas dDCs (KABASHIMA et al., 2019; NATSUAKI et al., 2014). Em adição a ativação das células T dentro da pele, as dDCs também exercem sua função como célula apresentadora de antígenos nos gânglios linfáticos, e a facilidade de migração para os órgãos linfoides é dependente da superregulação do receptor CCR7 (assim como observado na atividade migratória das células de Langerhans) (WORBS; HAMMERSCHMIDT; FORSTER, 2016).

A plasticidade das dDCs é notável, uma vez que elas representam uma rede heterogênea e complexa de subtipos celulares que diferem quanto à sua ontologia, localização e funcionalidade (ABDALLAH; MIJOUIN; PICHON, 2017). Neste sentido, as dDCs podem ser subdivididas em dDCs convencionais (cDC1 e cDC2), DC derivadas de macrófagos (mo-DC), DC duplo negativo (DN DC) e DC plasmocitoides (pDCs) (KABASHIMA et al., 2019;

KASHEM; HANIFFA; KAPLAN, 2017; SUMPTER; BALMERT; KAPLAN, 2019). As dDCs convencionais residem permanentemente na derme (região perivasculare) ou migram para os gânglios linfáticos. O subconjunto cDC1 representa 20-40% das células dendríticas residentes nos gânglios linfáticos. Já na derme de camundongos e humanos, as cDC1s são uma população de dDCs relativamente rara, sendo caracterizadas pela expressão do receptor XCR1 (receptor para quimiocina XCL1; expressa pelas células T CD8⁺); o que também as classifica como XCR1⁺ DC (KASHEM; HANIFFA; KAPLAN, 2017). Embora a cDC1 dermal de camundongos compartilhe uma homologia funcional com a cDC1 humana, algumas diferenças fenotípicas são observadas entre as espécies. A cDC1 dermal de camundongos, classificada também como CD103⁺ DC, expressa proteínas como CD103, enquanto que a cDC1 humana (CD141⁺ DC) apresenta outras proteínas de membrana, como a CD141 (KASHEM; HANIFFA; KAPLAN, 2017; SUMPTER; BALMERT; KAPLAN, 2019). Funcionalmente, o subconjunto cDC1, em ambas as espécies, induz respostas imunes do tipo Th1, as quais estão associadas nas doenças autoimunes e na defesa contra patógenos intracelulares (CANCEL et al., 2019; PRICE; TARBELL, 2015; TESFAYE et al., 2019).

Ao contrário da cDC1, o subtipo cDC2 é mais abundante na derme de camundongos e humanos. Este subconjunto celular é caracterizado pela expressão do marcador mieloide CD11b, o que as classifica também como CD11b⁺ DC. Em camundongos e humanos, estas células apresentam marcadores comuns aos monócitos e macrófagos, como CX3CR1, CCR2 e CD11c, o que dificulta a diferenciação destas células fenotipicamente. Em contrapartida, a proteína CD1c é unicamente expressa na cDC2 humana (CD1c⁺ DC). Funcionalmente, o subconjunto cDC2, em ambas as espécies, induz respostas imunes do tipo Th2 e Th17, as quais estão associadas nas doenças autoimunes, alérgicas e na defesa contra patógenos extracelulares (FLORES-LANGARICA et al., 2018; KUMAR et al., 2019; SICHEN et al., 2017). Outro subtipo de dDCs são as mo-DCs, presentes especificamente na derme de humanos e camundongos. Fenotipicamente, este subtipo celular é similar a cDC2, compartilhando a expressão de CD11b, CX3CR1, CCR2 e CD11c. O equivalente da mo-DCs em humanos é denominado CD14⁺ DC, já que a proteína CD14 é encontrada somente no subconjunto celular da derme humana (KASHEM; HANIFFA; KAPLAN, 2017). Funcionalmente, as mo-DCs apresentam uma menor capacidade de migração aos gânglios linfáticos e de ativação das células T CD4⁺ e T CD8⁺ (TAMOUTOUNOUR et al., 2013).

O subtipo celular DN DC (XCR1⁻ CD11b⁻ DC) reside somente na derme de camundongos (não existe correlatos na derme humana), promovendo respostas imunes do tipo Th2 (KASHEM; HANIFFA; KAPLAN, 2017; SUMPTER; BALMERT; KAPLAN, 2019). Já

as pDC circulam no sangue e nos gânglios linfáticos em condições normais e são normalmente ausentes na pele saudável (ou em baixas concentrações) (KASHEM; HANIFFA; KAPLAN, 2017; PASPARAKIS et al., 2014). Entretanto, estas células podem infiltrar a derme sob diversas condições patológicas de origem inflamatória e autoimune, como na psoríase, lúpus eritematoso, e câncer de pele (LITTLE; VESELY, 2020; MONTI et al., 2020; ZHENG et al., 2019). Ademais, o processo de diferenciação das pDCs ocorre inteiramente na medula óssea, ao contrário da dDC convencionais, cujo desenvolvimento se completa nos tecidos periféricos (pele ou gânglios linfáticos) (ABDALLAH; MIJOUIN; PICHON, 2017). Além de suas funções inflamatórias, as pDCs são essenciais na imunidade antiviral, uma vez que secretam grandes quantidades de interferon- α durante as infecções virais. Esta resposta é desempenhada via detecção dos PAMPs (fragmentos de DNA e RNA viral) pelos receptores TLR7 e TLR9 situados na membrana das pDCs (REIZIS, 2019; SUN et al., 2020).

5.1.3 Macrófagos

Os macrófagos são células da imunidade inata que estão presentes em diversos tecidos, incluindo na camada dérmica da pele, os quais respondem contra a invasão de patógenos (fagocitose) e participam da inflamação e do reparo tecidual (angiogênese, remodelamento e formação de cicatriz) após uma lesão (Figura 1) (NGUYEN; SOULIKA, 2019; OISHI; MANABE, 2018; WATANABE et al., 2019). Em 1968, van Furth e colaboradores propuseram que os monócitos circulantes derivados da medula óssea eram a única fonte de macrófagos teciduais. Entretanto, este paradigma tem sido redefinido, uma vez que estudos de rastreamento de linhagem genética em camundongos demonstraram que os macrófagos teciduais também se originam a partir de células precursoras derivadas do saco vitelino ou do fígado fetal, diferenciando-se em macrófagos durante o desenvolvimento pré-natal (GINHOUX et al., 2016; HOEFFEL; GINHOUX, 2015). Com relação à pele, os macrófagos dermais são derivados de precursores embrionários (durante a fase pré-natal) e de monócitos circulantes adultos (maturam quando atingem a pele). Esta última população reabastece a pele aproximadamente a cada 10 dias. Além disso, os monócitos que originam os macrófagos dermais expressam o antígeno linfocitário 6C (Ly6C) (monócitos clássicos Ly6C^{hi}) e, atingem a pele durante condições inflamatórias, de maneira dependente do receptor CCR2 (GUILLIAMS et al., 2014; WATANABE et al., 2019).

Embora as diferentes populações de macrófagos teciduais não sejam necessariamente similares quanto à origem (macrófagos do saco vitelino e fígado fetal e monócitos circulantes adultos), essas podem constantemente monitorar o microambiente da pele em busca de sinais que indiquem estresse celular, lesão tecidual ou infecção. Neste sentido, os macrófagos exibem um alto grau de plasticidade, sendo capazes de promover diversas funções efetoras para manter ou recompor a homeostasia tecidual. Mills et al. (2000) introduziram o paradigma de polarização de macrófago M1/M2, inspirado no conceito de células Th1 e Th2. Entretanto, a estrutura de polarização foi criada dentro de um contexto *in vitro*, em que culturas de macrófagos isolados de diferentes linhagens de camundongos foram estimuladas a partir um conjunto definido de fatores (MILLS et al., 2000; NAHRENDORF; SWIRSKI, 2016). Neste sentido, os macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo e interferon- γ assumem um fenótipo pró-inflamatório (M1), classificados também como macrófagos “classicamente ativados”. Com este fenótipo, os macrófagos expressam óxido nítrico sintase induzível, secretam citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-12) quimioatraentes de neutrófilos e estimulam respostas tipo Th1 (ARORA et al., 2018; GINHOUX et al., 2016; MILLS, 2015). Ademais, as respostas de macrófagos M1 garantem a resistência à infecção bacteriana (bactérias gram-positivas e gram-negativas), bem como, controlam o crescimento dos patógenos (HEDL et al., 2019; RUSSELL; HUANG; VANDERVEN, 2019).

Em contrapartida, os diversos estímulos utilizados para diferenciar os macrófagos em macrófagos M2 (macrófagos “alternativamente ativados”) promovem variações fenotípicas, as quais geram os subconjuntos M2a (induzido por IL-4 ou IL-13), M2b (induzido por complexos imunes e lipopolissacarídeo), M2c (induzido por IL-10 e TGF- β) ou M2d (induzido por fatores associados ao tumor e IL-6) (ARORA et al., 2018; WANG et al., 2010). Estes subconjuntos majoritariamente controlam a inflamação e respostas tipo Th2, auxiliam na angiogênese, remodelam e reparam tecidos danificados e contribuem na eliminação de detritos e/ou células debrisi (ARORA et al., 2018; PASPARAKIS et al., 2014). Especificamente, o subtipo M2a está envolvido com a proliferação e reparo tecidual, angiogênese e fibrogênese (produção TGF- β e fator de crescimento endotelial vascular). Os macrófagos M2b e M2c contribuem para o remodelamento tecidual, uma vez que produzem IL-10, TGF- β e MMPs (ARORA et al., 2018; KRZYSZCZYK et al., 2018). Além disso, o subconjunto M2c regula negativamente a produção de citocinas inflamatórias e melhora a atividade de eliminação de células debrisi pelos macrófagos M1 (ARORA et al., 2018). Wang et al. (2010) identificou um subtipo adicional, os macrófagos M2d, os quais desempenham um

importante papel no desenvolvimento e progressão do tumor, assumindo características de macrófagos associados ao tumor.

Embora o paradigma M1/M2 tenha ganhado um crescente reconhecimento no campo científico que avalia a funcionalidade dos macrófagos *in vitro*, este espectro dicotômico dificulta o entendimento da plasticidade destas células em um contexto *in vivo*. As descobertas mais recentes argumentam contra uma categorização fenotípica fixa e simples dos macrófagos dentro de um contexto tecidual (GINHOUX et al., 2016; MARTINEZ; GORDON, 2014; NAHRENDORF; SWIRSKI, 2016). Neste sentido, diferenças na origem e localização tecidual destas células, nos estímulos ambientais e no curso tempo-resposta (estágios de inflamação e envelhecimento cutâneo) possibilitam que macrófagos expressem simultaneamente moléculas/marcadores dos fenótipos M1 e M2 [TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidases e MMPs] (MILLS, 2015; NAHRENDORF; SWIRSKI, 2016). Com base neste cenário complexo, abordagens de alta resolução, utilizando análise transcriptômica e epigenética, tornam-se necessárias para estabelecer uma avaliação dos conceitos atuais de classificação fenotípica de macrófagos, frente a condições homeostáticas e patológicas (AHMED; WINTHER; BOSSCHE, 2017; BOSSCHE et al., 2014; CHEN et al., 2020; XUE et al., 2014).

5.1.4 Fibroblastos

Os fibroblastos são as células mais abundantes da derme, as quais apresentam um papel essencial em diversos processos cutâneos, tais como: inflamação, angiogênese, cicatrização de feridas e fotoenvelhecimento (Figura 1) (DI DOMIZIO et al., 2020; KARTHIKEYAN et al., 2016; SAMIVEL et al., 2020). Após uma lesão de pele, os fibroblastos contribuem amplamente para a iniciação e amplificação dos processos inflamatórios, uma vez que expressam receptores de superfície celular da classe PRRs e sintetizam diversas citocinas e quimiocinas inflamatórias, leucotrienos, prostaglandinas, MMPs e fatores de crescimento, além de contribuir no recrutamento e ativação de células inflamatórias ao tecido danificado (COOPER et al., 2021; DI DOMIZIO et al., 2020; HWANG et al., 2011; KENDALL; FEGHALI-BOSTWICK, 2014; NGUYEN; SOULIKA, 2019). Além disso, os fibroblastos também medeiam a deposição de matriz extracelular, que auxilia na formação da “malha de sustentação” para as células inflamatórias infiltradas. Entretanto, assim como os macrófagos, os fibroblastos também apresentam um duplo

fenótipo, neste caso, comportando-se como pró-inflamatório ou pró-fibrótico (COOPER et al., 2021).

Neste sentido, a transformação da linhagem fibroblástica envolve diversas etapas de sinalização, incluindo uma ampla gama de células precursoras, as quais os miofibroblastos atingem o ápice do fenótipo fibrótico (KENDALL; FEGHALI-BOSTWICK, 2014). Os miofibroblastos raramente são encontrados em pele humana saudável, ao passo que, frente a uma lesão, os mesmos são amplamente suprarregulados. Nesse sentido, a ativação e diferenciação dos fibroblastos desempenham um papel central nos processos de cicatrização de feridas. Entretanto, o descontrole desses processos associado à prolongada lesão tecidual e inflamação crônica, levam ao desenvolvimento de uma resposta fibrótica patológica que, em muitos dos casos, culminam com a falência do órgão. Fatores de crescimento, como o TGF- β , são produzidos pelos fibroblastos (efeito autócrino), bem como por outras células da pele, os quais são considerados como o principal indutor da matriz extracelular e diferenciação dos miofibroblastos, sendo, portanto, o mediador chave dos processos fibróticos (KANAOKA et al., 2018; KENDALL; FEGHALI-BOSTWICK, 2014).

Interessantemente, os fibroblastos apresentam uma heterogeneidade funcional na camada dérmica. Os fibroblastos que residem na derme papilar podem regenerar os músculos eretores do pelo e as papilas dérmicas, enquanto que os fibroblastos residentes na camada dérmica profunda (reticular) e fáscia subcutânea podem diferir-se em miofibroblastos, atuando na fase de remodelamento do processo de cicatrização de feridas (DRISKELL et al., 2013; JESCHKE et al., 2020; PHAN et al., 2021; SHOOK et al., 2018). Ainda, um perfil de expressão de genes pró-inflamatórios foi observado em fibroblastos da derme reticular (pele de camundongo e humana), ilustrando uma inclinação inflamatória dos fibroblastos em regiões específicas da camada dérmica (PHILIPPEOS et al., 2018). Além da interação dos fibroblastos com outras células residentes ou infiltrantes da pele, os adipócitos podem liberar adipocinas (leptina e adiponectina), os quais se ligam aos receptores de superfície celular nos fibroblastos (presentes na fáscia subcutânea), atenuando as atividades inflamatórias e fibróticas dessas células (COOPER et al., 2021; MARANGONI et al., 2017).

5.1.5 Células T

Uma efetiva resposta imune requer a geração de células T antígeno específico, que se alojam em locais cutâneos de lesão ou infecção (Figura 1). Por outro lado, a imunidade de longa duração contra futuros desafios imunológicos é mediada pela presença tecidual das células T de memória (HO; KUPPER, 2019). Resumidamente, a ativação imune de células dendríticas dermais (apresentadoras de antígeno) acarreta em sua migração através dos vasos linfáticos aferentes para os linfonodos de drenagem, a fim de ativar e diferenciar células T (naive) ou simplesmente ativar a recirculação das células T de memória central (HO; KUPPER, 2019). Apesar da importância funcional das células imunológicas que circulam entre os nódulos linfáticos da pele e o tecido cutâneo periférico, as células T residentes da pele são estrategicamente posicionadas para a primeira linha de defesa contra ataques futuros de um mesmo antígeno (NESTLE et al., 2009).

Por definição, as células T residentes são aquelas que persistem por longos períodos de tempo em tecidos periféricos não linfoides (HO; KUPPER, 2019). A pele normal pode conter mais de 2×10^{10} células T residentes, as quais representam mais que duas vezes o número total de células T circulantes (PASPARAKIS; HAASE; NESTLE, 2014). As células T residentes da pele humana e de camundongos (epiderme e derme) são células T (tipo $\alpha\beta$) de memória. Elas trafegam para a pele a partir de interações do antígeno linfocitário cutâneo com a E-selectina (superexpressa pelas células endoteliais, durante um estado inflamatório), onde passam a residir na pele por longos períodos (NGUYEN; SOULIKA, 2019). Especificamente na epiderme (camada basal com estreita proximidade com as células de Langerhans), residem principalmente as células T $CD8^+$ de memória. Entretanto, na derme, são encontradas igualmente células T $CD4^+$ e $CD8^+$ de memória, as quais se localizam ao redor das vênulas pós-capilares, logo abaixo da junção dermo-epidérmica ou adjacente aos apêndices cutâneos (MATEJUK, 2018; NESTLE et al., 2009).

Funcionalmente, as células T $CD8^+$ atuam como “células assassinas” devido à liberação de grânulos citotóxicos (perforina e granulosina), enquanto que as células T $CD4^+$ funcionam como “células helper”, auxiliando em ambas as imunidades celular e humoral. Devido ao seu amplo processo de diferenciação, acompanhado da liberação de diferentes grupos de citocinas, as células T $CD4^+$ ainda podem ser subdivididas em: Th1 (respostas associadas à autoimunidade e defesa contra patógenos; voltadas para imunidade celular), Th2 (respostas relacionadas a patologias alérgicas, voltadas para imunidade humoral), Th17 e Th22 (ambos os subconjuntos celulares associados às patologias autoimunes e defesa contra

infecções bacterianas e fúngicas) e T_{reg} (cerca de 10%; suprimem respostas imunes ou previnem respostas autoimunes; um fenômeno conhecido como “memória regulatória”) (AZIZI; YAZDANI; MIRSHAFIEY, 2015; BANGERT; BRUNNER; STINGL, 2011; CLARK, 2010; HEATH; CARBONE, 2013; VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008).

Além disso, é importante destacar a existência de populações de células T precursoras diretas das células T de memória (células T residentes da pele). Entre as células T precursoras estão: as populações de células T recirculante rápida (expressam antígeno linfocitário cutâneo, CCR4, L-selectina e CCR7), identificadas como células T de memória central, e as populações de células T com recirculação mais lenta (expressam CCR7, mas não L-selectina), denominadas como células T de memória migratória (HO; KUPPER, 2019). Nesta perspectiva, as populações de células T residentes da pele são essenciais para atividade imunológica cutânea e, por muitas vezes, tornam-se suficientes para o desenvolvimento de diversas doenças inflamatórias de pele, mesmo na ausência de células T recirculantes (CHEN; SHEN, 2020; MACLEOD et al., 2014; PATRA et al., 2018; TOKURA et al., 2021). Dessa forma, doenças cutâneas mediadas por células T, quando estudadas mecanisticamente, podem resultar no desenvolvimento de novas terapias ou ainda no novo uso de um medicamento pré-existente.

5.2 PELE HUMANA X PELE DE CAMUNDONGO

Modelos de inflamação de pele em camundongos são comumente utilizados na pesquisa dermatológica, uma vez que mimetizam muitos aspectos inflamatórios e imunes observados em diferentes doenças inflamatórias de pele humana (NGUYEN; SOULIKA, 2019). Entretanto, torna-se importante compreender as possíveis diferenças estruturais e imunológicas entre a pele humana e de camundongo, a fim de delinear estudos experimentais mais fidedignos com relação aos mecanismos que determinam a patogênese das doenças inflamatórias de pele humana.

Estruturalmente, a pele de camundongos apresenta uma maior proporção de epitélio folicular, já que o tecido é coberto por uma espessa camada de pelos, que evita a perda de água transepidermal e protege contra infecções (DI MEGLIO; PERERA; NESTLE, 2011; PASPARAKIS; HAASE; NESTLE, 2014). Além disso, a epiderme da pele de camundongos é mais fina comparada à pele humana, o que permite que os processos de renovação celular e cicatrização de feridas ocorram mais rapidamente. Em contrapartida, a epiderme da pele humana contém extensões (sulcos epidérmicos) que se projetam para camada dérmica, o que

não se observa na epiderme de camundongos (DI MEGLIO; PERERA; NESTLE, 2011; NGUYEN; SOULIKA, 2019).

A camada dérmica de camundongos também é considerada mais fina e não apresenta glândulas sudoríparas. Interessantemente, na pele de camundongos observa-se uma camada de tecido muscular (não vista na pele de humanos), conhecida como *panniculus carnosus*. Essa distinta camada possibilita que o processo de cicatrização ocorra por contração, sem o aparecimento de cicatrizes, ao contrário da pele humana, em que a fase de reepitelização de feridas culmina com a formação de cicatriz. Além disso, a camada *panniculus carnosus* promove a separação do dWAT e tecido adiposo subcutâneo de camundongos, o que facilita a demarcação estrutural e funcional destes tecidos (CHEN; ZHANG; GALLO, 2019; DI MEGLIO; PERERA; NESTLE, 2011).

Algumas diferenças imunológicas, baseadas na composição celular, também são observadas entre a pele de camundongos e pele humana. Na pele de camundongos, há populações únicas de células T $\gamma\delta$ na epiderme e derme, ao contrário da pele humana, na qual as células T são majoritariamente do tipo $\alpha\beta$ (HO; KUPPER, 2019; PASPARAKIS; HAASE; NESTLE, 2014). As células T $\gamma\delta$ na epiderme de camundongos, também denominadas de células T epidermais dendríticas, não circulam fora da camada epidérmica e formam uma rede de interação com queratinócitos e células de Langerhans (DI MEGLIO; PERERA; NESTLE, 2011). Consistindo em mais de 90% das células T epidermais, as células T epidermais dendríticas desempenham um papel na cicatrização e no reparo de feridas, atuando na sinalização da imunidade inata. Já as células T $\gamma\delta$ dérmicas são mais diversas em relação ao reconhecimento de antígenos, e são importantes na linha de defesa contra patógenos (HO; KUPPER, 2019; DI MEGLIO; PERERA; NESTLE, 2011). Ademais, poucas populações de células T $\alpha\beta$ também são encontradas na derme de camundongos, as quais exercem, neste caso, função de células T_{reg} (SCHARSCHMIDT et al., 2015).

5.3. RESPOSTA INFLAMATÓRIA

O processo inflamatório é oriundo de uma resposta imune protetora do organismo frente a um dano tecidual, invasão por patógenos (fungos, bactérias ou vírus), células danificadas e/ou seus produtos resultantes (DAMPs), toxinas, estresse e radiação (ANSAR; GHOSH, 2016; CHEN et al., 2018). Há dois mil anos atrás, Celsius definiu a inflamação como um conjunto de quatro sinais cardinais: *rubor* (vermelhidão, devido à hiperemia), *tumor* (edema, devido ao aumento da permeabilidade vascular e extravasamento plasmático para o

espaço intersticial), *calor* (associado à vasodilatação e atividade metabólica celular) e *dolor* (dor, sensibilização das fibras nervosas aferentes primárias pelos mediadores inflamatórios). Na década de 1850, o quinto sinal cardinal da inflamação, *functio laesa* (perda de função), foi revelado por Rudolf Virchow (ANSAR; GHOSH, 2016; CHIU; VON HEHN; WOOLF, 2012).

Geralmente, uma resposta inflamatória aguda envolve uma sequência coordenada de eventos celulares e moleculares (imunidade inata e adaptativa), a fim de eliminar a causa inicial de dano, eliminando células necróticas e restaurando a homeostasia tecidual (NETEA et al., 2017; PONNALAGU; SINGH, 2020). Em casos de infecção, a resposta inflamatória, quando benéfica, elimina o agente patogênico (fagocitose) e instala uma imunidade de memória, de modo que o hospedeiro monte uma resposta efetora mais rápida e específica a uma reinfecção (FULLERTON; GILROY, 2016). Entretanto, se a resposta aguda inicial ocorre de maneira desregulada e/ou ineficiente associado à falha nos processos resolutivos, a inflamação transcorre-se a estados crônicos, os quais estão intimamente relacionados com a patofisiologia de diversas doenças, incluindo as doenças inflamatórias de pele (LEE et al., 2018; SUGIMOTO et al., 2019; XU et al., 2020).

Embora o processo inflamatório dependa da causa inicial e de sua localização no organismo, a inflamação, em geral, compartilha mecanismos comuns, tais como: reconhecimento de estímulos prejudiciais (pelos PRRs), ativação de vias transcricionais inflamatórias, liberação de mediadores inflamatórios e recrutamento de células inflamatórias (CHEN et al., 2018). A inflamação aguda é iniciada pela ativação de células residentes/imunidade inata, tais como, células dendríticas, macrófagos, mastócitos e células epiteliais (queratinócitos), a partir do reconhecimento de PAMPs e outros fatores de virulência (indutor microbiano) ou DAMPs (indutor não microbiano; provenientes de células ou organelas danificadas), além de outros indutores exógenos (compostos tóxicos, alérgenos, irritantes, etc) (GONG et al., 2020; MEDZHITOV, 2008). Interessantemente, a mitocôndria também contribui na mediação do estado inflamatório, uma vez que também liberam DAMPs mitocondriais (alarminas mitocondriais) frente à estímulos nocivos, além de facilitar o “inflammaging”, um processo que acelera o envelhecimento tecidual via mudanças no estado redox das células. Evidências indicam que a liberação excessiva de DAMPs mitocondriais está relacionada com a severidade e prognóstico de diversas condições inflamatórias (GRAZIOLI; PUGIN, 2018; PONNALAGU; SINGH, 2020). Neste sentido, a remoção de mitocôndrias danificadas poderia ser uma estratégia terapêutica interessante, a fim de aliviar estados de doença inflamatória (PONNALAGU; SINGH, 2020).

Em geral, as moléculas indutoras iniciam o processo inflamatório por ativar sensores especializados presentes em células imunes e não imunes como os receptores da superfície celular da classe PRRs. Dentre estes, estão os receptores Toll-like, os quais são os mais conhecidos e estudados nos processos de ativação da resposta inflamatória (CHEN et al., 2018; JIAN et al., 2020; ROY et al., 2016). Após um estímulo primário e consequente ativação dos PRRs, diversas vias de sinalização inflamatória são acionadas, como as MAPKs e fatores de transcrição (proteína ativadora-1, NF- κ B e fator regulador de interferon 3), culminando na produção de uma ampla gama de mediadores inflamatórios (ARIZZA et al., 2020; FISCHETTI et al., 2018; ROY et al., 2016). Em suma, os mediadores inflamatórios regulam as respostas inflamatórias efetoras e são classificados em seis categorias, de acordo com suas propriedades bioquímicas: aminas e peptídeos vasoativos, fragmentos do sistema complemento, mediadores lipídicos, citocinas, quimiocinas e enzimas proteolíticas (elastina, catepsinas, mieloperoxidase, defensinas e metaloproteinases de matrix) (MEDZHITOV, 2008; NISSINEN; KÄHÄRI, 2014; WILGUS; ROY; McDANIEL, 2013; YAO; NARUMIYA, 2019). A maioria dos mediadores apresentam efeitos parácrinos e autócrinos que levam não somente a ativação de células residentes do tecido lesado, mas também a produção e liberação de subsequentes mediadores inflamatórios por essas células (MEDZHITOV, 2008; NETEA et al., 2017).

Neste sentido, a liberação de mediadores inflamatórios pelas células residentes do tecido danificado, ativam as células endoteliais da microvasculatura local (VESTWEBER, 2015). Sequencialmente, uma cascata de eventos inflamatórios é acionada, resultando no aumento do fluxo sanguíneo local, no extravasamento de fluido rico em proteínas plasmáticas, com consequente formação de edema e transmigração sequencial e direcional de leucócitos (células inflamatórias efetoras) para o meio circundante do tecido lesado (ANSAR; GHOSH, 2016; NETEA et al., 2017). As células endoteliais estimuladas na fase inicial da resposta inflamatória passam a expressar diversas substâncias (selectinas, moléculas de adesão, quimiocinas, citocinas, e entre outros quimioatraentes), as quais permitem os leucócitos reconhecer o endotélio vascular do tecido inflamado e interagir com a parede vascular, através de uma série de etapas: captura, rolamento, adesão, rastejamento (“crawling”) para os locais de saída e transmigração (diapedese); culminando com a passagem destas células para o tecido inflamado circundante (WETTSCHURECK; STRILIC; OFFERMANN, 2019). As selectinas (P-selectina e E-selectina), expressas na superfície das células endoteliais de tecidos inflamados, medeiam a captura dos leucócitos durante o fluxo sanguíneo aumentado e a ancoragem (de baixa afinidade) dessas células à superfície das células endoteliais. Essa

interação transitória ativa, consecutivamente, o rolamento destas células inflamatórias sobre a parede vascular (MAAS; SOEHNLEIN; VIOLA, 2018; VESTWEBER, 2015).

A redução da velocidade de rolamento dos leucócitos sobre a parede vascular diminui à medida que ocorre a ativação de integrinas leucocitárias (antígeno associado à função linfocitária 1, antígeno muito tardio 4 e antígeno de macrófago 1), as quais interagem com moléculas de adesão intercelular e perivascular da superfície das células endoteliais. Esta interação de alta afinidade permite o fortalecimento da adesão celular à parede do vaso, seguido de rastejamento dos leucócitos sobre a superfície luminal dos vasos sanguíneos (MITROULIS et al., 2015; VESTWEBER, 2015). Estes comportamentos interativos leucócito-célula endotelial preparam o leucócito para atingir sítios específicos para o processo de transmigração. Os leucócitos levam até 15-20 minutos para superar a membrana basal endotelial, levando um acúmulo transitório de leucócitos entre as células endoteliais e a membrana basal (VESTWEBER, 2015). O processo de saída do leucócito do vaso sanguíneo para o tecido circundante ocorre majoritariamente de forma paracelular e, diversas proteínas/receptores da superfície das células endoteliais e dos leucócitos modulam esse processo, incluindo moléculas de adesão intercelular, moléculas de adesão intercelular, molécula de adesão celular endotelial e plaquetária e caderina endotelial vascular (MULLER, 2016).

O recrutamento de leucócitos ao tecido é a base para os processos de iniciação e amplificação de qualquer resposta inflamatória. Neste sentido, a supressão da atividade destas células torna-se importante estratégia no desenvolvimento de novas terapias para doenças inflamatórias, incluindo àquelas desencadeadas no tecido cutâneo (CAMPONOOGARA et al., 2019a, 2019b, 2020; SILVESTRE-ROIG et al., 2019). Dentre os leucócitos polimorfonucleares, os neutrófilos desempenham uma função essencial durante a inflamação aguda, uma vez que são as primeiras células recrutadas ao sítio inflamatório (KOLACKOWSKA; KUBES, 2013). São poderosas células efetoras que medeiam a lesão tecidual através de fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios, proteases, e outros fatores contidos nos grânulos citoplasmáticos (degranulação) e pela geração de EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (OLIVEIRA; ROSOWSKI; HUTTENLOCHER, 2016). Em casos de infecção, os neutrófilos medeiam à fagocitose e morte do patógeno, usando sistemas enzimáticos, como NADPH oxidase e mieloperoxidase, bem como proteínas antimicrobianas (catepsinas, defensinas, lactoferrinas e lisozimas) (KOLACKOWSKA; KUBES, 2013; METZEMAEKERS; GOUWY; PROOST, 2020).

Vale destacar também que as EROs e ERNs, produzidas pelos neutrófilos, participam ativamente da progressão de muitas doenças inflamatórias (BISWAS; DAS; BANERJEE, 2017; CAMPONOVARA et al., 2020; KUMAR et al., 2010; PEGORARO et al., 2017; PÉREZ-FIGUEROA et al., 2021). Como sistema central que interliga o estresse oxidativo/nitrosativo aos processos inflamatórios, estão as NADPH oxidases (presentes na membrana celular de neutrófilos), as quais são responsáveis pela maior fonte de produção de espécies reativas em células com atividade fagocítica (redução do oxigênio molecular em ânion superóxido), processo conhecido como explosão respiratória (MITTAL et al., 2014). Além disso, a enzima mieloperoxidase desempenha um importante papel não somente na morte de patógenos, mas também no dano tecidual e inflamação (ARATANI, 2018). Sua ação enzimática é dependente da formação de EROs, já que seu principal produto, o ácido hipocloroso (potente microbiocida), é gerado a partir da disponibilidade de peróxido de hidrogênio (gerado sob ação da superóxido dismutase) e íons cloreto presentes no meio (KLEBANOFF et al., 2013). Como principal conteúdo presente nos grânulos azurófilos de neutrófilos, a mieloperoxidase é considerada um dos principais marcadores de infiltração neutrófila ao tecido inflamado (CAMPONOVARA et al., 2019a, 2019b, 2019c). Em contrapartida, a mieloperoxidase é encontrada em menor extensão em monócitos, constituindo cerca de 1% do total de proteína celular (ODOBASIC; KITCHING; HOLDSWORTH, 2016).

Sucessivamente à infiltração de neutrófilos ao tecido lesado, os macrófagos infiltrantes (resultantes do processo de diferenciação de monócitos) também contribuem para o processo inflamatório, uma vez que controlam a ativação e o acúmulo subsequente de neutrófilos. A infiltração e ativação de macrófagos podem ocorrer inicialmente em resposta a algum dano tecidual (DAMPs) e/ou ativação continuada de células residentes (imunes e não imunes) do tecido, como também pelos mediadores inflamatórios (citocinas e quimiocinas) liberados pelos neutrófilos já existentes no sítio inflamatório (KUMAR; NICHOLLS; WONG, 2018; OLIVEIRA; ROSOWSKI; HUTTENLOCHER, 2016).

Quando a inflamação aguda torna-se bem sucedida, é crucial prevenir o excesso de dano tecidual e a cronicidade da resposta inflamatória. A resolução da inflamação é definida como o período entre o pico de leucócitos infiltrados ao tecido lesado e o completo “clearance” das células inflamatórias recrutadas (FULLERTON et al., 2016; SUGIMOTO et al., 2019). O processo resolutivo da inflamação é estritamente regulado, sendo dividido em duas fases: anti-inflamatória e pró-resolvinas (KOLACKOWSKA; KUBES, 2013). Na fase anti-inflamatória, o agente causador do dano tecidual é eliminado. Subsequentemente, a síntese de mediadores pró-inflamatórios e pró-apoptóticos é suspensa [regulação negativa de

fatores transcricionais (NF- κ B) e proteínas quinases (MAPKs)], à medida que mediadores anti-inflamatórios (IL-10 e TGF- β), bem como o antagonista do receptor para IL-1 (IL-1Ra) passam a ser expressos (FULLERTON et al., 2016; KOLACKOWSKA; KUBES, 2013). A modulação destas respostas pode também ser iniciada pelos glicocorticoides produzidos endogenamente, os quais promovem a realocação da anexina 1 à superfície celular, regulando assim a resposta inflamatória (VAGO et al., 2012). Todas estas ações resultam na eliminação das células inflamatórias (neutrófilos) no sítio inflamatório, através da migração reversa dos neutrófilos, morte celular (apoptose mediada por caspase) e drenagem linfática das células fagocíticas (macrófagos) (SUGIMOTO et al., 2019).

Mais de 70% dos neutrófilos infiltrados no tecido inflamado retornam à circulação sanguínea, a partir de um processo conhecido como migração reversa de neutrófilos. Neste processo, alguns marcadores expressos na superfície de neutrófilos (alta expressão de ICAM e baixa expressão de receptores para quimiocinas), além de altas concentrações no local inflamatório da quimiocina CXCL8 (neste caso funcionam como quimiorepelentes), permitem que estas células inflamatórias retornem à circulação sanguínea local (OLIVEIRA; ROSOWSKI; HUTTENLOCHER, 2016). Entretanto, uma parcela de neutrófilos sofre apoptose no tecido lesado, e liberam, conseqüentemente, sinais que atraem os monócitos para o local inflamatório. Os monócitos recrutados se diferenciam em macrófagos e fagocitam (processo de eferocitose) os neutrófilos apoptóticos e outras células danificadas do tecido (KOLACKOWSKA; KUBES, 2013; WATANABE et al., 2019). Uma vez que a atividade fagocítica dos macrófagos é completada, essas células são depuradas pelo sistema linfático, promovendo a cura e reparo tecidual (FULLERTON et al., 2016; PARK; LANGMEAD; RIDDY, 2020).

Em paralelo à fase anti-inflamatória, a fase pró-resolvinas também é crucial para o processo resolutivo da inflamação. Dentre horas ou dias após o início da inflamação, as células inflamatórias passam a expressar mediadores lipídicos pró-resolução, como lipoxinas, resolvinas e protectinas (produzidas por neutrófilos e macrófagos) e maresinas (produzidas por macrófagos) (KOLACKOWSKA; KUBES, 2013; WATANABE et al., 2019). Esses mediadores lipídicos contribuem para diversos aspectos da resolução da inflamação, tais como: regulação negativa da produção de mediadores pró-inflamatórios, limitação da infiltração neutrofílica, indução da migração reversa e apoptose de neutrófilos, eferocitose por macrófagos, estimulação da drenagem linfática de macrófagos fagocíticos e repopulação celular no tecido (homeostase adaptativa) (OLIVEIRA; ROSOWSKI; HUTTENLOCHER, 2016; SUGIMOTO et al., 2019). Nesse sentido, recentes estudos pré-clínicos têm indicado o

uso de mediadores lipídicos pró-resolução como estratégias terapêuticas contra diversas doenças, incluindo doenças inflamatórias de pele (CEZAR et al., 2019; MARTINEZ et al., 2020; SAITO et al., 2018; SULCINER et al., 2018).

Entretanto, caso ocorra falhas na resolução da resposta inflamatória aguda, a resposta imune adaptativa (homeostase adaptativa) e reparo tecidual não serão estabelecidos, levando à cronificação dos processos inflamatórios (fibrose tecidual e perda de função do órgão) (FULLERTON et al., 2016; SERHAN, 2014). Morfologicamente, a inflamação crônica é caracterizada pela presença por longos períodos de neutrófilos, linfócitos e macrófagos no tecido (SUGIMOTO et al., 2019). Muitas doenças inflamatórias crônicas decorrem-se da amplificação da inflamação aguda associada às tentativas frustradas de desenvolver uma imunidade adaptativa (FULLERTON et al., 2016; FURMAN et al., 2019).

5.4 PATOFISIOLOGIA DA QUEIMADURA DE PELE INDUZIDA PELA RADIAÇÃO UVB

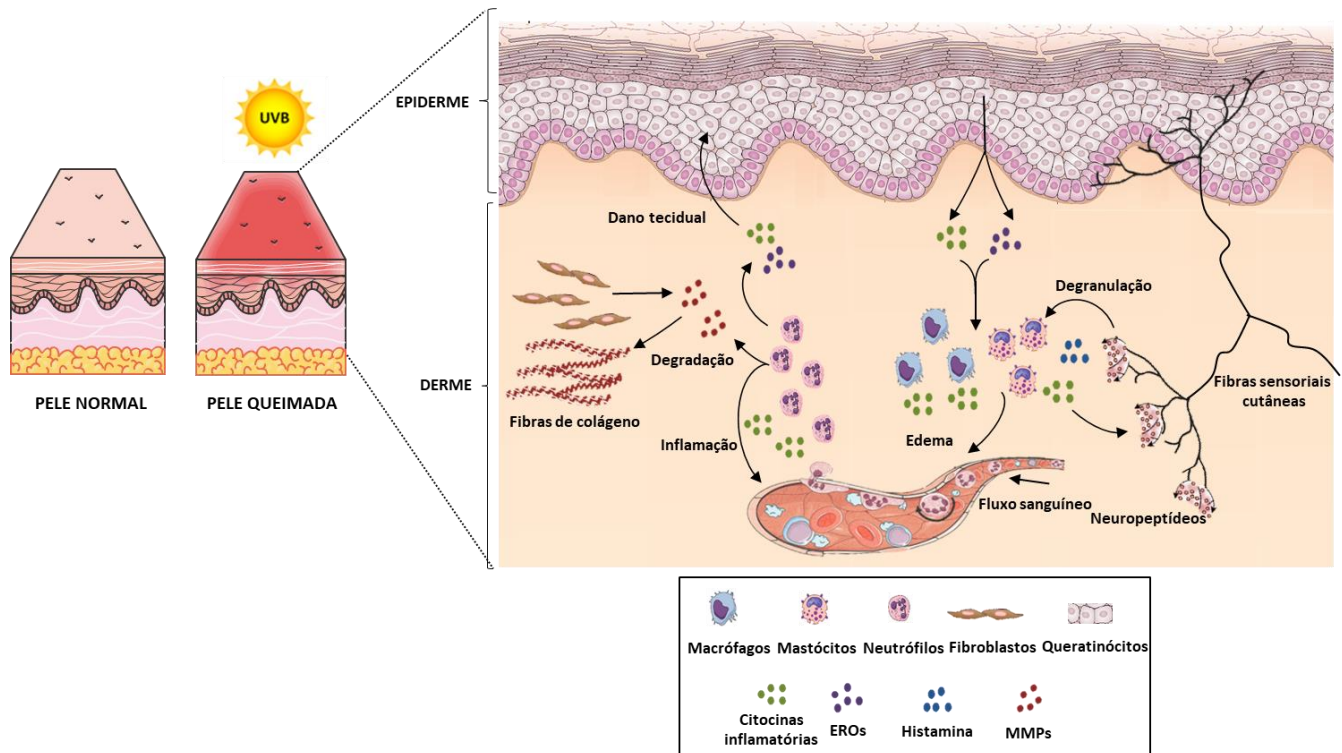
O sol emite três principais tipos de raios UV: UVA (320–400 nm), UVB (280–320 nm), and UVC (200–280 nm). Embora a radiação UVB (penetra na camada epidérmica da pele) represente somente 5% dos raios UV que atinge a superfície terrestre, esta é 1000 vezes mais danosa e genotóxica do que a radiação UVA (penetra nas camadas epidérmicas e dérmicas da pele), o que se deve principalmente ao seu alto nível energético, o qual é inversamente proporcional ao comprimento de onda (PEREZ-SANCHEZ et al., 2016; MARTINEZ et al., 2020). A exposição excessiva à radiação UV proveniente do sol é considerada um problema de saúde pública, cujo efeito mais comum observado é a queimadura de pele, causada particularmente pela radiação UVB (WHO, 2003; LOPES; MCMAHON, 2016). Nos Estados Unidos, a prevalência estimada de queimadura associada à exposição solar é alta, com cerca de 57% dos adultos jovens reportando um ou mais episódios de queimadura dentro de um período de 12 meses (KANN et al., 2018). O Brasil está localizado em uma região geográfica que recebe irradiação solar intensa durante todo o ano (OLIVEIRA, 2014). Especialmente na cidade de Santa Maria (região sul do Brasil; maiores índices de melanoma do país), 92,2% dos estudantes universitários reportaram pelo menos um episódio de queimadura solar durante a vida (DALLAZEM et al., 2019).

Clinicamente, a gravidade do dano cutâneo após a exposição à radiação UV varia conforme a proporção e profundidade de pele queimada, podendo ser categorizada em queimaduras de primeiro grau, segundo grau e terceiro grau. As queimaduras de primeiro grau

(superficiais) não requerem atenção médica, pois não resultam na formação de sintomas clínicos, e seus efeitos são reversíveis em torno de 1 a 2 dias. Já as queimaduras de segundo grau (afetam a epiderme e derme) acarretam na formação de bolhas e necessitam de tratamento médico para promover a cicatrização da região queimada (SÁNCHEZ-PÉREZ et al., 2019). Jeschke et al. (2020) subdividiu as lesões de queimadura de segundo grau em superficial de espessura parcial (anteriormente conhecida como queimaduras 2A) e profunda de espessura parcial (ou queimaduras 2B). O primeiro subtipo é caracterizado pela percepção de dor (dor neuropática) na região queimada, interferindo na capacidade de trabalho e qualidade de vida do paciente. Entretanto, esse subtipo de queimadura não necessita de intervenção cirúrgica (somente terapêutica) (TAVERNER; PRINCE, 2016). Em contrapartida, o segundo subtipo de queimadura é menos doloroso, devido à destruição das terminações nervosas livres cutâneas, e requer cirurgia (formação de cicatriz). Já as queimaduras de terceiro grau afetam todas as camadas da pele e, assim como as queimaduras 2A, são menos dolorosas. Ademais, as queimaduras de terceiro grau acarretam em carbonização da pele ou pele com aspecto branco translúcido, podendo apresentar vasos coagulados e visíveis sobre a superfície da pele. Devido à destruição do tecido, a cura das lesões ocorre lentamente, além de serem mais vulneráveis à infecção (SÁNCHEZ-PÉREZ et al., 2019; JESCHKE et al., 2020).

A queimadura de pele induzida pela radiação UVB é resultante da iniciação de respostas associadas ao estresse oxidativo, inflamação, proliferação e apoptose (BAEK et al., 2017; CEZAR et al., 2019; CAMPONOGARA et al., 2020) (Figura 2). A ativação de células da pele (queratinócitos, células de Langerhans e fibroblastos) e células imunes residentes/infiltrantes (células T, macrófagos e neutrófilos) compõem, de modo geral, os elementos celulares envolvidos nos processos patofisiológicos observados nesta condição cutânea (LU; WU, 2013; MACLEOD et al., 2014; PEGORARO et al., 2017; BERNARD; GALLO; KRUTMANN, 2019; YIN et al., 2019). A intercomunicação entre os elementos celulares de diferentes camadas da pele, através da ativação de vias de sinalização e liberação de mediadores inflamatórios, resulta no desenvolvimento de reações adversas à pele queimada, tais como: eritema, edema (vasodilatação), hiperplasia, dor e, em alguns casos, culmina em fotoenvelhecimento, imunossupressão e fotocarcinogênese (GUSTORFF et al., 2013; DIVYA et al., 2016; BERNARD; GALLO; KRUTMANN, 2019; KREMER et al., 2019; FIALHO et al., 2020). Além disso, uma exposição repetida à radiação UVB também pode acarretar em danos oculares (fotoconjutivite e catarata) (WHO, 2003; BAIS et al., 2018).

Figura 2 – Patofisiologia da queimadura de pele induzida pela radiação UVB. (EROs – Espécies reativas de oxigênio; MMPs – Metaloproteinases).



Fonte: Adaptado de Bernard; Gallo; Krutmann, 2019; Lopes e McMahon, 2016; Magcwebeba et al., 2016; Samivel et al., 2020.

A exposição excessiva à radiação UVB leva a produção aumentada de EROs (radicais hidroxila, ânion superóxido, oxigênio singlete e peróxido de hidrogênio) (SAMIVEL et al., 2020). A radiação UVB pode ser absorvida por cromóforos mitocondriais (DNA, RNA, aminoácidos aromáticos, e outros) das células da pele, originando moléculas em estado excitado (altamente instável). Devido a sua instabilidade, essas retornam para o seu estado fundamental (repouso), transferindo a energia (elétrons) às substâncias químicas intracelulares adjacentes, como o oxigênio molecular, levando, portanto, a formação das EROs (BAEK et al., 2017). Além disso, Anderson et al. (2014), demonstrou que as células da pele em resposta a radiação UV produzem ânion superóxido devido ao vazamento de elétrons da cadeia transportadora de elétrons, especialmente do complexo II (succinato-ubiquinona oxidoreductase), uma vez que este apresenta uma importante influência na produção de EROs na pele, quando comparado a de outros tecidos (fígado). Nesta perspectiva, a excessiva geração de EROs frente a exposição à radiação UVB não consegue ser compensada pelos sistemas de defesa antioxidantes da pele (catalase, superóxido dismutase, glutatona

peroxidase e glutatona reduzida), levando ao estresse oxidativo epidermal e, conseqüente fotodano cutâneo (SAMIVEL et al., 2020).

O fotodano induzido pelo estresse oxidativo é decorrente de alterações celulares no tecido cutâneo, uma vez que as EROs interagem com diversas macromoléculas, incluindo lipídios de membrana, gerando produtos reativos derivados do processo de peroxidação lipídica (malondialdeído e 4-hidroxi-nonenal) (GEGOTEK et al., 2017; PEGORARO et al., 2017; SAMIVEL et al., 2020). Uma importante consequência desse fenômeno é o transporte alterado de partículas causado pela perturbação da membrana lipídica celular (DOBRZYNSKA et al., 2018). O dano oxidativo induzido pela radiação UVB também causa lesão ao DNA celular, podendo ser mensurado pela formação do marcador 8-oxo-7,8-dihidro-2-desoxiguanosina (produto resultante da oxidação das bases nitrogenadas de guanina) (SAMIVEL et al., 2020). Além disso, o aumento das EROs induzido pela radiação UVB também acarreta danos em organelas específicas das células cutâneas. Nesse sentido, as mitocôndrias, além de serem as principais contribuintes para a instalação do processo de estresse oxidativo, também são altamente sensíveis e danificadas pelas EROs ali produzidas. Baek et al. (2017) demonstrou que o peróxido de hidrogênio mitocondrial produzido após a exposição à radiação UVB é um importante fator contribuinte para a liberação de produtos iniciadores da apoptose celular intrínseca. Os queratinócitos apoptóticos normalmente aparecem em posição suprabasal epidérmica, atingindo um pico máximo em 24 horas após a irradiação UVB (HATAKEYAMA et al., 2017).

Outros estudos também corroboram com Baek et al. (2017) e ainda demonstram que o estresse oxidativo e a apoptose associada ao dano mitocondrial modulam o processo inflamatório e a progressão dos processos de cicatrização de feridas após uma queimadura de pele, incluindo aquelas induzidas pela radiação UVB (FANG et al., 2017; CHEN, F. et al., 2019). Além disso, o desequilíbrio redox mediado pela radiação UVB também estimula a produção de MMPs pelos queratinócitos, fibroblastos e neutrófilos, culminando na degradação de fibras de colágeno e elastina e, no conseqüente fotoenvelhecimento cutâneo (CHO et al., 2017; KUMAR; MANDAL, 2019). Baseado nisso, as EROs funcionam como importantes moduladores dos demais processos patofisiológicos observados na queimadura de pele induzida pela radiação UVB, muito devido a sua capacidade de ativar cascatas de sinalização (MAPKs, NF- κ B e AP-1) envolvidas na inflamação, proliferação/diferenciação celular e fotoenvelhecimento (LI X-Q et al., 2018; MUZAFFER et al., 2019; WU et al., 2019; MARTINEZ et al., 2020).

Os processos inflamatórios/immunes associados à queimadura de pele induzida pela radiação UVB tem um engajamento de diversos tipos celulares, mediadores inflamatórios (citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, óxido nítrico) e enzimas inflamatórias (ciclooxigenases e mieloperoxidase) (RHODES et al., 2001; PAL et al., 2015; CHO et al., 2017; HATAKEYAMA et al., 2017; TANG, S-C. et al., 2017; CAMPONOOGARA et al., 2020; HWANG et al., 2020; SAMIVEL et al., 2020). Os queratinócitos atuam como fortes iniciadores e amplificadores da inflamação induzida pela radiação UVB (MAGCWEBEBA et al., 2016). A exposição da pele à radiação UVB estimula os queratinócitos a liberarem citocinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, MCP-1, TNF- α) e quimiocinas (CCL-20, CXCL-1, and CXCL-2) inflamatórias, levando a ativação de outras células residentes da pele (KIM et al., 2009; CRISPIN et al., 2013; MAGCWEBEBA et al., 2016; TANG, S-C. et al., 2017; LI, X-Q et al., 2018; YAMASAKI et al., 2018; CEZAR et al., 2019). Essa intensa comunicação entre as células de diferentes camadas da pele culmina na promoção de alterações vasculares, seguida de eritema, edema e infiltração de células inflamatórias (neutrófilos, macrófagos e células T) ao tecido cutâneo (DI NUZZO et al., 1998; GLEDHILL et al., 2010; PEGORARO et al., 2017; HAWKSHAW et al., 2020).

Vale ressaltar que uma exposição prolongada ou em alta dose de radiação UVB pode induzir não somente processos inflamatórios persistentes, como também alterações na homeostasia da barreira cutânea associado aos processos de proliferação e diferenciação de queratinócitos (CHO et al., 2017; CAMPONOOGARA et al., 2020). Existe uma forte correlação entre as alterações na membrana lipídica e a hiperplasia epidermal após irradiação UVB (TAKAGI et al., 2005; PERMATASARI; ZHOU; LUO, 2013) e, estas alterações na barreira epidermal estariam amplamente associadas com mudanças no padrão de distribuição do cálcio epidermal (JIANG et al., 2007; DOBRZYNSKA et al., 2018). Aliado a este fato, um estudo revelou que a radiação UVB aumenta a expressão de um canal iônico seletivo ao cálcio e, o consequente influxo desse cátion resulta na indução da proliferação de queratinócitos e supressão da diferenciação terminal dessas células (LEE; LEE, 2018). Em contrapartida, Tripp e colaboradores (2003) demonstraram que os queratinócitos basais expressam ciclooxigenases, e que a produção de prostaglandinas após a irradiação UVB poderia “proteger” as células epidermais da apoptose, promovendo um efeito hiperplásico transitório. Esse achado pode ser corroborado com o estudo de Rodríguez-Luna et al. (2018), que demonstra que a hiperplasia epidermal observada na queimadura de pele induzida pela radiação UVB, bem como em outras doenças inflamatórias de pele (psoríase) pode ser mediada pela superexpressão da COX-2 epidermal.

Embora os aspectos moleculares envolvidos na comunicação entre as células (residentes e infiltrantes) na pele forneçam as bases teóricas da patofisiologia da queimadura de pele induzida pela radiação UVB, os sistemas neuronais também podem contribuir para a indução e manutenção dos processos patofisiológicos dessa condição cutânea, visto que a radiação UV pode interagir direta ou indiretamente com a densa rede tridimensional de fibras nervosas sensoriais localizadas na epiderme e derme (LEGAT, 2018). Vários estudos mostraram que a radiação UVB pode sensibilizar as fibras nervosas que inervam a pele (GUSTORFF et al., 2013; LOPES; MCMAHON, 2016; FIALHO et al., 2020). Ainda, Legat et al. (2004) revelou que a exposição repetida à radiação UVB aumenta o número de fibras nervosas sensoriais intraepidérmicas imunorreativas para o CGRP.

5.5 INTERAÇÕES NEUROIMUNE NA PELE

A pele atua como uma interface física e imunológica, formando uma rede protetora complexa contra insultos externos químicos, físicos e microbiológicos. Esta rede de proteção compreende tanto células imunes (residentes ou não da pele), quanto células neuronais, as quais estão colocalizadas no tecido, formando um circuito local que controla a defesa e homeostasia tecidual (COHEN; WU; KAPLAN, 2020; LOWY et al., 2021). Enquanto que o sistema imune opera em uma escala de tempo de horas a dias, o sistema nervoso é capaz de transmitir informações em escala de milissegundos, sendo responsável pela “resposta primária” frente à detecção e transdução do estímulo externo nocivo (CHOI; NARDO, 2018; CHU; ARTIS; CHIU, 2020).

A pele é altamente inervada por fibras nervosas autonômicas e sensoriais, as quais estão densamente distribuídas por todas as camadas da pele. As fibras nervosas sensoriais cutâneas são classificadas em fibras A β e A δ e C, que baseados no seu diâmetro, mielinização e velocidade de condução do estímulo, podem responder e transmitir diferentes tipos de informação sensorial (BASBAUM et al., 2009). Interessantemente, as fibras nervosas sensoriais ainda podem ser distinguidas com base em seus terminais distais dentro da pele. As fibras A β geralmente terminam dentro da derme, associando-se a estruturas, como folículos pilosos e células/estruturas nervosas especializadas (células de Merkel, terminações de Ruffini e corpúsculo de Pacini). As fibras A δ terminam dentro epiderme (terminações nervosas livres) ou na derme (terminações circunferenciais). Já as fibras C inervam a epiderme, na forma de terminações nervosas livres e em contato íntimo com os queratinócitos (LOWY et al., 2021; TALAGAS et al., 2020).

Molecularmente, as fibras C podem ser classificadas em fibras C peptidérgicas e fibras não peptidérgicas. As fibras C peptidérgicas são aquelas que liberam neuropeptídios (SP, CGRP) e expressam o receptor de tirosina quinase de alta afinidade, que responde ao fator de crescimento do nervo. Já as fibras C não peptidérgicas expressam o receptor de neurotrofina c-Ret que é alvo do fator neurotrófico derivado da glia; uma grande parcela da população c-Ret-positiva também se liga à isolectina IB4 e expressa receptores acoplados à proteína G da família Mrg, e subtipos específicos de receptores purinérgicos (P2X₃) (BASBAUM et al., 2009; COHEN; WU; KAPLAN, 2020). Entretanto, a maioria dos estudos referentes às interações neuroimunes tem focado nas fibras C peptidérgicas, devido sua habilidade em se comunicar com o sistema imune através da liberação de neuropeptídios (COHEN; WU; KAPLAN, 2020).

Em geral, o sistema imune se comunica com as células neuronais via mediadores inflamatórios (citocinas, quimiocinas, histamina, prostaglandinas, entre outros), enquanto que o sistema neuronal, após sua sensibilização/ativação, secreta neuropeptídeos, os quais coordenam as respostas imunes locais (COHEN; WU; KAPLAN, 2020). Essas interações neuroimunes têm sido descritas em diversas condições inflamatórias de pele, incluindo aquelas induzidas pela radiação UVB (CAMPONOVARA et al., 2020, 2021; CHOI; NARDO, 2018; KODJI et al., 2019).

Historicamente, o termo “neurodermatite” já definia a forte interação entre as fibras nervosas e a pele no desenvolvimento de doenças inflamatórias cutâneas. Em 1876, Stricker denominou essa interação como vasodilatação neurogênica, uma vez que o fluxo sanguíneo cutâneo era aumentado em áreas inervadas (SOUSA-VALENTE; BRAIN, 2018). Enquanto isso, Sherrington (1893) demonstrou a interiorização de fibras nervosas aferentes em regiões cutâneas, definindo-as como “sensory spinal skin-field”, a fim de diferenciá-las das fibras nervosas motoras. A partir dos anos de 1901, diversos estudos foram realizados, levando ao conceito de inflamação neurogênica, a qual é descrita como uma reação inflamatória (vasodilatação e extravasamento de exsudato/edema) desencadeada pela liberação de neuropeptídios (SP e CGRP), a partir de terminações nervosas livres provenientes de neurônios aferentes primários (nociceptores) (CHIU; VON HEHN; WOOLF, 2012; CHOI; NARDO, 2018; JANCÓS; JANCÓS-GÁBOR; SZOLCSÁNYI, 1967).

A SP e o CGRP são neuropeptídios clássicos liberados majoritariamente pelas fibras C peptidérgicas, os quais medeiam diretamente (via receptores expressos em células endoteliais) e indiretamente (via produtos liberados da degranulação mastocitária) efeitos vasculares (ADELSON et al., 2009; CHIU; VON HEHN; WOOLF, 2012; MEHTA; GRAINSTEN,

2018). Atuando sobre as células endoteliais, a SP promove extravasamento plasmático nas vênulas pós-capilares através da ativação de receptores de neurocinina 1, enquanto que o CGRP medeia a dilatação arteriolar através da ativação de receptor heteromérico (composto pelo receptor do tipo calcitonina e por uma proteína modificadora da atividade do receptor 1) (EGEA; DICKERSON, 2012; GEPPETTI et al., 2015). Esses neuropeptídeos também regulam indiretamente o fluxo sanguíneo e a permeabilidade vascular, uma vez que estimulam a degranulação mastocitária, por meio da ativação dos receptores de neurocinina 1 e membro B2 do receptor acoplado a proteína G relacionado ao Mas (no caso da SP) e do receptor de CGRP, expressos em mastócitos (KULKA et al., 2008; PETERS et al., 2006). Além dos eventos vasculares, ambos neuropeptídeos também medeiam a quimiotaxia, proliferação e ativação de células inflamatórias/imunes (CHOI; NARDO, 2018; MEHTA; GRAINSTEN, 2018). Sun, Ramnath e Bhatia (2007) demonstraram que a SP, liberada a partir de fibras nervosas sensoriais, aumentou as respostas quimiotáticas de neutrófilos primários à proteína inflamatória de macrófago (MIP)-2. Além disso, ambos SP e CGRP também modulam as respostas imunes celulares, aumentando a atividade das células de Langerhans e a proliferação de células T CD4⁺ (CHOI; NARDO, 2018; PETERS et al., 2012).

Especificamente, a inflamação neurogênica cutânea pode ser iniciada através da ativação de receptores presentes nas terminações nervosas sensoriais após lesões cutâneas ocasionadas por estímulos exógenos, como calor, frio, radiação ultravioleta, agentes irritantes e alérgenos, bem como estímulos endógenos (mudanças osmóticas ou de pH na pele) (GOUIN et al., 2017). Os neuropeptídeos liberados a partir das fibras nervosas cutâneas atuam sobre seus receptores expressos em diversas células da pele. Na epiderme, estes neuropeptídeos podem estimular os queratinócitos a liberarem diversas citocinas inflamatórias (IL-1 α , IL-6 e IL-8), enquanto que em células de Langerhans, o CGRP e a SP amplificam a migração destas células aos gânglios linfáticos, bem como a apresentação de antígenos, contribuindo para os processos de hipersensibilidade cutânea (CHOI; NARDO, 2018; MIKAMI et al., 2011).

Ainda, as fibras nervosas sensoriais estão em contato íntimo com diversas estruturas/células da camada dérmica da pele, como mastócitos, vasos sanguíneos e folículos pilosos. Em células endoteliais, a SP aumenta a expressão de moléculas de adesão, contribuindo para os processos quimiotáticos (MEHTA; GRAINSTEN, 2018). Já nos mastócitos, a SP estimula a sua degranulação, com consequente liberação de TNF- α , histamina e serotonina, bem como a síntese *de novo* de outros mediadores inflamatórios solúveis, como citocinas e quimiocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-3, IL-6, CCL2, CCL5,

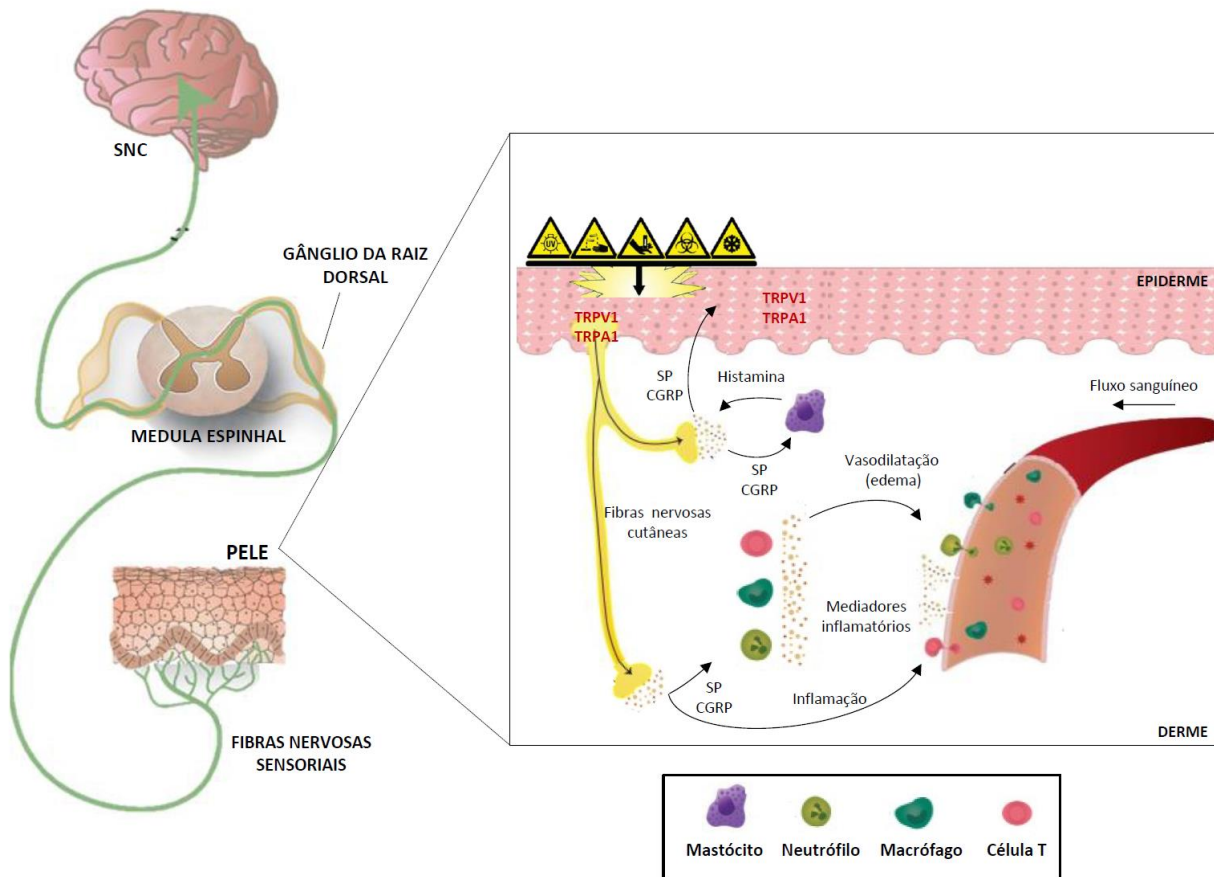
CXCL8 e CXCL9), prostaglandinas, leucotrienos e fatores pro-angiogênicos (fator de crescimento endotelial vascular). Esses mediadores secretados induzem a proliferação de células endoteliais (hipervascularização), a vasodilatação (edema) e a liberação continuada de neuropeptídeos pelas terminações nervosas sensoriais (CHOI; NARDO, 2018; OKABE et al., 2001; SIISKONEN; HARVIMA, 2019).

Além disso, os neuropeptídeos e demais mediadores inflamatórios liberados pelos mastócitos também podem atuar sobre outras células-alvo vizinhas (queratinócitos, células dendríticas, fibroblastos e neutrófilos) levando à alteração da homeostasia da pele, com resultante amplificação da resposta inflamatória. Em contrapartida, uma variedade de neurotrofinas (fator de crescimento neuronal) e mediadores inflamatórios (proteases, citocinas, quimiocinas, prostaglandinas e histamina) também são liberados por outras células da pele (GOUIN et al., 2017). As citocinas pró-inflamatórias se apresentam como a principal base de comunicação entre as células residentes ou não da pele com as terminações nervosas cutâneas. Particularmente, as citocinas IL-1 β e TNF- α são os principais mediadores liberados na iniciação do processo inflamatório. Essas citocinas pró-inflamatórias são capazes de se ligar aos seus respectivos receptores, expressos nos nociceptores. Como consequência, diversos canais de voltagem dependente, incluindo os canais TRP, são sensibilizados/ativados nas terminações nervosas cutâneas, favorecendo a liberação de neuropeptídeos no terminal periférico e a ativação continuada das células do tecido cutâneo (residentes e infiltrantes) (CHIU; VON HEHN; WOOLF, 2012). Dessa forma, esta rede multicelular complexa leva a um vicioso ciclo de interações que resulta na amplificação e manutenção da inflamação neurogênica cutânea (GOUIN et al., 2015) (Figura 3).

Embora as conexões entre os sistemas imunológico e nervoso tenham sido reconhecidas há muito tempo, os mecanismos precisos que fundamentam essa relação ainda precisam ser melhores elucidados. Neste sentido, juntamente com a indução da liberação de neuropeptídeos (vias neuronais e não neuronais), um aumento no cálcio citosólico também medeia a regulação de diversos aspectos inflamatórios/imunes (KHALIL et al., 2018; TANG, S. et al., 2017; WETTSCHURECK; STRILIC; OFFERMANN, 2019). Interessantemente, canais catiônicos, incluindo os canais TRP, expressos nas terminações nervosas cutâneas e em diferentes células da pele (residentes e infiltrantes) vêm demonstrando um papel essencial na modulação das interações neuroimune e, conseqüentemente, na patofisiologia de diversas doenças inflamatórias de pele, incluindo aquelas induzidas pela radiação UVB (CAMPONOGARA et al., 2020; KODKI et al., 2019; KUROHANE et al., 2015). Desta forma, a compreensão das vias de interação neuroimune mediadas pelos canais TRP pode

abrir caminhos para novas abordagens clínicas de tratamento contra doenças inflamatórias de pele associadas à inflamação neurogênica cutânea.

Figura 3 – Interações neuroimune no tecido cutâneo. (SNC – Sistema Nervoso Central).



Fonte: Adaptado de Choi e Nardo, 2018; Cohen, Wu e Kaplan, 2020.

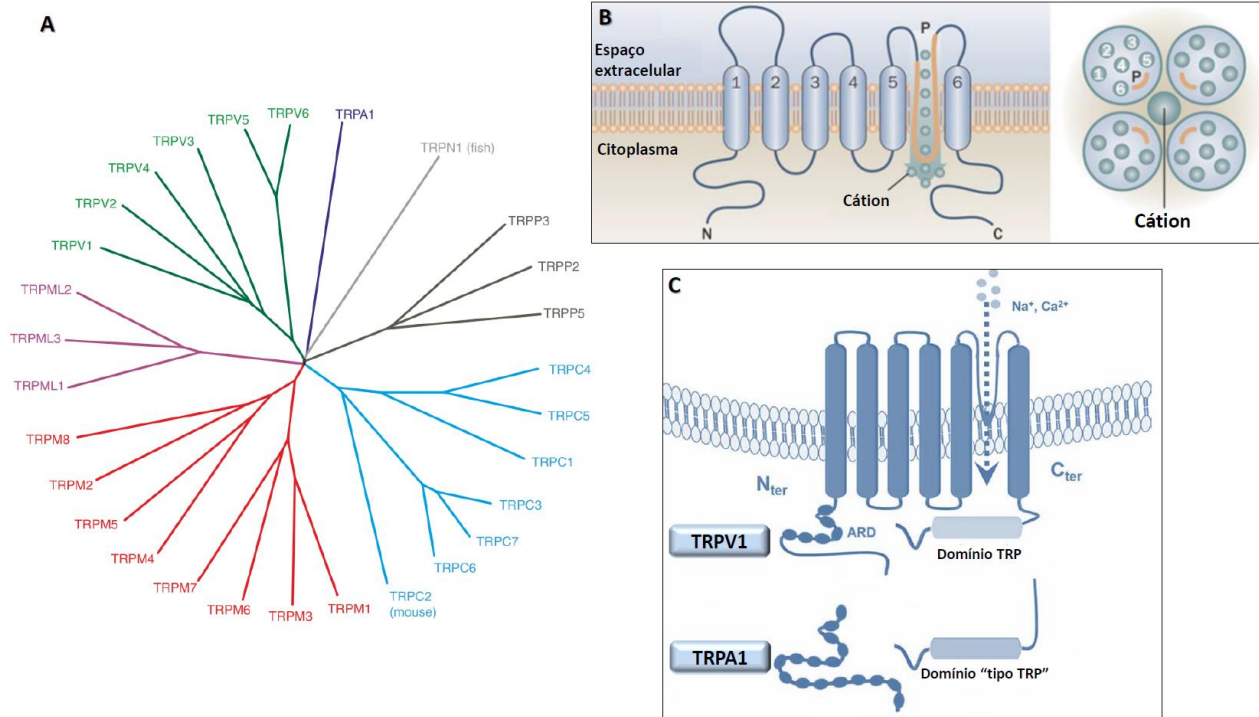
5.6 RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSITÓRIO (TRP)

Os canais TRP são sensores celulares polimodais envolvidos em diversos processos celulares, uma vez que detectam e respondem a uma variedade de estímulos externos físicos, químicos e mecânicos, bem como agentes endógenos e/ou segundos mensageiros produzidos durante uma lesão tecidual ou inflamação (NASSINI et al., 2014). Historicamente, Cosens e Manning (1969) foram os primeiros a descobrir uma família de receptores relacionada aos TRPs, por meio de uma mutação no gene *trp* em *Drosophila melanogaster*, em que os fotorreceptores com fenótipo mutante exibiam responsividade transitória à luz intensa e prolongada. Esta resposta anormal designou ao fotorreceptor mutante a denominação de

receptor de potencial transitório (MINKE et al., 1975). Posteriormente, Montell et al. (2002) adotou a nomenclatura TRP para designar a família de canais iônicos de potencial transitório. Mas foi a partir de 1995, com estudo de Petersen e colaboradores, a primeira descrição da família dos canais TRP em vertebrados, no qual foram identificados em cérebro de camundongos e oócitos de *Xenopus* (gênero de rãs aquáticas).

Atualmente, mais de 56 subtipos da família TRP foram encontrados em diversas espécies, representando uma ampla distribuição filogenética. Em mamíferos, a família de canais TRP compreende 28 proteínas de membrana, essas agrupadas em seis diferentes subfamílias, sendo designadas como: canônico (TRPC; primeira subfamília estudada), mucolipina (TRPML), anquirina (TRPA), melastatina (TRPM), policistina (TRPP) e vaniloide (TRPV) (NASSINI et al., 2014; SAMANTA; HUGHES; MOISEENKOVA-BELL, 2018). A família do receptor não sensível ao estímulo mecânico (TRPN), descoberto em *Drosophila melanogaster* mutante, não é expressa em mamíferos (HARDIE, 2007; MINKE, 2010). Interessantemente, a classificação dos canais TRP é baseada na similaridade da sequência de aminoácidos e não na sua semelhança funcional. Dessa forma, os membros de uma mesma subfamília podem ser distintos funcionalmente, ao passo que membros de diferentes subfamílias podem compartilhar características funcionais notavelmente comuns (ZHENG, 2013) (Figura 4A).

Figura 4 – Divisão filogenética das subfamílias dos canais TRP em humanos (A), Representação espacial da estrutura e multimerização dos canais TRP (B), Características estruturais dos canais TRPV1 e TRPA1 (C). N_{ter}: domínio N-terminal; C_{ter}: domínio C-terminal; ARD: domínio de repetição de anquirina.



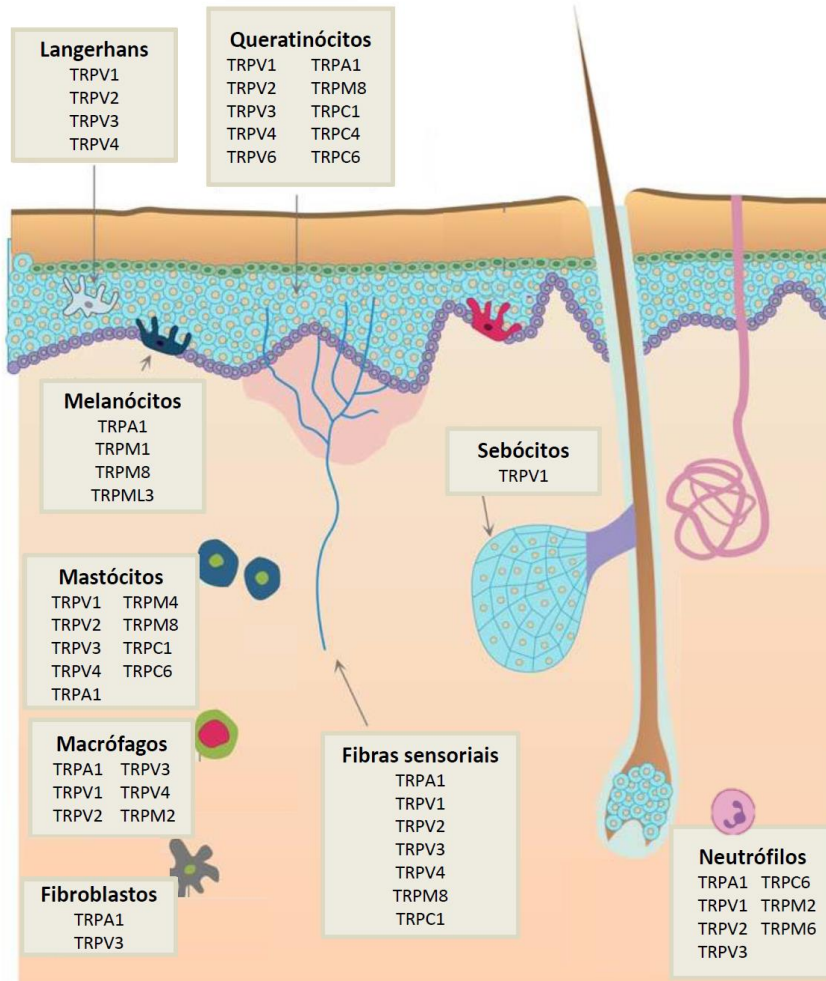
Fonte: Adaptado de Nilius e Owsianik, 2011.

Estruturalmente, os canais TRP são compostos por quatro subunidades (homo e/ou hetero tetrâmetros), as quais cada subunidade consiste estruturalmente de seis domínios transmembrana (S1-S6), com as porções amino- (NH₂) e carboxi- (COOH) terminais situados intracelularmente, além do poro permeável a cátions monovalentes e divalentes (preferencialmente a íons cálcio) localizada entre o domínio transmembrana S5 e S6 (FERNANDES; FERNANDES; KEEBLE, 2012; VRENKEN et al., 2016) (Figura 4B). Os domínios citoplasmáticos dos canais TRP (amino e carboxi terminal) podem conter locais de ligação para diversas proteínas quinases, calmodulina, e outras moléculas transdutoras de sinal (WEBER; MULLER, 2017). A porção carboxi terminal apresenta variações entre os diferentes tipos de canais TRP, sendo que nas subfamílias TRPC, TRPV e TRPM existe uma região altamente conservada (composta de 25 resíduos de aminoácidos; domínio TRP), sendo utilizada como região para marcação e rastreamento desses canais. Ainda, os resíduos de aminoácidos presentes no domínio TRP podem modular a atividade dos canais TRP, pela ligação com componentes fosfolipídicos de membrana (fosfatidilinositol 4,5-bifosfato) (STEINBERG; LESPAY-REBOLLEDO; BRAUCHI, 2014). Em contrapartida, a porção amino terminal apresenta repetições de anquirina (domínio de repetição de anquirina; ARD, do inglês “*Ankyrin Repeat Domain*”), as quais parecem estar envolvidas com a tetramerização

dos TRPs, bem como com a interação com ligantes e regulação alostérica dos canais. Curiosamente, o número de repetições de anquirina no domínio ARD pode variar entre as diferentes subfamílias TRP, sendo 3 a 4 repetições em TRPC, 6 repetições em TRPV e 14 a 15 repetições em TRPA (NILIUS; OWSIANIK, 2011) (Figura 4C).

Estes canais têm sido encontrados em sistemas neuronais (fibras nervosas aferentes primárias e células gliais) e não neuronais (queratinócitos, melanócitos, fibroblastos, linfócitos, células endoteliais, células dendríticas, neutrófilos, macrófagos e mastócitos) (Figura 5) (ACHANTA et al., 2018; DENDA; TSUTSUMI, 2011; DE LOGU et al., 2020; FUSI et al., 2014; HOU et al., 2017; YANG et al., 2015; ZHOU et al., 2018). A ampla distribuição dos canais TRP os torna fortes integradores das vias de sinalização neuroimune, o que explica a extensiva participação desses canais em diversos processos fisiológicos (crescimento e sobrevivência celular), bem como na patofisiologia de doenças de cunho inflamatório/imune (MORAN; SZALLASI, 2018; PARENTI et al., 2016; TÓTH et al., 2014). Embora os canais TRP apresentem similaridade relacionada à expressão celular, mecanismos de ativação e perfis farmacológicos, estes canais podem diferir-se quanto à detecção de diferentes estímulos físicos e químicos (compostos irritantes exógenos, substâncias lipídicas, produtos do estresse oxidativo, variações de pH e osmolaridade, estimulação mecânica, feromônios, luz UV e temperatura) (ANDRADE; MEOTTI; CALIXTO, 2012; GOUIN et al., 2017; MORI et al., 2016; NASSINI et al., 2014). Vale ressaltar que a sensibilidade dos canais TRP aos estímulos externos parece diferir-se entre as espécies, como é o caso do canal TRPV1, o qual detecta o calor nocivo em humanos, mas não em outras espécies de mamíferos (esquilos e camelos) (LAURSEN et al., 2016).

Figura 5 – Expressão dos receptores de potencial transitório (TRP) em células da pele (residentes ou infiltrantes) e em fibras nervosas sensoriais cutâneas.



Fonte: Adaptado de Caterina, 2014; Parenti et al., 2016; Zhou et al., 2019 e Maglie et al., 2021.

Especificamente, a subfamília TRPV foi inicialmente designada como receptor vaniloide (VR1), devido a ativação do receptor pela capsaicina, uma molécula do tipo vaniloide (presença de grupos homovanílicos na molécula) (SZEBENI; JANCSÓ; WOLLEMAN, 1978). Este receptor foi primeiramente clonado e isolado em camundongos (CATERINA et al., 1997) e, posteriormente, em humanos (HAYES et al., 2000). Devido à semelhança estrutural com outros canais TRP, o VR1 foi renomeado para TRPV1. O canal TRPV1 é um dos canais da família TRP mais bem caracterizados e extensivamente estudados (SAMANTA; HUGHES; MOISEENKOVA-BELL, 2018). Estruturalmente, o canal TRPV1 apresenta repetições de anquirina em seu domínio amino terminal, as quais regulam positivamente a atividade do canal (BENÍTEZ-ANGELES et al., 2020). Ainda, as sequências

carboxi e amino terminal formam uma grande região citoplasmática que compreende cerca de 70% da massa total do canal TRPV1 (MOISEENKOVA-BELL et al., 2008).

Essas particularidades estruturais, tem sido descritas em detalhes, a partir de estudos de microscopia crioeletrônica e cristalografia de raio-X, o que ajuda a elucidar as características fisiológicas do canal, bem como as diferenças estruturais entre as subfamílias dos canais TRP (CAO et al., 2013; LIAO et al., 2013). Interessantemente, embora a região dos poros seja semelhante aos canais Na_v , o canal TRPV1 apresenta um filtro de seletividade mais flexível devido à ausência de ligação de hidrogênio dentro e entre as hélices dos poros adjacentes (LIAO et al., 2013). Como um sensor polimodal, o canal TRPV1 pode ser ativado por uma diversidade de estímulos (exógenos e endógenos), tais como: calor nocivo ($>43^\circ\text{C}$), prótons ($\text{pH} < 5,9$), cânfora, capsaicina (componente pungente da pimenta vermelha), piperina (composto presente na pimenta preta), resiniferatoxina (isolada da *Euphorbia resinifera*), anandamida, poliaminas, ocitocina e derivados eicosanóides (ácido 12-hidroxeicosatetraenóico e ácido 15-hidroxeicosatetraenóico) (AHERN; WANG; MIRAYES, 2006; CATERINA et al., 1997; HWANG et al., 2000; NERSESYAN et al., 2017; SMART et al., 2000; SZALLASI; BLUMBERG, 1989; TOMINAGA et al., 1998; VANDEWAUW et al., 2018; XU; BLAIR; CLAPHAM, 2005).

Além disso, vários agentes endógenos e moléculas inflamatórias (trifosfato de adenosina, prostaglandinas, leucotrienos, citocinas, quimiocinas, serotonina, óxido nítrico, fatores de crescimento e bradicinina) podem influenciar na função do canal TRPV1 e, conseqüentemente, na indução de processos inflamatórios e na progressão de doenças (GOUIN et al., 2017; MALEK et al., 2015; MORAN; SZALLASI, 2018; NILIUS; OWSIANIK, 2011). Essa interação entre mediadores inflamatórios e o canal TRPV1 constitui um mecanismo de modulação alostérica (modificação da atividade do receptor por fosforilação e por vias de segundos mensageiros), que culmina com a sensibilização (fortalecimento das correntes evocadas durante a ativação subsequente do canal) e ativação periférica do canal (GOUIN et al., 2017; MA; QUIRION, 2007).

Em contrapartida, o canal TRPA1 foi isolado em culturas de fibroblastos de pulmão fetal humano por Jaquemar, Schenker e Trueb (1999), sendo o único membro da subfamília TRPA identificado primeiramente em mamíferos (TALAVERA et al., 2020). Entretanto, a sua expressão neuronal foi somente relatada em 2003, por Story e colaboradores, os quais identificaram o canal TRPA1 como sensor para temperaturas associadas ao frio nocivo ($< 17^\circ\text{C}$). Curiosamente, Vandewauw et al. (2018) demonstraram que o canal TRPA1 também pode contribuir para a detecção e transdução do calor nocivo em neurônios sensoriais. Entretanto,

as respostas de calor dependente do canal TRPA1 são potencializadas sob um estado redox (produção de EROs pela exposição ao calor), em ambos os sistemas neuronais e não neuronais (MOPARTHI et al., 2016; VANDEWAUW et al., 2018).

Diferentemente do canal TRPV1, o canal TRPA1 apresenta 14 repetições de anquirina em seu domínio amino terminal, bem como diversos resíduos de cisteínas que são necessários para sua ativação por moléculas reativas eletrofílicas (ANDERSSON et al., 2008). Dentre estas moléculas, podemos citar compostos naturais pungentes [cinamaldeído (encontrado na canela), isotiocianato de alila (presente no óleo de mostarda e wasabi) e alicina (encontrada no alho)], poluentes industriais e irritantes ambientais [acroleína (presente na fumaça do cigarro), formalina e hipoclorito] (BANDELL et al., 2004; BAUTISTA et al., 2005; BAUTISTA et al., 2006; BESSAC et al., 2008; HINMAN et al., 2006; MACPHERSON et al., 2005; MCNAMARA et al., 2007; SILVA et al., 2011).

O canal TRPA1 também detecta danos teciduais, especialmente durante eventos inflamatórios, uma vez que as EROs (peróxido de hidrogênio, oxigênio molecular e singlete, ânion superóxido, ozônio e peróxidos orgânicos) (BABES et al., 2016; BESSAC et al., 2008; SAWADA et al., 2008; TAKAHASHI et al., 2011; TAKAHASHI et al., 2012; TAYLOR-CLARK; UNDEM, 2010) e ERNs (óxido nítrico e peroxinitrito) (ANDERSSON et al., 2015; AUBDOOL et al., 2016; TAYLOR-CLARK et al., 2009), bem como derivados lipídicos (15-desoxi- Δ 12,14-prostaglandina J₂) e produtos da peroxidação lipídica (4-oxo-2-nonenal e 4-hidroxi-hexenal) (ANDERSSON et al., 2008; BANG; HWANG, 2009; MATERAZZI et al., 2008; TREVISANI et al., 2007) também ativam este canal, através da modificação covalente de resíduos de cisteína. Por outro lado, drogas sintéticas (isoflurano, clotrimazol e clorpromazina), eugenol (encontrado no cravo), carvacrol (presente no orégano), nicotina e mentol também são capazes de ativar o canal TRPA1, porém de maneira não eletrofílica (não há interação com resíduos de cisteínas na porção amino terminal do canal) (ANDERSSON et al., 2008; CHUNG et al., 2014; HILL; SCHAEFER, 2007; MATTA et al., 2008; MUKAIYAMA; USUI; NAGUMO, 2020; TALAVERA et al., 2009). De maneira similar ao TRPV1, a atividade do canal TRPA1 também é modulada por mediadores inflamatórios, através de vias de sinalização dependente de receptores específicos (receptores acoplados a proteína G) (BAUTISTA; PELLEGRINO; TSUNOZAKI, 2013; GOUIN et al., 2017).

Neste sentido, a capacidade dos canais TRPV1 e TRPA1 em detectar e responder a diversos estímulos os torna importantes integradores de sinais celulares (GOUIN et al., 2017). Curiosamente, a interação entre os canais TRPV1 e TRPA1, incluindo em condições inflamatórias, parece ser importante para a funcionalidade dos mesmos, visto que a

modulação do canal TRPA1 pelo cálcio pode ser regulada pelo canal TRPV1, e vice-versa (PATIL; JESKE; AKOPIAN, 2010; SPAHN; STEIN; ZÖLLNER, 2014). À nível neuronal, a interação entre os canais TRPA1 e TRPV1 pode ser explicada pelo fato de que 97% dos neurônios sensoriais positivos para TRPA1 também expressam o canal TRPV1 (PECZE et al., 2009; SPAHN; STEIN; ZÖLLNER, 2014). Entretanto, diversos estudos também têm demonstrado a expressão e funcionalidade dos canais TRPV1 e TRPA1 em sistemas não neuronais, incluindo células residentes e inflamatórias/imunes da pele e apêndices cutâneos (ATOYAN; SHANDER; BOTCHKAREVA, 2009; BELLONO et al., 2013; BONCHAK; SWERLICK, 2018; DENDA; TSUTSUMI, 2001; MICHAEL, 2017; MORAN et al., 2011; PARENTI et al., 2016; TALAVERA et al., 2020). Diante disso, crescentes evidências reforçam que a ativação dos canais TRPV1 e TRPA1, bem como as interações neuroimune por eles mediadas, contribuem para a iniciação e manutenção das repostas inflamatórias observadas em patologias cutâneas (CAMPONOGARA et al., 2019c, 2020; LIU et al., 2013; KODJI et al., 2019).

5.6.1 Participação dos canais TRPA1 e TRPV1 em patologias cutâneas

As respostas inflamatórias e imunes apresentam um papel central não somente na manutenção da homeostasia, como também no desenvolvimento de diversas patologias, incluindo aquelas desenvolvidas no tecido cutâneo. Estas respostas são geradas por mecanismos moleculares bem sintonizados, em que diferentes células podem atuar como moduladores, efetores ou ambos (BAUTISTA; PELLEGRINO; TSUNOZAKI, 2013; PARENTI et al., 2016). As modificações nas concentrações de cálcio intracelular representam um mecanismo fundamental na regulação das respostas inflamatórias e imunes de pele, o que torna os canais TRP essenciais mediadores desses processos (KANEKO; SZALLASI, 2014). Estas respostas inflamatórias e imunes mediadas pelos canais TRPV1 e TRPA1 envolvem uma orquestrada inter-relação entre mecanismos neurogênicos e não neurogênicos, incluindo a liberação de neuropeptídeos pelas fibras nervosas sensoriais cutâneas (peptidérgicas), ativação de células residentes e inflamatórias da pele e alterações vasculares (aumento da permeabilidade vascular e edema) (ACHANTA et al., 2018; CHOI; NARDO, 2018; GOUIN et al., 2017) (Figura 2; página 48).

Neste sentido, a ativação dos canais TRPV1 e TRPA1, presentes em ambas as células neuronais e não neuronais, desempenha um papel chave na manutenção e amplificação dos processos inflamatórios envolvidos na patofisiologia de diversas doenças de pele, incluindo a

dermatite atópica, dermatite de contato alérgica e irritante, psoríase e inflamação de pele induzida pela radiação UVB e luz visível (luz azul; 470-480 nm) (CAMPONOOGARA et al., 2019c, 2020, 2021; FENG et al., 2017; LIU et al., 2013; MORAN et al., 2011; NATTKEMPER et al., 2018; TÓTH et al., 2014; YOO et al., 2020; ZHOU et al., 2018, 2019).

Diversos antagonistas (moléculas sintéticas ou compostos isolados de produtos naturais) dos canais TRP têm sido identificados e estudados como estratégia terapêutica contra diversas doenças, incluindo àquelas de cunho inflamatório. Entretanto, em decorrência dos resultados negativos quanto à segurança terapêutica, muitos compostos antagonistas do canal TRPV1 tiveram que ser retirados dos ensaios clínicos devido ao desenvolvimento de hipertermia transitória (BREDERSON; KYM; SZALLASI, 2013). Um exemplo é a molécula antagonista do canal TRPV1, AMG-517, que embora eficaz no tratamento da dor inflamatória, os estudos de fase clínica I demonstraram que este composto promoveu um aumento na temperatura corporal de aproximadamente 4 °C (para valores de até 40,2 °C) dos voluntários, entre uma a quatro horas após sua administração oral (voltando aos valores basais após vinte quatro horas) (GAVVA et al., 2008). Devido à magnitude de efeitos adversos ocasionados pelo antagonismo do canal TRPV1, novos antagonistas desse canal (segunda geração) passaram a ser sintetizados, mostrando além de um benefício clínico, uma maior segurança terapêutica.

Nesta perspectiva, AmorePacific (Corporação em Seul, Coreia do Sul) aplicou um esforço para desenvolver um novo fármaco antagonista do canal TRPV1, identificando a partir da síntese de mais de 2.000 novos compostos, uma nova classe de antagonistas não vaniloides do canal TRPV1. Dentre esses, o composto PAC-14028 (Asivatrep; $C_{21}H_{22}F_5N_3O_3S$) mostra-se como candidato altamente promissor, devido ao potente e seletivo bloqueio do canal TRPV1, à favorável hidro- e lipofilicidade (molécula anfipática) e à alta biodisponibilidade oral e perfis farmacocinéticos agradáveis (LIM; PARK, 2012). Além disso, a alta preocupação com o risco de hipertermia causada por antagonistas TRPV1, fez com que o potencial hipertérmico do PAC-14028 fosse extensivamente monitorado, cujos resultados demonstraram uma menor probabilidade em gerar este efeito adverso característico, quando comparado à molécula AMG-517 (LIM; PARK, 2012).

Park et al. (2012) também examinaram outros perfis de segurança associados à via de administração, mostrando que a aplicação tópica pode trazer maiores benefícios relacionados à segurança dos antagonistas TRPV1. Estimulado pelos perfis de segurança e eficácia, a modalidade terapêutica por via tópica do PAC-14028 está sendo extensivamente estudada em doenças inflamatórias de pele mediadas pelo canal TRPV1, como a dermatite atópica, a partir

de estudos pré-clínicos (LEE et al., 2018) e estudos clínicos de fase IIb (LEE et al., 2019) e de fase III (dados ainda não publicados; www.clinicaltrials.gov; #NCT02965118). Por outro lado, a partir de estudos pré-clínicos utilizando modelos experimentais de dor fisiopatológica, o bloqueio do canal TRPA1 atenuou a hipersensibilidade à dor mecânica e ao frio com mínimos ou nenhum efeito adverso (ABDEL-MAGID, 2021; CHEN et al., 2011). Além disso, o canal TRPA1 não está envolvido na regulação da temperatura corporal e, portanto, antagonistas deste canal não apresentam efeitos adversos associados àqueles observados pelos antagonistas do canal TRPV1 (hipertermia) (CHEN et al., 2011).

Já que estudos revelam que o canal TRPV1 e, mais tarde, o canal TRPA1 detectam mudanças térmicas do ambiente frente ao calor, fica cada vez mais claro que os mesmos também estão envolvidos no desenvolvimento de lesões cutâneas e inflamação associada às queimaduras (HØJLAND et al., 2015; MORAN; SZALLAZI, 2018). Vale ressaltar, que os canais TRPV1 e TRPA1 medeiam diversos efeitos após a exposição à radiação UV, uma vez que ambos os canais detectam as radiações UVA e UVB (BABES et al., 2016, 2021; FIALHO et al., 2020; HUANG et al., 2018; LEE et al., 2011). Hill e Schaefer (2009) relataram que a ativação do canal TRPA1 pela radiação UVA ocorre de maneira indireta, por meio da produção de EROs. Além da sensibilização constitutiva do canal TRPA1 pela radiação UVA, diversas substâncias fotossensibilizadoras podem potencializar a ativação indireta dos canais TRPA1 pela radiação UVA (BABES et al., 2016, 2021). Estudos também apontam que o canal TRPA1 pode ser ativado diretamente pela radiação UVA e UVB em queratinócitos humanos (LIU et al., 2017) ou pela radiação UVB em sinaptossomas da medula espinal de camundongos (FIALHO et al., 2020). Embora Fialho et al. (2020) também tenha mostrado o envolvimento do canal TRPA1 na dor inflamatória induzida pela radiação UVB, até o momento, não havia nenhum estudo que demonstrasse o envolvimento do TRPA1 neuronal e não neuronal na queimadura de pele induzida pela radiação UVB.

Assim como o canal TRPA1, o canal TRPV1 também é capaz de ser ativado/sensibilizado por compostos psoralenos (fotossensibilizadores como o 8-metóxipsoraleno) na presença de luz UVA, muito embora sua fotossensibilização não ocorra somente pela exposição à radiação UVA (BABES et al., 2016, 2021). Diferentemente do canal TRPA1, diversos estudos comprovam a importância do canal TRPV1 na indução de diversos parâmetros observados na queimadura de pele induzida pela radiação UVB. A radiação UVB leva ao aumento do influxo de cálcio mediado pelo canal TRPV1 em células da pele (queratinócitos) (KANG et al., 2017; LEE et al., 2009). As alterações no cálcio intracelular culminam na ativação de cascatas de sinalização, essas responsáveis pelo aumento

da expressão de enzimas inflamatórias, MMPs, citocinas e quimiocinas inflamatórias e fatores de crescimento (HUANG et al., 2017, 2019; KANG et al., 2017; KUSUMANINGRUM et al., 2018; LEE et al., 2009, 2011).

Além disso, o influxo de cálcio após a ativação do canal TRPV1 pela radiação UVB também promove a produção de EROs, disfunção mitocondrial e apoptose (HUANG et al., 2018, 2019). Conjuntamente, esses eventos celulares induzidos pela radiação UVB culminam no desenvolvimento de respostas inflamatórias e proliferativas, tais como: eritema, edema, infiltração de células inflamatórias, hiperplasia epidermal (diferenciação e proliferação aumentada de queratinócitos) e fotoenvelhecimento (CAMPONOOGARA et al., 2021; HOU et al., 2017; KANG et al., 2017; LEE et al., 2011; LEE; KANG; CHUNG, 2012). Neste sentido, essas evidências indicam que o canal TRPV1 contribui para desenvolvimento e progressão dos diversos sinais associados à queimadura de pele induzida pela radiação UVB, podendo servir como um alvo terapêutico potencial nas patologias cutâneas mediadas pela radiação UVB.

5.7 DIOSMETINA: UM NOVO ANTAGONISTA DO CANAL TRPV1

Diosmetina ([3',5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona]) é a aglicona do flavonoide glicosídeo Diosmina, um princípio farmacologicamente ativo encontrado em medicamentos com efeitos vasoprotetores, tais como Daflon[®] e Detralex[®] (POÓR et al., 2014). Este composto flavonoide pode ser encontrado em frutas cítricas, leguminosa de *Acacia farnesiana* Wild, folhas de *Olea europaea* L., bem como em outras espécies de plantas (CÉSPEDES et al., 2010; DE PRÁ et al., 2017; DOMÍNGUEZ et al., 2011; GATTUSO et al., 2006; MEIRINHOS et al., 2005; ROOWI; CROZIER, 2011; ZHAO et al., 2011). Interessantemente, um estudo publicado por Adamante et al. (2019) avaliou a possibilidade da molécula diosmetina em atuar como antagonista do canal TRPV1, visto que outros compostos flavonoides (eridictiol), com estrutura similar a diosmetina, promoviam um antagonismo ao canal (com potência superior aos clássicos antagonistas TRPV1, como SB-366791 e capsazepina) (ROSSATO et al., 2011).

A partir da mensuração do influxo de cálcio e do ensaio de ligação específica (usando [³H]-resiniferatoxina (RTX); um agonista TRPV1), Adamante et al. (2019) demonstraram que, assim como outros flavonoides, a diosmetina também funcionava como um antagonista do canal TRPV1. Além disso, este mesmo estudo mostrou que a administração oral de diosmetina não induziu hipertermia (um efeito adverso comum de alguns antagonistas

TRPV1; como AMG-9810 e AMG-517) nos animais, assegurando seu perfil de segurança frente ao aumento exacerbado da temperatura corporal (ADAMANTE et al., 2019; TREVISAN et al., 2013). Diversos estudos têm demonstrado o potencial da diosmetina como anti-inflamatória, antinociceptivo, antioxidante e antitumoral (ADAMANTE et al., 2019; CHEN, X. et al., 2019; LIAO et al., 2014; LIU et al., 2017; OAK et al., 2018; YANG et al., 2017; YU et al., 2014).

Sua ação anti-inflamatória tem sido bem documentada em diversos modelos *in vitro* e *in vivo* de inflamação, atuando na redução de citocinas inflamatórias (IL-1 β , TNF- α e IL-6) e prostaglandina E₂ (LIU et al., 2018; YANG et al., 2017; YU et al., 2014; ZARAGOZÁ et al., 2020), e na inibição da atividade e expressão de enzimas inflamatórias (óxido nítrico sintase, cicloxigenases e mieloperoxidase) (LIU et al., 2018; YU et al., 2014). Interessantemente, os efeitos anti-inflamatórios da diosmetina são mediados pela inibição das vias de sinalização das MAPKs (JNK e p38), NF- κ B e inflamassoma NLRP3 (LIU et al., 2018; YANG et al., 2017; YU et al., 2014). Além disso, Schinella et al. (1998) e Céspedes et al. (2010) também demonstraram a eficácia anti-inflamatória tópica da diosmetina no edema de orelha induzido pelo agente irritante 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato.

Paralelamente ao efeito anti-inflamatório, a ação antioxidante da diosmetina ocorre através da redução dos níveis de EROs, do aumento dos níveis de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase) e da inibição da formação intracelular de malondialdeído (produto resultante do processo de peroxidação lipídica) (LIAO et al., 2014; LIU et al., 2018; YANG et al., 2017). Baseado na diversidade de estudos demonstrando a eficácia da diosmetina em doenças inflamatórias em geral, estudos recentes revelaram sua eficácia terapêutica em doenças inflamatórias cutâneas, especialmente na dermatite atópica (LEE et al., 2020; PARK et al., 2020). Esses estudos indicaram que a diosmetina reduziu diversos marcadores inflamatórios [edema, eritema, ressecamento da pele, espessura epidermal, infiltração de células inflamatórias, anticorpo IgE, citocinas inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , IL-4)] observados na lesão cutânea atópica.

Entretanto, até o momento, nenhum estudo elucidou os efeitos terapêuticos da diosmetina em outras condições inflamatórias cutâneas mediadas por processos inflamatórios e oxidativos, como é o caso da queimadura de pele induzida pela radiação UVB. Além disso, sabendo do envolvimento do canal TRPV1 na patofisiologia da queimadura de pele mediada pela radiação UVB, a diosmetina, como um ligante antagonista desse canal, poderia atuar como uma promissora estratégia de tratamento das lesões cutâneas evocadas pela exposição à radiação UVB.

6 ARTIGOS CIENTÍFICOS

6.1 ARTIGO CIENTÍFICO 1

Life Sciences 262 (2020) 118557



Contents lists available at ScienceDirect

Life Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lifescie



Neuronal and non-neuronal transient receptor potential ankyrin 1 mediates UVB radiation-induced skin inflammation in mice



Camila Camponogara^a, Evelyne S. Brum^a, Natháli S. Pegoraro^a, Indiará Brusco^a,
Fernanda G. Rocha^b, Margareth M. Brandenburg^b, Daniela A. Cabrini^b, Eunice André^b,
Gabriela Trevisan^c, Sara Marchesan^{a,*}

^a Laboratory Neurotoxicity and Psychopharmacology, Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^b Graduate Program in Pharmacology, Department of Pharmacology, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil

^c Graduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Ultraviolet radiation
Sunburn
Oxidative stress
TRP channels
HC-030031
Resiniferatoxin

ABSTRACT

Aims: Neuronal and non-neuronal TRPA1 channel plays an active role in the pathogenesis of several skin inflammatory diseases. Although a recent study identified the TRPA1 channel activation upon UVB exposure, its role in inflammatory, oxidative, and proliferative processes underlying UVB radiation-induced sunburn was not yet fully understood. We evaluated the TRPA1 channel contribution in inflammatory, oxidative, and proliferative states on skin inflammation induced by UVB radiation in mice.

Main methods: TRPA1 role was evaluated from inflammatory (ear edema, myeloperoxidase, and N-acetyl-β-D-glycosaminidase activities, histological changes, and cytokines levels), proliferative (epidermal hyperplasia, PCNA, and TRPA1 levels), and oxidative (reactive oxygen intermediates measure, H₂O₂ quantification, and NADPH oxidase activity) parameters caused by UVB radiation single (0.5 J/cm²) or repeated (0.1 J/cm²) exposure. We verified the contribution of non-neuronal and neuronal TRPA1 on UVB radiation-induced inflammatory parameters using RTX-denervation (50 μg/kg s.c.).

Key findings: TRPA1 blockade by the selective antagonist Lanette® N HC-030031 reduced all parameters induced by UVB radiation single (at concentration of 1%) or repeated (at concentration of 0.1%) exposure. We evidenced an up-regulation of the TRPA1 protein after UVB radiation repeated exposure, which was blocked by topical Lanette® N HC-030031 (0.1%). By RTX-denervation, we verified that non-neuronal TRPA1 also interferes in some inflammatory parameters induction. However, cutaneous nerve fibers seem to be most needed in the development of UVB radiation-induced inflammatory processes.

Significance: We propose the TRPA1 channel participates in the UVB radiation-induced sunburn in mice, and it could be a promising therapeutic target to treat skin inflammatory disorders.

Abbreviations: BSA, serum albumin; CGRP, calcitonin gene-related peptide; DCFH-DA, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; DMSO, dimethyl sulfoxide; EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid; HTAB, hexadecyl trimethylammonium bromide; HRP, horseradish peroxidase; H₂O₂, hydrogen peroxide; i.p., intraperitoneal; Lanette® N HC-030031 (0.01%), Semisolid formulation containing 0.1 mg HC-030031/g Lanette® N base cream; Lanette® N HC-030031 (0.1%), Semisolid formulation containing 1 mg HC-030031/g Lanette® N base cream; Lanette® N HC-030031 (1%), Semisolid formulation containing 10 mg HC-030031/g Lanette® N base cream; Lanette® N dexamethasone (0.5%), Semisolid formulation containing 5 mg dexamethasone/g Lanette® N base cream; MIP-2, protein inflammatory macrophage 2; MPO, myeloperoxidase; NAG, 4-nitrophenyl-n-acetyl-β-D-glycopyranoside; NAGase, N-acetyl-β-D-glycosaminidase; NaOH, sodium hydroxide; NF-κB, nuclear factor Kappa B; OD, optical density; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PMSF, phenylmethane sulfonyl fluoride; ROI, reactive oxygen intermediates; RTX, resiniferatoxin; SEM, standard error of the mean; SP, substance P; TMB, tetramethylbenzidine; TRP, potential transient receptor; TRPA1, potential transient receptor ankyrin 1; UV, ultraviolet; UVA, ultraviolet type A; UVB, ultraviolet type B

* Corresponding author at: Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Santa Maria, Av. Roraima 1000, Camobi, Zipcode: 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

E-mail address: saramarchesan@ufsm.br (S.M. Oliveira).

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118557>

Received 31 March 2020; Received in revised form 23 September 2020; Accepted 28 September 2020

Available online 07 October 2020

0024-3205/ © 2020 Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

Skin provides an efficient chemical and physical protective barrier against various chemical, physical, and biological agents [1]. External insults to the skin as exposure to solar UV radiation represent a significant public health concern since promoting discomfort and sensory changes because of skin damage [2].

UV component of the sunlight reaching the earth's surface (daylight UV) consists of UVA (320–400 nm) and UVB (290–400 nm) spectrum, wherein the UVB portion is considered more genotoxic and about 1000 times more capable on causing sunburn than UVA [3]. Since the biological process underlying UVB exposure is not fully understood, studies have investigated the cellular and molecular pathways involved in the oxidative, inflammatory, and proliferative process after the UVB radiation exposure [4,5]. It is known that UVB radiation exposure can elicit a cutaneous stress response with activation of keratinocytes, fibroblasts, and other immune/inflammatory cells, resulting in oxidative stress production and skin inflammatory responses [6,7].

Keratinocytes (90% of epidermal cells in the outermost skin layer) play a central role in several responses after the photo-damage induced by UVB, including erythema, edema, epidermal hyperplasia, inflammatory cells infiltration (neutrophils and macrophages), and inflammatory cytokines/chemokines release [8]. These inflammatory mediators are closely related to the overproduction of reactive oxygen intermediates (ROI) by infiltrated inflammatory cells and UVB-damaged skin cells [8]. Moreover, UVB radiation repeated exposure initiates not only cutaneous inflammation and ROI accumulation, but also promotes the photoaging and skin carcinogenesis [9].

UVB radiation-mediated inflammation involves an intense communication among neuronal and skin cells, becoming an ideal model to investigate the interaction and extent between two components in the initiation and self-maintenance of the cutaneous inflammatory process [10]. Skin is densely innervated by afferent sensory fibers (unmyelinated C-fibers and myelinated A δ -fibers), which initiates the UVB-induced inflammatory process through cutaneous neurogenic inflammation. As a consequence, occurs the neuropeptide release (substance P and CGRP) and activation of neighboring target cells (keratinocytes, mast cells, fibroblasts, and neutrophils) [11]. Upon stimulation, these cells release cytokines, chemokines, neurotrophins, and neuropeptides, which promote positive feedback loops to enhance the inflammatory process [12].

Understanding the interactions between the nervous and the skin immune systems is essential to develop effective treatments for skin inflammatory disorders that present both neurogenic and non-neurogenic components. In this sense, the transient receptor potential channels (TRP) have become an attractive target for treating inflammatory symptoms since they can be expressed at both neuronal and non-neuronal systems.

The transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) is a calcium-permeable non-selective cation channel expressed by cutaneous nerve endings and non-neuronal cells (keratinocytes, fibroblasts, and mast cells), and can be activated by several endogenous inflammatory mediators, exogenous agents (pungent chemicals), and temperatures less than or equal to 17 °C [13–15]. Notably, oxygen, nitrogen, or carbonyl species produced upon tissue damage, including hydrogen peroxide (H₂O₂), can also elicit its activation [16,17].

Growing evidence indicate the TRPA1 activation as a sensor and regulator of inflammatory processes, acting tightly in the skin inflammatory diseases development, as irritant contact dermatitis, allergic contact dermatitis, and psoriasis [15,18–22]. Furthermore, our research group confirmed the TRPA1 channel activation in a UVB radiation-induced burn model in mice [23]. Besides TRPA1 mediates the UVB radiation-induced inflammation, TRPA1 also mediates the cutaneous sensitization induced by UVA radiation since it can be activated by ROI produced in the UVA-photosensitizers presence [24].

However, the TRPA1 channel role in inflammatory, oxidative, and

proliferative processes UVB radiation-induced was not yet fully understood. As neuronal and non-neuronal TRPA1 channel plays an active role in the pathogenesis of skin inflammatory diseases, we hypothesized that TRPA1 channel could also orchestrate the inflammatory, oxidative and proliferative responses underlying the UVB radiation-induced sunburn since TRPA1 channel is activated upon UVB exposure. Thus, knowing the TRPA1 channel involvement in the UVB radiation-induced skin inflammation allows antagonist molecules of this channel to become potential therapies for skin inflammatory disorders, such as UVB-radiation induced sunburn.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

All reagents were analytical grade. Hematoxylin-eosin and paraffin were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Dexamethasone, Hexadecyl trimethylammonium bromide (HTAB), tetramethylbenzidine (TMB), HC-030031, tween*20, tween*80, monobasic sodium phosphate, dibasic sodium phosphate, phenylmethane sulfonyl fluoride (PMSF), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Peroxidase from horseradish Type II (E.C. 1.11.1.7), aminoxy acetic acid, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), sodium hydroxide (NaOH), saponin, glycine, Eosin Y, Mayer's hematoxylin, base trisma, dimethyl sulfoxide (DMSO), and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA). Isoflurane (Baxter, Sao Paulo, Brazil), xylazine (Syntecvet, Sao Paulo, Brazil), ketamine (Syntecvet, Sao Paulo, Brazil), hydrogen peroxide (H₂O₂) (Impex, Brasilia, Brazil), and phenol red, sodium acetate, absolute ethanol, methanol, acetic acid, and formaldehyde (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) were used. Lanette® N base cream was purchased from Nova Derme (Santa Maria, Brazil). The enzyme-linked immunoassay kit for macrophage inflammatory protein (MIP)-2 was purchased from Peprotech (Sao Paulo, Brazil; catalog # 900-K152). Polyclonal anti-PCNA antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA), polyclonal anti-TRPA1 antibody (Alomone, Jerusalem BioPark, Israel), secondary antibody IgG HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA), and 3,3' diaminobenzidine (DAB) substrate Kit (BD Bioscience, California, USA) were also used.

2.2. Treatments

Both HC-030031 and dexamethasone were purchased separately and incorporate to the Lanette® N base cream (used as vehicle; 15 mg/ear) to form semisolids containing dexamethasone (0.5%; 5 mg dexamethasone/g Lanette® N base); used as positive control [25] or HC-030031 (a selective TRPA1 channel antagonist) to 0.01% (0.1 mg HC-030031/g Lanette® N base cream); 0.1% (1 mg HC-030031/g Lanette® N base cream) and 1% (10 mg HC-030031/g Lanette® N base cream). Several studies demonstrated Lanette® base cream is cosmetically acceptable as a standard emollient. Its topical application causes neither pruritogenic mediators (histamine and serotonin) release nor an increase in scratching behavior [26–28]. All semisolid formulations were prepared prior *in vivo* experiments. We chose the 1% concentration of HC-030031 based on its similar efficacy (seen by the maximum inhibition calculated) to the dexamethasone, a non-steroidal anti-inflammatory commonly used to treat inflammatory skin conditions. From that, the lower concentrations (0.1 and 0.01%) of HC-030031 were based on a similar concentration scale, as described previously [29].

To evaluate the inflammatory and oxidative parameters upon UVB radiation single exposure, the mice were divided into different experimental groups as it follows: naïve (negative control; neither UVB radiation exposure nor treatment); UVB radiation (0.5 J/cm²; no treatment); UVB radiation (0.5 J/cm²) + Lanette® N vehicle; UVB radiation (0.5 J/cm²) + Lanette® N HC-030031 (0.01%); UVB radiation (0.5 J/

cm²) + Lanette® N HC-030031 (0.1%); UVB radiation (0.5 J/cm²) + Lanette® N HC-030031 (1%); UVB radiation (0.5 J/cm²) + Lanette® N dexamethasone (0.5%).

To assess TRPA1 positive-cutaneous nerve fibers chemical denervation upon UVB radiation single exposure, the mice were divided as it follows: naïve (negative control); UVB radiation (0.5 J/cm²; no treatment); RTX-mice exposed to UVB radiation (0.5 J/cm²) and non-treated; RTX-mice exposed to UVB radiation (0.5 J/cm²) + Lanette® N vehicle; RTX-mice exposed to UVB radiation (0.5 J/cm²) + Lanette® N HC-030031 (1%); RTX-mice exposed to UVB radiation (0.5 J/cm²) + Lanette® N dexamethasone (0.5%).

To investigate inflammatory and proliferative parameters upon UVB radiation repeated exposure, the mice were divided into different experimental groups as it follows: naïve (negative control; neither UVB radiation exposure nor treatment); UVB radiation (0.1 J/cm²; no treatment); UVB radiation (0.1 J/cm²) + Lanette® N vehicle; UVB radiation (0.1 J/cm²) + Lanette® N HC-030031 (0.1%); UVB radiation (0.1 J/cm²) + Lanette® N dexamethasone (0.5%).

2.3. Animals

Male adult Swiss mice (25–30 g) were kept at 22 ± 2 °C (60–80% humidity) under a 12 h/light-dark cycle and standard laboratory food and water *ad libitum*. All experiments were conducted according to national and international legislation (guidelines of Brazilian Council of Animal Experimentation—CONCEA—and of U.S. Public Health Service's Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals—PHS Policy), approved by the Institutional Committee for Animal Care and Use of the Federal University of Santa Maria (Process number 7999090818/2018), and were reported in compliance with the ARRIVE guidelines [30]. After *in vivo* experiments, all animals were euthanized with an overdose of sodium thiopental (100 mg/kg, i.p.) followed by cervical dislocation (to ensure the animals' euthanasia process), and the mice's right ears were removed to further inflammatory, oxidative and proliferative analyses. Each experiment was repeated at least two times in different experimental days to complete the total number of animals required for each assay. This was done to confirm our results with a distinct experimental group of animals in different experimental days. Animals were randomly assigned to different treatment groups, and all experimental protocols were performed blindly concerning drug administration.

2.4. UVB-irradiation models

2.4.1. UVB radiation source

The UVB radiation source was a Philips TL40W/12 RS lamp (Medical-Eindhoven, The Netherlands) positioned at 12 cm from the mouse ear, which emitted light spectrum between 290 and 315 nm, with an emission peak at 300 nm. UVB output was measured using a radiometer (UV monitor MS-211-1, EKO Instruments, Japan), which achieved an emission rate of 0.61 mW/cm². Firstly, the animals were acclimated in the experimental room for at least 30 min and then were intraperitoneally (i.p.) anesthetized with ketamine (90 mg/kg) plus xylazine (30 mg/kg). After that, mice's ears were exposed to UVB radiation. The body was protected with cotton cloth, which prevents the passage of UVB radiation (0 mW/cm² UVB transmission as measured by radiometer).

2.4.2. Skin inflammation model induced by UVB radiation single exposure

The right ear of anesthetized mice was exposed for 14 min (840 s) (dose of 0.5 J/cm²) to single exposure of UVB radiation [31]. Immediately after the UVB irradiation process, the mice ears were topically treated with Lanette® N vehicle, Lanette® N HC-030031 (0.01–1%), or Lanette® N dexamethasone (0.5%).

2.4.3. Skin inflammation model induced by UVB radiation repeated exposure

The right ear of anesthetized mice was submitted [for 2.8 min (168 s); a dose of 0.1 J/cm²] to repeated exposures of UVB radiation (on the 1st, 3rd and 5th day; a total of 3 alternating exposures), as described previously, with minor modifications [32,33]. The Lanette® N vehicle, Lanette® N HC-030031 (0.1%), or Lanette® N dexamethasone (0.5%) were topically applied in mice ears during all experimental periods (for 6 days; once a day). On the 1st, 3rd, and 5th days, the topical treatments were applied immediately after the UVB irradiation process.

2.5. Evaluation of inflammatory parameters

2.5.1. Ear edema measurement

Ear thickness measurement was evaluated using a digital micrometer (Digimes; 0–25 mm), as reported previously [34]. Animals were anesthetized with isoflurane *via* a nose cone and ear thickness (µm) was evaluated before (basal measurement) and at 24 h after the UVB radiation single or repeated exposure.

2.5.2. Myeloperoxidase (MPO) activity

Twenty-four hours after a single exposure or after the last repeated exposure (on the 6th day) of UVB radiation, the animals were euthanized. Their ears were removed to assess the neutrophil infiltration, through MPO activity measure, as reported previously [35]. Tissue samples (approximately 30 mg) were homogenized with a motor-driven homogenizer in 250 µL of acetate buffer (80 mM, pH 5.4), containing hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB; 0.5%) and centrifuged at 16,000 ×g for 20 min. The supernatant (25 µL) was collected and incubated with 100 µL of acetate buffer (80 mM, pH 5.4) and 25 µL of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB; 18.4 nM) at 37 °C for 10 min. The enzyme activity was analyzed colorimetrically by a spectrophotometer (Fisher Biotech Microkinetics BT 2000 microplate reader) at 630 nm. We expressed the results as optical density (OD)/mL sample.

2.5.3. N-acetyl-β-D-glycosaminidase (NAGase) activity

Twenty-four hours after the last repeated exposure (on the 6th day) of UVB radiation, the animals were euthanized. Their ears were removed to assess the macrophage infiltration through NAGase activity measure, as reported previously [35]. Tissue samples (approximately 30 mg) were homogenized with a motor-driven homogenizer in 250 µL of acetate buffer (80 mM, pH 5.4), containing 0.5% HTAB and centrifuged at 16,000 ×g for 20 min. The supernatant (25 µL) was collected and incubated with 100 µL of citrate buffer (50 mM, pH 4.5) and 25 µL of 4-nitrophenyl-*n*-acetyl-β-D-glycopyranoside (NAG; 2.25 nM) at 37 °C for 60 min. The enzyme activity was analyzed colorimetrically by a spectrophotometer (Fisher Biotech Microkinetics BT 2000 microplate reader) at 405 nm. We expressed the results as optical density (OD)/mL sample.

2.5.4. Histology

Twenty-four hours after the single exposure or after the last repeated exposure (on the 6th day) of UVB radiation, mice were euthanized and, the ears samples (approximately 30 mg) were prepared to evaluate histological changes, as described previously [25,34]. We qualitatively analyzed the histological slides from an optical microscope (model Axio Lab.A1, Carl Zeiss), and images at 200× and 400× magnification were captured using a camera (model AxioCam ICc 1). The infiltrated inflammatory cell number and the epidermal thickness (µm), was obtained by the counting of two fields from different histological slides (images at 200× magnification) of each experimental group (2 animals/group) using ImageJ software (NIH, USA).

2.5.5. Measurement of macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2) levels

Twenty-four hours after a single exposure to UVB radiation, the

animals were euthanized, and the ears were removed and homogenized in 250 μ L of phosphate buffer solution (80 mM; pH 7.4) containing Tween 20 (0.5%), phenylmethane sulfonyl fluoride (PMSF; 0.1 mM), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; 2 mM), and serum albumin (0.1%). The homogenate was centrifuged (16,000 \times g) at 4 °C for 20 min [36]. MIP-2 levels were determined in the supernatant using an enzyme-linked immunoassay kit (PeproTech, Brasil). We expressed the results as ng cytokine/mL sample from standard solutions to MIP-2.

2.6. Oxidative parameters

We evaluated the intracellular ROI production, the H₂O₂ levels and NADPH oxidase activity in the mice ears collected at 24 h after UVB radiation single exposure. Tissue samples (approximately 30 mg) were homogenized in 300 μ L of Tris/HCl buffer (50 mM, pH 7.4) and centrifuged (3000 rpm) at 4 °C for 10 min and the supernatant was collected to further analyses.

2.6.1. Measurement of intracellular ROI generation (tissue oxidation capacity)

To evaluate the intracellular ROI production, the supernatant (50 μ L) was incubated with 230 μ L of Tris/HCl buffer (10 mM, pH 7.4) and 20 μ L of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) (1.87 mM) at 25 °C for 30 min in the dark, as described previously [37,38]. We expressed the results as μ M DCF/mL sample from standard solutions to DCF.

2.6.2. Hydrogen peroxide (H₂O₂) quantification

To determine the H₂O₂ levels, the assay was performed as reported previously, with minor modifications [39,40]. The sodium azide (1:5 ratio; 25 mM) was added to the supernatant and centrifuged again (12,000 \times g) at 4 °C for 20 min. The final supernatant (50 μ L) was incubated with 5 μ L of peroxidase II enzyme (50 μ g/mL) and 25 μ L of phenol red (100 μ g/mL) at 25 °C for 10 min in the dark. The reaction was stopped by the addition of sodium hydroxide (1 M; 10 μ L) and read colorimetrically at 610 nm. We expressed the results as μ M H₂O₂/mL sample from standard solutions to H₂O₂.

2.6.3. NADPH oxidase activity

The NADPH oxidase activity was assessed from the supernatant (10 μ L), using a commercial assay kit (CY0100, cytochrome c reductase, NADPH Assay Kit, Sigma-Aldrich) [29]. We expressed the results as units of the NADPH oxidase/mL sample.

2.7. Immunohistochemical evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and TRPA1 levels

Twenty-four hours after the last repeated exposure (on the 6th day) to UVB radiation, ear tissues (approximately 30 mg) were prepared, and the peroxidase-binding sites into slices were detected and stained as described previously [41]. For the PCNA and TRPA1 detection, slides were incubated with polyclonal anti-PCNA antibody (1:100 dilution) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) or polyclonal anti-TRPA1 antibody (1:200 dilution) (Alomone, Jerusalem BioPark, Israel), and subsequently incubated with 1:100 dilutions to secondary antibody IgG HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA). We qualitatively analyzed the immunohistological slides from an optical microscope (model Axio Lab.A1, Carl Zeiss), and images at 200 \times and/or 400 \times magnification were captured from a camera (model Axiocam ICc 1). For immunopositive reaction quantification (images at 400 \times magnification), we analyzed one field from distinct immunohistological slides (4 animals/group). The expression of PCNA and TRPA1 proteins were determined by the counting of immunostained cells per field using the ImageJ software (NIH, USA).

2.8. TRPA1 positive-cutaneous nerve fibers chemical denervation

The desensitization process by resiniferatoxin (RTX; an ultra-potent TRPV1 channel agonist) also leads to the neuronal deletion of the TRPA1 channel since TRPA1 and TRPV1 channels are co-express in C-type sensory nerve fibers [42]. Before systemic administration of RTX (50 μ g/kg s.c.) or vehicle (0.5% ethanol and 0.5% Tween* 80 in saline), animals were anesthetized (90 mg/kg ketamine plus 30 mg/kg xylazine) [43], and the baseline ear thickness was measured. Seven days after the injection of RTX or vehicle, we performed the eye wiping assay to confirm the desensitization process [44]. After that, mice ears were submitted to UVB radiation single exposure (as described above), and immediately after, they were topically treated with Lanette® N vehicle (Lanette® N base; 15 mg/ear), Lanette® N HC-030031 (1%), or Lanette® N dexamethasone (0.5%). Twenty-four hours after the UVB radiation single exposure, ear thickness was again assessed. Next, the animals were euthanized, and the ears were collected (approximately 30 mg) for MPO activity measure and histological analysis (as described above).

2.9. Statistical analysis

Results were expressed as mean + standard error of the mean (S.E.M). The maximum inhibitory effect of topical treatments was calculated based only on the UVB radiation exposed group, which we considered as 100% of the effect. We assessed the statistical difference between groups by one-way or two-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey *post hoc* test. *p* values lower than 0.05 (*p* < 0.05) denote significant differences among groups. We used statistical software GraphPad Prism version 6.00 (San Diego, California, USA) and ImageJ software (to measure the epidermal thickness and immunostained and inflammatory cells count).

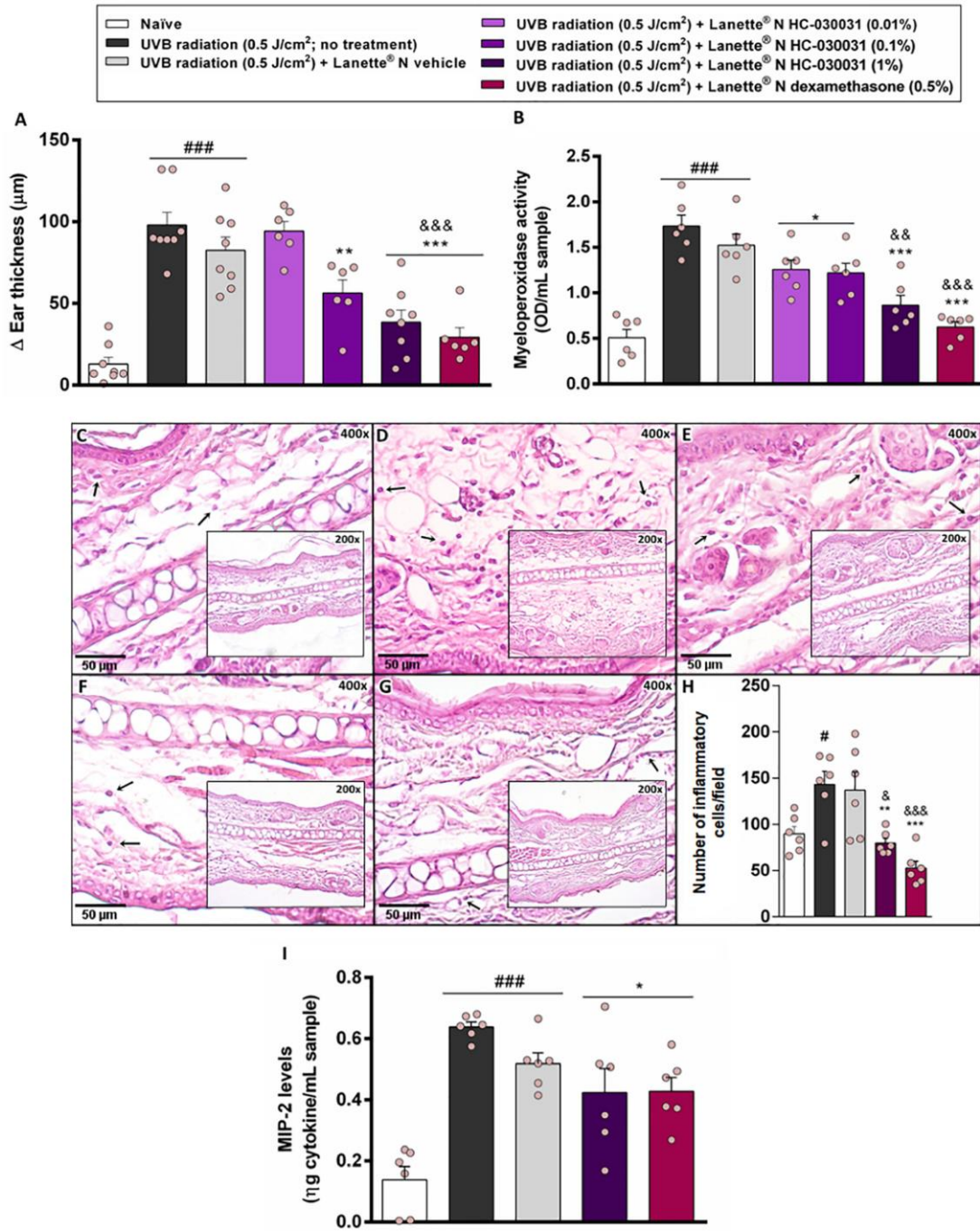
3. Results

3.1. TRPA1 antagonism reduces the edematogenic response induced by a single exposure to UVB radiation

A single exposure to UVB radiation increased the ear thickness, with a maximum effect (E_{max}) of 85 \pm 8 μ m when compared to the naive group (negative control). Only topical Lanette® N HC-030031 (0.1 and 1%) and Lanette® N dexamethasone (0.5%) effectively reduced the ear edema when compared with UVB radiation (0.5 J/cm²) group. It is worth mentioning that the Lanette® N HC-030031 (1%) produced an anti-edematogenic effect similar to the Lanette® N dexamethasone (0.5%), with maximum inhibition (I_{max}) of 70 \pm 9% and 88 \pm 2%, respectively. Also, both Lanette® N HC-030031 (1%) and Lanette® N dexamethasone (0.5%) effects were significantly different (&&& *p* < 0.001) to Lanette® N vehicle, confirming that the anti-edematogenic effect of these semisolid formulations is dependent of HC-030031 or dexamethasone (Fig. 1A). We observed Lanette® N HC-030031 (0.01–1%; 15 mg/ear) reduced the ear edema of concentration-dependent manner [inhibitory concentration 50% (IC₅₀) of 1.13 (0.57–2.23) mg HC-030031/g Lanette® N base cream] since the semisolid formulations contained different quantifies of HC-030031 incorporated for each 1 g of Lanette® N base cream. Eight animals (n) per experimental group were used, except to UVB radiation (0.5 J/cm²) + Lanette® N HC-030031 (0.01%; n = 6 animals); UVB radiation (0.5 J/cm²) + Lanette® N HC-030031 (0.1%; n = 6 animals); UVB radiation (0.5 J/cm²) + Lanette® N dexamethasone (0.5%; n = 6 animals) groups.

3.2. TRPA1 pharmacological blockade decreases the inflammatory cells infiltration and MIP-2 inflammatory cytokine levels induced by a single exposure to UVB radiation

UVB radiation increased the MPO enzyme activity, indicating



(caption on next page)

Fig. 1. Effect of TRPA1 pharmacological blockade in the skin inflammation model induced by single exposure to UVB radiation. All formulations (15 mg/ear) were applied immediately after UVB radiation exposure. (A) Ear edema, (B) MPO activity, (C–G) histological changes (hematoxylin-eosin; 200 \times and 400 \times), (H) number of inflammatory cells/field (histological images at 200 \times) and (I) MIP-2 levels. Each bar represents the mean + S.E.M. for 6–8 animals/group (A), 6 animals/group (B), 6 distinct histological slides analyzed/group (C–H) and 6 animals/group (I). Ball symbols from each column denote the number of animals or different histological slides per groups/treatment. Black arrows indicate the presence of inflammatory cells infiltrating into ear tissue. Figure captions represent: (C) Naïve; (D) UVB radiation (0.5 J/cm²; no treatment); (E) UVB radiation (0.5 J/cm²) + Lanette[®] N vehicle; (F) UVB radiation (0.5 J/cm²) + Lanette[®] N HC-030031 (1%); (G) UVB radiation (0.5 J/cm²) + Lanette[®] N dexamethasone (0.5%). Scale bar, 50 μ m. [#]p < 0.05 and ^{###}p < 0.001 when compared with naïve group. *p < 0.05, **p < 0.01, and ***p < 0.001 when compared to the UVB radiation (0.5 J/cm²; no treatment) group. [§]p < 0.05, ^{§§}p < 0.01, and ^{§§§}p < 0.001 when compared with UVB radiation (0.5 J/cm²) + Lanette[®] N vehicle group (one-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test).

neutrophil infiltration into ear tissue. All topical semisolid formulations reduced the MPO activity, except the Lanette[®] N vehicle, compared with UVB radiation (0.5 J/cm²; no treatment) group. It is worth pointing out that the Lanette[®] N HC-030031 (1%) produced a similar effect to the Lanette[®] N dexamethasone (0.5%), with I_{max} 72 \pm 7% and 89 \pm 4%, respectively. Also, both Lanette[®] N HC-030031 (1%) and Lanette[®] N dexamethasone (0.5%) effects were significantly different ([§]p < 0.01 and ^{§§§}p < 0.001) to the Lanette[®] N vehicle, confirming that the MPO activity reduction by these semisolid formulations is dependent of HC-030031 or dexamethasone presence (Fig. 1B). To evaluate this parameter, 6 animals (n) per experimental group were used.

Here, we confirmed that UVB radiation single exposure developed inflammatory signals such as edema formation and inflammatory cells infiltration into the dermis, which were reduced by topical Lanette[®] N HC-030031 (1%) or Lanette[®] N dexamethasone (0.5%) (Fig. 1C–G). We observed intense inflammatory cells infiltration (143 \pm 14 inflammatory cells/field) into mice ears exposed to UVB radiation compared with the naïve group (87 \pm 7 inflammatory cells/field). Topical Lanette[®] N HC-030031 (1%) or Lanette[®] N dexamethasone (0.5%) similarly reduced the number of inflammatory cells infiltrated into the dermis (79 \pm 4 and 53 \pm 8 inflammatory cells/field), respectively, which were also significantly different ([§]p < 0.05 and ^{§§§}p < 0.001) to the Lanette[®] N vehicle-treated group. It confirms that the infiltrated inflammatory cells reduction occurs by the presence of HC-030031 or dexamethasone in the semisolid formulations (Fig. 1H). For histological analysis, 6 histological slides (n) per experimental group were used.

A single exposure to UVB radiation increased the MIP-2 inflammatory cytokine levels in the skin. Topical Lanette[®] N HC-030031 (1%) and Lanette[®] N dexamethasone (0.5%) similarly reduced the skin MIP-2 levels, with I_{max} of 43 \pm 13% and 41 \pm 8%, respectively. Topical Lanette[®] N vehicle was not able to reduce the MIP-2 levels (Fig. 1I). A number of 6 animals (n) per experimental group were used to assess this parameter.

3.3. TRPA1 pharmacological blockade reduces the oxidative damage induced by a single exposure to UVB radiation

Since topical Lanette[®] N HC-030031 (1%) reduced all evaluated inflammatory parameters in the skin inflammation model caused by UVB radiation single exposure and with similar efficacy to the Lanette[®] N dexamethasone, the 1% concentration of Lanette[®] N HC-030031 was chosen for the evaluation of the oxidative parameters. Tissue oxidation capacity was evaluated by the intracellular conversion of DCFH₂-DA to DCF. A single exposure to UVB radiation increased at 2-fold the DCF fluorescence when compared with the naïve group. Topical Lanette[®] N HC-030031 (1%) and Lanette[®] N dexamethasone (0.5%) similarly reduced the conversion of DCFH₂-DA to DCF by 65 \pm 14% and 71 \pm 12%, respectively (Fig. 2A).

UVB radiation single exposure also increased at 3-fold the H₂O₂ levels when compared with the naïve group. Topical Lanette[®] N HC-030031 (1%) and Lanette[®] N dexamethasone (0.5%) reduced the H₂O₂ levels by 47% \pm 20% and 63 \pm 13%, respectively, although not significantly (data not shown).

ROI production was also indirectly measured through NADPH oxidase enzyme activity, which increased at 4-fold after a single exposure to UVB radiation when compared with the naïve group. Only topical

Lanette[®] N HC-030031 (1%) significantly reduced the NADPH oxidase activity by 100%, while Lanette[®] N dexamethasone (0.5%) slightly reduced this oxidative parameter, although not significantly (Fig. 2B). We used a number of 6 animals (n) per experimental group to evaluate all oxidative parameters, except to UVB radiation (0.5 J/cm²) + Lanette[®] N HC-030031 (1%; n = 5 animals) group.

3.4. TRPA1 antagonism reduces the ear edema induced by UVB radiation repeated exposure

UVB radiation repeated exposure increased the mice's ear thickness, which stabilized from the 5th experimental day, with an E_{max} of 340 \pm 30 μ m when compared to the naïve group. Since topical Lanette[®] N HC-030031 (0.1%) reduced all inflammatory parameters after a single UVB radiation exposure, this concentration was chosen for the repeated treatment. All topical semisolid formulations, except the Lanette[®] N vehicle, reduced the ear edema compared with UVB radiation (0.1 J/cm²; no treatment) group. Daily topical treatment with Lanette[®] N HC-030031 (0.1%) reduced the ear edema from the 4th until the 6th experimental day, with I_{max} of 54 \pm 5% (on the 5th experimental day). Lanette[®] N dexamethasone (0.5%) also reduced the ear edema from the 3rd until the 6th experimental day, with I_{max} of 81 \pm 4% (on the 5th experimental day). It is worth pointing out that the antiedematogenic effect of Lanette[®] N HC-030031 (0.1%) and Lanette[®] N dexamethasone (0.5%) was significantly different (^{§§§}p < 0.001) to the Lanette[®] N vehicle, at the same time points described above (Fig. 3A). To evaluate the ear edema induced by UVB radiation repeated exposure, 8 animals (n) per experimental group were used.

3.5. TRPA1 antagonism decreases the inflammatory cell infiltration and the epidermal thickness induced by UVB radiation repeated exposure

Repeated UVB radiation exposure (0.1 J/cm²) promoted consistent inflammatory cell infiltration into ear tissue since it increased both MPO and NAGase enzyme activities. All topical semisolid formulations reduced both inflammatory enzyme activities, except the Lanette[®] N vehicle when compared with the UVB radiation (0.1 J/cm²; no treatment) group. Topical Lanette[®] N HC-030031 (0.1%) and Lanette[®] N dexamethasone (0.5%) similarly reduced the MPO and NAGase activities, with I_{max} of 53 \pm 3% and 75 \pm 7% to Lanette[®] N HC-030031 (0.1%), and 54 \pm 9% and 68 \pm 10% to Lanette[®] N dexamethasone (0.5%), respectively. Notably to MPO activity, we also observed the groups topically treated with Lanette[®] N HC-030031 (0.1%) or Lanette[®] N dexamethasone (0.5%) were significantly different (^{§§§}p < 0.001) to the Lanette[®] N vehicle-treated group (Fig. 3B–C). To analyze the MPO and NAGase enzymes activities, 6 animals (n) per experimental group were used, except to UVB radiation (0.1 J/cm²) + Lanette[®] N vehicle (n = 6–7 animals); UVB radiation (0.1 J/cm²) + Lanette[®] N HC-030031 (0.1%; n = 7 animals); UVB radiation (0.1 J/cm²) + Lanette[®] N dexamethasone (0.5%; n = 7 animals) groups.

Histologically, UVB radiation repeated exposure markedly increased the epidermal (acanthosis formation) and dermal thickness (ear edema formation) and inflammatory cell infiltration (dermis). Topical Lanette[®] N HC-030031 (0.1%) or Lanette[®] N dexamethasone (0.5%) reduced the inflammatory and proliferative parameters (Fig. 3D–H). UVB radiation

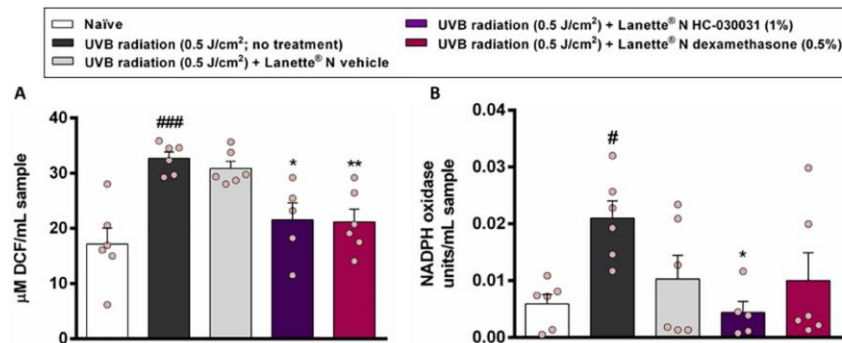


Fig. 2. Effect of TRPA1 pharmacological blockade in the skin inflammation model induced by a single UVB radiation exposure. All formulations (15 mg/ear) were applied immediately after UVB radiation exposure. (A) DCF fluorescence and (B) NADPH oxidase activity. Ball symbols from each column denote the number of animals per group/treatment. Each bar represents the mean + S.E.M. for 5–6 animals/group. **p* < 0.05 and ****p* < 0.001 when compared with naive group. **p* < 0.05 and ***p* < 0.01 when compared to the UVB radiation (0.5 J/cm²; no treatment) group (one-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test).

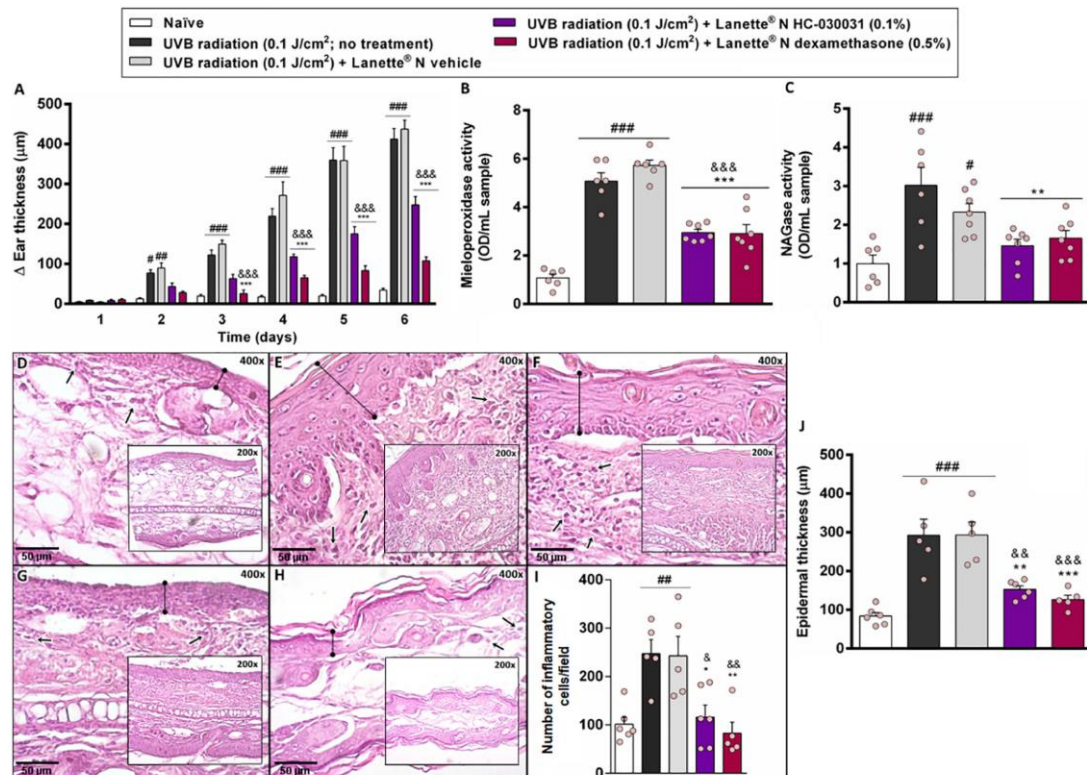


Fig. 3. Effect of TRPA1 pharmacological blockade in the skin inflammation model induced by repeated exposure to UVB radiation. All formulations (15 mg/ear) were applied immediately after UVB radiation exposure. (A) Ear edema, (B) MPO activity, (C) NAGase activity, (D–H) histological changes (hematoxylin-eosin; 200 × and 400 ×), (I) number of inflammatory cells/field (histological images at 200 ×) and (J) Epidermal thickness (µm). Each bar represents the mean + S.E.M. for 8 animals/group (A) and 6–7 animals/group (B and C) and 5–6 distinct histological slides analyzed/group (D–J). Ball symbols from each column denote the number of animals or different histological slides per group/treatment. Symbol (↔) denotes the epidermal thickness. Black arrows indicate the presence of inflammatory cells infiltrated into ear tissue. Scale bar, 50 µm. Figure captions represent: (D) Naive; (E) UVB radiation (0.1 J/cm²; no treatment); (F) UVB radiation (0.1 J/cm²) + Lanette[®] N vehicle; (G) UVB radiation (0.1 J/cm²) + Lanette[®] N HC-030031 (0.1%); (H) UVB radiation (0.1 J/cm²) + Lanette[®] N dexamethasone (0.5%). Scale bar, 50 µm. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, and ****p* < 0.001 when compared with naive group. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, and ****p* < 0.001 when compared to the UVB radiation (0.1 J/cm²; no treatment) group. &*p* < 0.05, &&*p* < 0.01, and &&&*p* < 0.001 when compared with UVB radiation (0.1 J/cm²) + Lanette[®] N vehicle group (repeated measures two-way ANOVA followed Tukey *post hoc* test) (A); (one-way ANOVA followed Tukey *post hoc* test) (B, C, and J).

repeated exposure caused consistent inflammatory cell infiltration (247 ± 29 inflammatory cells/field) compared with the naïve group (101 ± 15 inflammatory cells/field). Topical Lanette® N HC-030031 (0.1%) or Lanette® N dexamethasone (0.5%) similarly reduced the number of inflammatory cells infiltrated into the dermis (117 ± 25 and 83 ± 23 inflammatory cells/field), respectively, which were also significantly different ($^{**}p < 0.05$ and $^{***}p < 0.01$) to the Lanette® N vehicle-treated group. It confirms that the infiltrated inflammatory cells reduction occurs by HC-030031 or dexamethasone presence in the semisolid formulations (Fig. 3I).

Repeated exposure to UVB radiation to mice's ears markedly increased the epidermal thickness ($209 \pm 41 \mu\text{m}$) when compared to the naïve group ($84 \pm 9 \mu\text{m}$). Topical Lanette® N HC-030031 (0.1%) or Lanette® N dexamethasone (0.5%) similarly reduced the epidermal hyperplasia with I_{max} of $67 \pm 4\%$ and $79 \pm 5\%$, respectively (Fig. 3J). Here, we also observed Lanette® N HC-030031 (0.1%), and Lanette® N dexamethasone (0.5%) effect was significantly different ($^{**}p < 0.01$ and $^{***}p < 0.001$) to the Lanette® N vehicle (did not affect the epidermal thickness). For histological analyses, 6 histological slides (n) per experimental group were used to naïve (negative control); UVB radiation (0.1 J/cm^2) + Lanette® N HC-030031 (0.1%); groups; and 5 histological slides (n) per experimental group to UVB radiation (0.1 J/cm^2 ; no treatment); UVB radiation (0.1 J/cm^2) + Lanette® N vehicle; UVB radiation (0.1 J/cm^2) + Lanette® N dexamethasone (0.5%) groups.

3.6. TRPA1 pharmacological blockade decreases the PCNA immunopositive cells induced by repeated UVB radiation exposure

All groups presented PCNA-positive cells, which indicate a normal cellular proliferation process in the epidermis. However, UVB radiation repeated exposure increased at 7-fold the PCNA-positive cells above the basal layers, indicating a proliferative ability increase. Topical Lanette® N HC-030031 (0.1%) or Lanette® N dexamethasone (0.5%) reduced the number of PCNA-positive cells by $74 \pm 3\%$ and $85 \pm 4\%$, respectively (Fig. 4). A number of 4 immunohistological slides (n) per experimental group were used to the immunohistochemical analysis of all groups.

3.7. TRPA1 antagonism decreases the TRPA1 channel immunopositive cells induced by repeated exposure to UVB radiation

All groups presented TRPA1-immunostained cells. TRPA1 immunoreactivity was diffusely detected in the epidermis and dermis layers. UVB radiation repeated exposure increased at 6-fold the TRPA1 immunopositive cells in the skin. Topical Lanette® N HC-030031 (0.1%) or Lanette® N dexamethasone (0.5%) showed an almost complete and similar reduction of TRPA1-immunostained cells (epidermis and dermis) with I_{max} of $95 \pm 2\%$ and $93 \pm 2\%$, respectively, while Lanette® N vehicle reduced by $32 \pm 6\%$ (Fig. 5). Although the Lanette® N vehicle slightly decreased the TRPA1 channel immunopositive cells, the Lanette® N HC-030031 (0.1%) and Lanette® N dexamethasone (0.5%) effect on this parameter was significantly higher ($^{***}p < 0.001$). Here, we also used a number of 4 immunohistological slides (n) per experimental group to the TRPA1 channel immunopositive cells analysis.

3.8. TRPA1-positive cells modulate the edema in a skin inflammation model induced by single UVB radiation exposure

A single exposure to UVB radiation increased the ear thickness to E_{max} of $81 \pm 8 \mu\text{m}$ in comparison to the naïve group. RTX-mice reduced the ear edema by $62 \pm 10\%$ ($31 \pm 8 \mu\text{m}$ ear thickness) compared to mice ears non-desensitized and exposed to UVB radiation. Topical Lanette® N HC-030031 (1%) or Lanette® N dexamethasone (0.5%) reduced the ear edema in desensitized animals and exposed to

UVB radiation, with I_{max} of $75 \pm 8\%$ and $95 \pm 4\%$, respectively, when compared with RTX-mice and only exposed to UVB radiation (Fig. 6A). To evaluate this parameter, we used a number of 6 animals (n) per experimental group, except to RTX-mice exposed to UVB radiation (0.5 J/cm^2) + Lanette® N dexamethasone (0.5%; n = 5 animals) group.

3.9. Depletion of TRPA1-positive cutaneous sensory nerve fibers reduces the inflammatory cells infiltration induced by UVB radiation single exposure

UVB radiation single exposure promoted neutrophil infiltration (evaluated by MPO activity) into ear tissue of non-desensitized mice. Otherwise, MPO activity was profoundly reduced in RTX-mice, reaching similar levels to the naïve group. Topical Lanette® N HC-030031 (1%) or Lanette® N dexamethasone (0.5%) did not affect the inflammatory cell infiltration in desensitized animals exposed to UVB radiation (Fig. 6B). We assessed the MPO activity from 4 animals (n) per experimental group, except to RTX-mice exposed to UVB radiation (0.5 J/cm^2) + Lanette® N HC-030031 (1%; n = 5 animals) group.

Histological analysis of mice ears tissue confirmed the results obtained previously by RTX pretreatment. Histological sections of non-desensitized mice ears and exposed to UVB radiation revealed an increase in ear thickness (especially in the dermis) with clear evidence of edema and inflammatory cell infiltration. RTX systemic desensitization attenuated the dermis thickness and fully reduced the inflammatory cell infiltration into ear tissue. Topical Lanette® N HC-030031 (1%) or Lanette® N dexamethasone (0.5%) reduced the ear edema but did not alter the inflammatory cells infiltration in RTX-mice and exposed to UVB radiation (Figs. 6C-H and 7). To quantify the infiltrated inflammatory cells, the number of different histological slides per experimental group (2–3 animals/group) follows as: naïve (negative control; n = 6 histological slides); UVB radiation (0.5 J/cm^2 ; no treatment) (n = 6 histological slides); RTX-mice exposed to UVB radiation (0.5 J/cm^2 ; no treatment) (n = 6 histological slides); RTX-mice exposed to UVB radiation (0.5 J/cm^2) + Lanette® N vehicle (n = 4 histological slides); RTX-mice exposed to UVB radiation (0.5 J/cm^2) + Lanette® N HC-030031 (1%) (n = 6 histological slides); RTX-mice exposed to UVB radiation (0.5 J/cm^2) + Lanette® N dexamethasone (0.5%) (n = 7 histological slides).

4. Discussion

Skin exposure to UVB radiation initiates a photo-oxidative reaction with increased ROI cellular levels and cutaneous inflammatory response, characterized by erythema, edema, inflammatory cell infiltration, and epidermal hyperplasia [45]. Besides, UVB radiation-mediated inflammatory response may be triggered by neuronal and non-neuronal cells' synergism since UVB radiation also sensitizes primary afferent nerve fibers localized in skin tissue [10].

Topical glucocorticoids are commonly used to treat UVB-induced sunburn [2]. Here, topical Lanette® N dexamethasone reduced the inflammatory, proliferative, and oxidative parameters induced by UVB exposure. Although glucocorticoids are the first line in the skin inflammatory disease treatment, these drugs often lack durable effectiveness, and its uncontrolled use may cause adverse effects, which can exacerbate the skin problems [46]. Thus, it is necessary to investigate the molecular mechanisms underlying the UVB-induced sunburn to discover new effective and safe therapies. Since TRP channels are involved in inflammatory and painful processes [11,16,18], they become a promising target for the study. TRP channel families are present on both neuronal and non-neuronal cells, and thus they may be involved in the cutaneous inflammation induced by UVB radiation. We demonstrated that the TRPA1 channel expressed on non-neuronal and neuronal cells is involved in developing and maintaining the skin inflammation caused by UVB radiation single or repeated exposure. Moreover, its skin expression may be self-regulated when

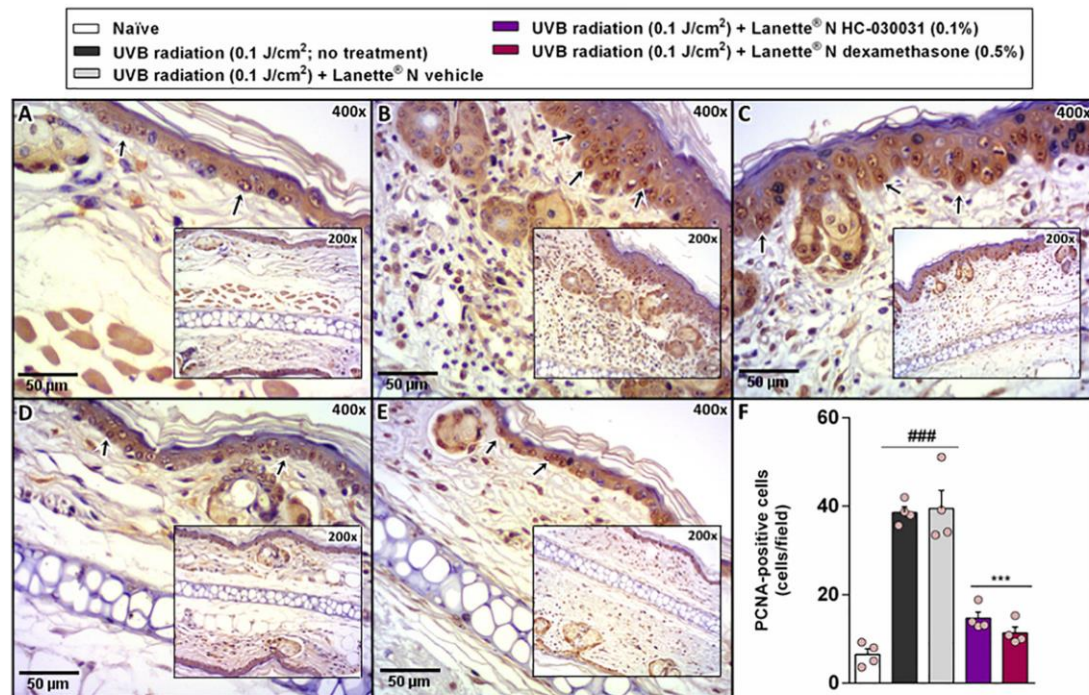


Fig. 4. Effect of TRPA1 pharmacological blockade on the number of PCNA-positive cells in the skin inflammation model induced by repeated exposure to UVB radiation. All formulations (15 mg/ear) were applied immediately after UVB radiation exposure. Representative images of immunohistochemical analysis from (A–E) mice ears immunohistological sections counterstained with hematoxylin (200 \times and 400 \times) and (F) quantitative analysis of PCNA-positive cells (immunohistological images at 400 \times) per field. Ball symbols from each column denote the different immunohistological slides per group/treatment. Black arrows indicate the presence of PCNA immunostained cells into ear tissue (epidermis). Figure captions represent: (A) Naïve; (B) UVB radiation (0.1 J/cm²; no treatment); (C) UVB radiation (0.1 J/cm²) + Lanette[®] N vehicle; (D) UVB radiation (0.1 J/cm²) + Lanette[®] N HC-030031 (0.1%); (E) UVB radiation (0.1 J/cm²) + Lanette[®] N dexamethasone (0.5%). Each bar represents the mean + S.E.M. for 4 different immunohistological slides analyzed/group. Scale bar, 50 μ m. The graphic symbols denote the significance levels between groups ###p < 0.001 compared to the naïve group. ***p < 0.001 when compared to the UVB radiation (0.1 J/cm²; no treatment) group (one-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test).

pharmacologically blocked.

We showed that the TRPA1 pharmacological blockade reduced the ear edema after single (Fig. 1A) and repeated (Fig. 3A) exposure to UVB radiation. It is known that neuronal TRPA1 activation leads to the release of the neuropeptides like substance P and CGRP, contributing to edema formation that is considered one of the hallmarks of UVB radiation-induced skin inflammation [47,48]. Moreover, non-neuronal TRPA1 may potentiate the neurogenic skin inflammation by enhancing cellular responses, such as the cytokines/chemokines and prostaglandin signaling regulation [10,13,49].

UVB radiation-single and repeated exposures also lead to the recruitment of inflammatory cells, contributing to the photo-damaged skin [35]. Here, TRPA1 antagonism reduced the UVB radiation exposure-induced accumulation of neutrophils (Figs. 1B and 3B) and macrophages (Fig. 3C) in mice ears. There is growing evidence supporting the TRPA1 role in the inflammatory cells infiltration in different inflammation models, including skin inflammatory diseases [18,50]. Although previous studies demonstrated the release of neuropeptides from sensory nerves is a prerequisite for inflammatory cells infiltration, the TRPA1 activation expressed on neutrophils and monocytes/macrophages also contribute to persistent sensitization of cutaneous nerve fibers with consequent inflammatory response amplification [51,52].

Besides edema and inflammatory cells infiltration, UVB radiation leads to the skin barrier impairment with consequent ROI excessive

production by keratinocytes and inflammatory cells recruited (oxidative burst process) [53]. We evidenced TRPA1 pharmacological blockade reduced the UVB radiation single exposure-mediated ROI production, evaluated through DCF (Fig. 2A), NADPH oxidase activity (Fig. 2B), and H₂O₂ levels (data not shown).

Sensory nerve fibers contribute to TRPA1 mediated-skin inflammation, which may be associated with oxidative stress since ROI and its subproducts may initiate and sustain the neuronal TRPA1 sensitization/activation [50,54]. However, previous studies demonstrated that non-neuronal TRPA1 (cells surroundings sensory nerve fibers) could promote the ROI generation required to activate the neuronal TRPA1 [50,55]. In this sense, ROI production upon UVB exposure could occur by the non-neuronal TRPA1 channel and NADPH oxidase complex interaction, as previously reported [50] since keratinocytes and inflammatory cells (neutrophils and macrophages) co-express TRPA1 and the NADPH oxidase complex [11,50,52,56].

Moreover, ROI produced in the skin after the UVB radiation also modulates the expression of inflammatory cytokines through oxidant-sensitive transcriptional factors activation, such as nuclear factor Kappa B (NF- κ B) [57]. Underlying the interaction between the TRPA1 channel and ROI generation, we investigated whether TRPA1 activation may also regulate the inflammatory cytokines' production, especially MIP-2.

MIP-2 cytokine, a functional analog of IL-8 in humans, is a potent neutrophil chemoattractant and primary nerve fiber sensitizer [5]. IL-8

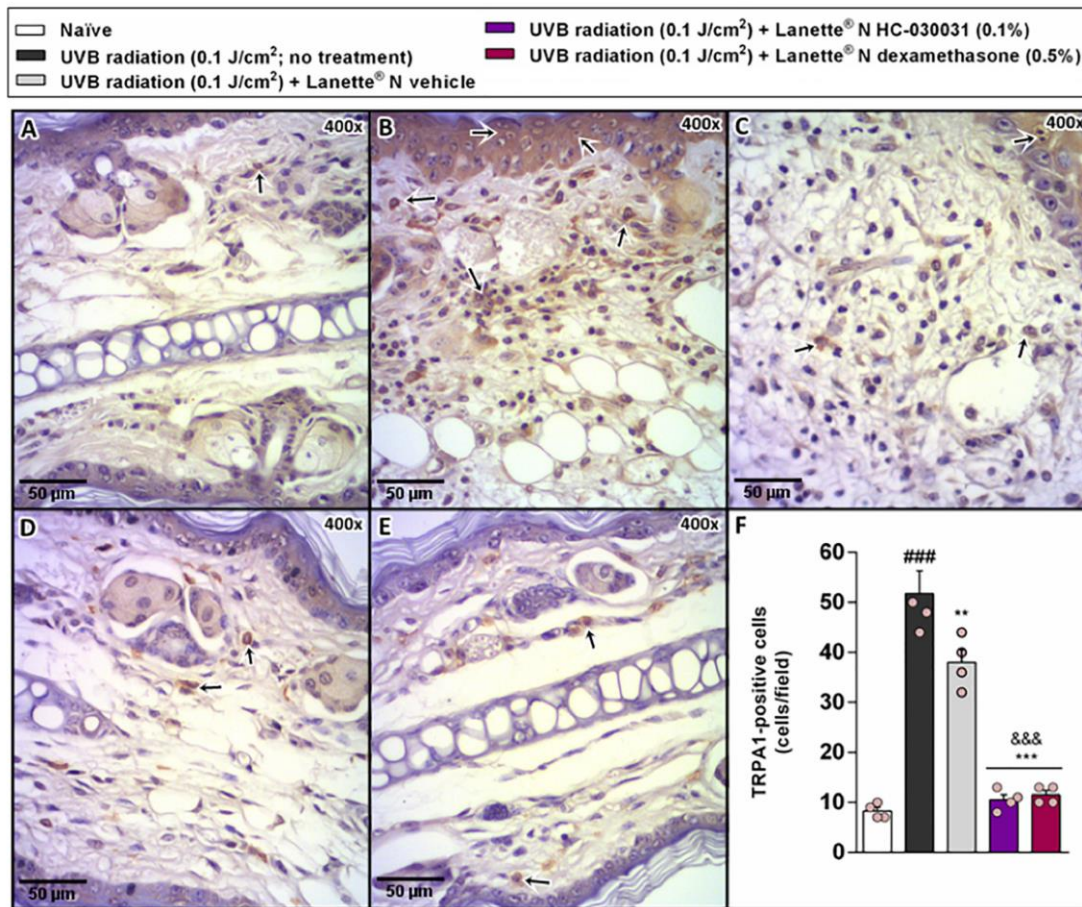


Fig. 5. Effect of TRPA1 pharmacological blockade on the number of TRPA1-immunostained cells in the skin inflammation model induced by repeated exposure to UVB radiation. All formulations (15 mg/ear) were applied immediately after UVB radiation exposure. Representative images of immunohistochemical analysis from (A–E) mice's ears immunohistological sections counterstained with hematoxylin (400 \times) and (f) quantitative analysis of TRPA1-positive cells per field (immunohistological images at 400 \times). Ball symbols from each column denote the different immunohistological slides per group/treatment. Black arrows indicate the presence of TRPA1 immunostained cells into ear tissue (epidermis and dermis). Figure captions represent: (A) Naïve; (B) UVB radiation (0.1 J/cm²; no treatment); (C) UVB radiation (0.1 J/cm²) + Lanette® N vehicle; (D) UVB radiation (0.1 J/cm²) + Lanette® N HC-030031 (0.1%); (E) UVB radiation (0.1 J/cm²) + Lanette® N dexamethasone (0.5%). Each bar represents the mean + S.E.M. for 4 distinct immunohistological slides analyzed/group. Scale bar, 50 μ m. ###p < 0.001 when compared to the naïve group. **p < 0.01 and ***p < 0.001 when compared to the UVB radiation (0.1 J/cm²; no treatment) group. &&&p < 0.001 when compared with UVB radiation (0.5 J/cm²) + Lanette® N vehicle group (one-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test).

is upregulated in keratinocytes and neutrophil recruited upon damaged tissue, which is considered a typical inflammatory stress-response marker [4,7]. We demonstrated that TRPA1 antagonism decreased the MIP-2 levels induced by the UVB radiation single exposure in mice ears (Fig. 1I), corroborating, at least in part, with its effect on the ROI production, inflammatory cells infiltration, and ear edema. Our results agree with previous findings, which show TRPA1 activation leads to the production of the inflammatory cytokines. In contrast, the genetic ablation or the TRPA1 pharmacological antagonism may attenuate this inflammatory response and the cutaneous neurogenic inflammation magnitude [11,18]. However, further studies are needed to detail the molecular pathways involved in the TRPA1-mediated inflammatory and oxidative states induced by UVB radiation.

Repeated exposure to UVB radiation also induces epidermal

hyperproliferation and defective keratinocyte differentiation [58]. PCNA analysis, a cellular proliferation marker, is commonly used to identify the relation between the UVB-induced damage effect and epidermis increment [41,59]. We observed UVB repeated exposure caused epidermal hyperplasia (Fig. 3J) and PCNA-positive cells increase (Fig. 4) (stratum basale), which was reduced by TRPA1 pharmacological blockade, according to previous data [18]. Exposure to UVB radiation increases the cytosolic calcium gradient in stratum basale of the epidermis, which is closely related to permeability barrier abnormalities and epidermal hyperplasia [60]. Besides, UVB radiation promotes TRPA1-mediated calcium influx in *in vitro* studies [23]. Thus, we might suggest the TRPA1 activation could contribute to epidermal hyperplasia induced by UVB radiation exposure.

Growing evidence indicates that TRPA1 acts as an inflammatory

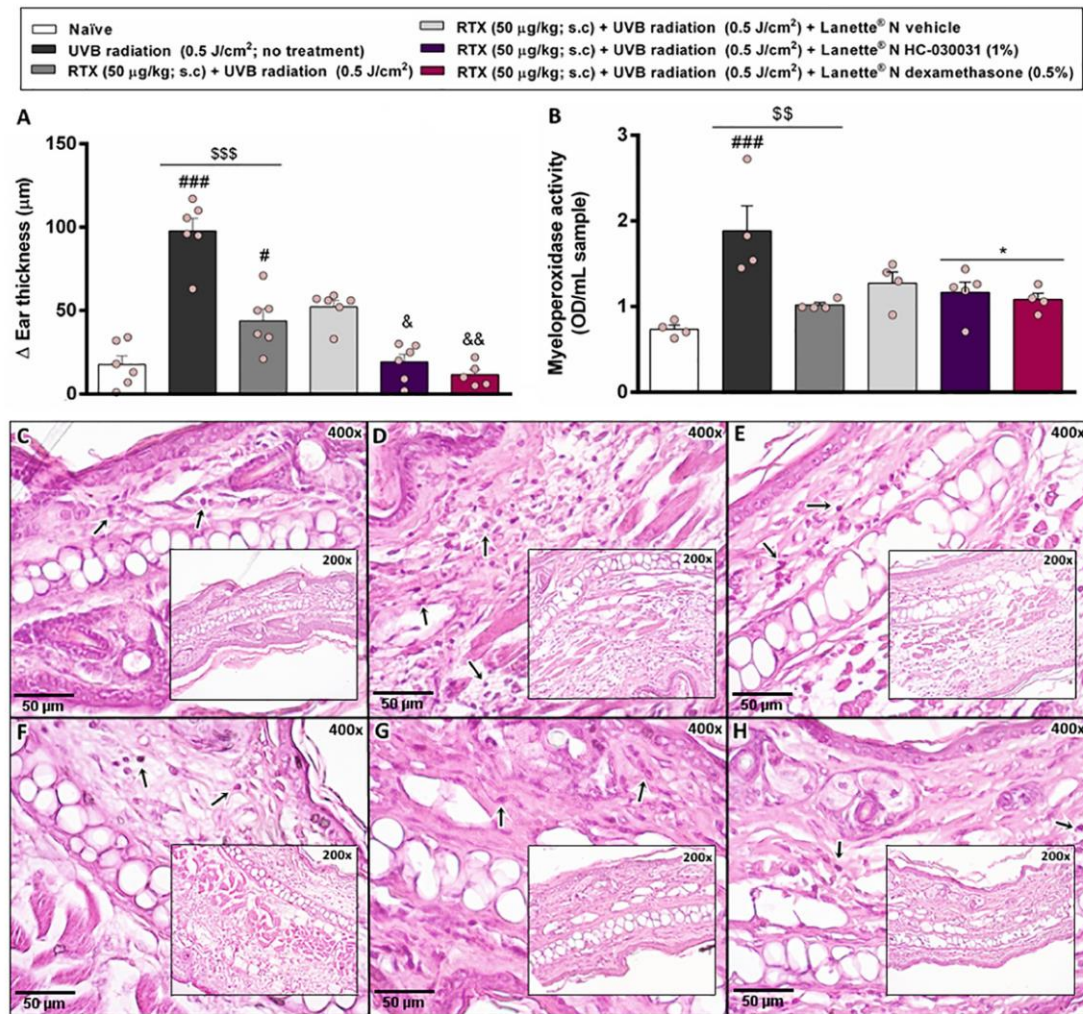
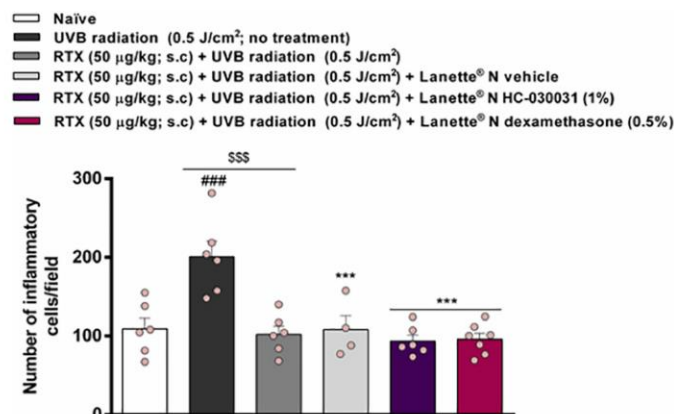


Fig. 6. Effect of TRPA1-positive sensory nerve fibers depletion in the skin inflammation model induced by single exposure to UVB radiation. All formulations (15 mg/ear) were applied immediately after UVB radiation exposure. (A) Ear edema, (B) MPO activity and (C–H) histological changes (hematoxylin-eosin; 200 \times and 400 \times) induced by a single exposure to UVB radiation in RTX-desensitized animals (50 µg/kg; s.c.). Each bar represents the mean + S.E.M. for 5–6 animals/group (A), 4–5 animals/group (B) and 4–7 different histological slides analyzed/group (C–H). Black arrows indicate the presence of inflammatory cells infiltrated into ear tissue. Ball symbols from each column denote the number of animals per group/treatment. Figure captions represent: (C) Naive; (D) UVB radiation (0.5 J/cm²; no treatment); (E) RTX-mice and exposed to UVB radiation (0.5 J/cm²; no treatment); (F) RTX-mice and exposed to UVB radiation (0.5 J/cm²) + Lanette[®] N vehicle; (G) RTX-mice and exposed to UVB radiation (0.5 J/cm²) + Lanette[®] N HC-030031 (1%); (H) RTX-mice and exposed to UVB radiation (0.5 J/cm²) + Lanette[®] N dexamethasone (0.5%). Scale bar, 50 µm. [#]p < 0.05 and ^{###}p < 0.001 when compared with naive group. ^{\$\$}p < 0.01 and ^{\$\$\$}p < 0.001 when compared with UVB radiation (0.5 J/cm²; no treatment) group. [®]p < 0.05 and ^{®®}p < 0.01 when compared with RTX-mice and exposed to UVB radiation (0.5 J/cm²; no treatment) group (one-way ANOVA followed Tukey *post hoc* test).

regulator, including cutaneous inflammatory processes [13,15,19]. In this sense, we recently showed that TRPA1 activation by the topical application of its agonist cinnamaldehyde induced an acute irritant contact dermatitis in mice's ears, with ear edema formation, inflammatory cells infiltration, and inflammatory mediators' release (TNF- α , IL-1 β , and MIP-2). In contrast, the topical treatment with TRPA1 antagonist, HC-030031, reduced all evaluated inflammatory parameters in this skin inflammation model [22]. Besides, recent studies correlated the TRPA1 activation and expressional changes with the

cutaneous inflammation pathogenesis [11,18]. Here, we observed the UVB repeated exposure increased the TRPA1 immunoreactivity in the epidermis and dermis layers, reduced by TRPA1 pharmacological blockade (Fig. 5). Thus, we suggested TRPA1 involvement at multiple sites may play an expressive role in UVB radiation-induced sunburn.

It is well established that UVB radiation leads to the cutaneous inflammation, involving non-neuronal and neuronal pathways [2,10]. Our study has highlighted an essential role of the TRPA1-sensory nerve pathway in skin inflammation induced by UVB radiation exposure.



However, non-neuronal TRPA1 may contribute to some inflammatory parameters observed in this model. Thus, we wonder whether TRPA1-positive cutaneous sensory nerve fibers-desensitization by RTX alters the vascular permeability in the UVB radiation-induced skin inflammation. The systemic RTX treatment is often preferred as a pharmacological tool to desensitize TRPV1⁺ sensory nerves because it presents a higher potency (1000-fold) and tolerance by the animals when compared to TRPV1 agonist capsaicin, besides cause no mortality in animals at lower doses (50 µg/kg) [42,61,62]. Although specific to the TRPV1 channel, the RTX can also defunctionalize other TRPs channels, like TRPA1, co-expressed in TRPV1⁺ neurons [49,50,63]. Indeed, Pecze et al. [61] demonstrated that RTX's chemical denervation eliminated most or all TRPA1-containing neurons since 97% of TRPA1-positive sensory neurons also express TRPV1 [64].

Since RTX-desensitization did not completely abolish mice's ear edema development after UVB single exposure, edema may result from a combination of neurogenic and non-neurogenic mechanisms [10]. It is also worth mentioning that RTX treatment at 50 µg/kg avoids the cytotoxicity dependent/independent on TRPV1 into non-neuronal cells (e.g., keratinocytes, lymphocytes, fibroblasts) [65]; likely due the lower density of TRPV1 expressed in these cells when compared to neuronal cells [42]. In this sense, it is likely that non-neuronal TRPA1, which is also co-expressed with TRPV1 channel in inflammatory and skin cells [66], contributes to the edema development in this skin inflammation model (Fig. 6A). Otherwise, neuronal TRPA1 seems predominantly to mediate the inflammatory cells infiltration upon UVB exposure (Figs. 6B–H and 7). Our results are similar to previous findings, which demonstrated cutaneous sensory fibers depletion reduces the recruitment of the inflammatory cells in the cutaneous inflammation process [67] and that SP released from sensory nerve fibers enhances chemotactic responses of primary neutrophils to MIP-2 [68], which was reduced by TRPA1 blocked.

Additionally, previous studies have already reported that systemic RTX treatment (50 µg/kg) also reduced almost complete the specific immunoreactivity for TRPV1 in sensory nerve fibers [43,61,62]. In this sense, although there may still be nerves fibers (e.g., TRPV1⁺/TRPA1⁻ fibers) remaining after RTX treatment, possibly they are in small quantities. It's suggested that even a small amount of TRPV1⁺/TRPA1⁻ fibers possibly present did not interfere in reducing UVB-induced inflammatory cell infiltration observed after RTX's desensitization, strongly sustaining the neuronal TRPA1 role on inflammatory cells infiltration induced by UVB radiation.

To better elucidate the TRPA1 channel participation in UVB-induced skin inflammation's pathophysiology, future studies could consider using a TRPA1 KO mouse model. Moreover, investigate the

Fig. 7. Effect of TRPA1-positive sensory nerve fibers depletion in the skin inflammation model induced by a single exposure to UVB radiation. Number of inflammatory cells/field (counting from histological images at 200×) induced by a single exposure to UVB radiation in RTX-desensitized animals (50 µg/kg; s.c.). Each bar represents the mean + S.E.M. for 4–7 different histological slides analyzed/group. All formulations (15 mg/ear) were applied immediately after UVB radiation exposure. Ball symbols from each column denote the different histological slides per group/treatment. ### $p < 0.001$ when compared with the naïve group. ^{SS} $p < 0.001$ when compared with UVB radiation (0.5 J/cm²; no treatment) group. *** $p < 0.001$ when compared with UVB radiation (0.5 J/cm²; no treatment) group (one-way ANOVA followed Tukey *post hoc* test).

relationship between the TRPA1 channel and transcriptional pathways (e.g., NF-κB) involved in skin inflammatory processes observed after UVB radiation exposure, it's an attractive away.

5. Conclusion

UVB radiation-induced sunburn model in mice promotes inflammatory, oxidative, and proliferative responses. Thus, we choose this *in vivo* model to demonstrate the neuronal and non-neuronal TRPA1 channel involvement in the induction of these responses since this channel's role in the pathogenesis of several skin inflammatory diseases has already been described. We suggest TRPA1-mediated interaction among cutaneous sensory fibers and resident/inflammatory skin cells with ROI production drive a relevant role in the UVB radiation-induced sunburn.

Overall, our findings strongly support the TRPA1 channel as a molecular target for the development of TRPA1 antagonist molecules-containing semisolid formulations, to establish topical treatment plans to skin inflammatory diseases, including that induced by UVB radiation.

Funding

This study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul-FAPERGS [Grant #17/2551-0001082-5 (Brazil)]; by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq [process #406098/2018-2], and by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior - CAPES/PROEX [#23038.004173/2019-93, Grant: #0493/2019]. SMO is recipient of fellowship from CNPq [process #307220/2017-6]. CC, ESB, IB and NSP are recipient of fellowship from CAPES/PROEX (process #88882.182152/2018-01; process #88882.185973/2018-00; process #88882.182148/2018-01 and process #88882.182128/2018-01).

CRediT authorship contribution statement

Camila Camponogara: Conceptualization, Formal analysis, Methodology, Investigation, Supervision, Validation, Visualization, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Evelyne S. Brum:** Formal analysis, Investigation, Validation, Writing - review & editing. **Natháli S. Pegoraro:** Investigation, Writing - review & editing. **Indiara Brusco:** Investigation, Writing - review & editing. **Fernanda G. Rocha:** Investigation, Writing - review & editing. **Margareth M. Brandenburg:** Investigation, Writing - review & editing. **Daniela A. Cabrini:** Resources, Writing - review & editing. **Unice André:** Resources,

Writing - review & editing. **Gabriela Trevisan**: Resources, Writing - review & editing. **Sara Marchesan Oliveira**: Conceptualization, Funding acquisition, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Writing - original draft, Writing - review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank the professor of the Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry (Federal University of Santa Maria), Vera Morsch, for loaning equipment and all authors for their contribution to this study. We also acknowledge fellowships from CNPq and CAPES.

References

- [1] M. Pasparakis, I. Haase, F.O. Nestle, Mechanisms regulating skin immunity and inflammation, *Nat. Rev. Immunol.* 14 (2014) 289–301, <https://doi.org/10.1038/nri3646>.
- [2] D.M. Lopes, S.B. McMahon, Ultraviolet radiation in the skin: a painful experience? *CNS Neurosci Ther* 22 (2016) 118–126, <https://doi.org/10.1111/cns.12444>.
- [3] A. Svobodová, A. Zdarilová, J. Vostálová, *Lonicera caerulea* and *Vaccinium myrtilloides* fruit polyphenols protect HaCaT keratinocytes against UVB-induced phototoxic stress and DNA damage, *J. Dermatol. Sci.* 56 (2009) 196–204, <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2009.08.004>.
- [4] X. Ren, Y. Shi, D. Zhao, M. Xu, X. Li, Y. Dang, X. Ye, Naringin protects ultraviolet B-induced skin damage by regulating p38 MAPK signal pathway, *J. Dermatol. Sci.* 82 (2016) 106–114, <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2015.12.008>.
- [5] S.C. Tang, P.Y. Liao, S.J. Hung, J.S. Ge, S.M. Chen, J.C. Lai, Y.P. Hsiao, J.H. Yang, Topical application of glycolic acid suppresses the UVB induced IL-6, IL-8, MCP-1 and COX-2 inflammation by modulating NF- κ B signaling pathway in keratinocytes and mice skin, *J. Dermatol. Sci.* 86 (2017) 238–248, <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.03.004>.
- [6] J.Y. Baek, S. Park, J. Park, J.Y. Jang, S.B. Wang, S.R. Kim, H.A. Woo, K.M. Lim, T.S. Chang, Protective role of mitochondrial peroxiredoxin III against UVB-induced apoptosis of epidermal keratinocytes, *J. Invest. Dermatol.* 137 (2017) 1333–1342, <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.01.027>.
- [7] J.V. Gruber, R. Holtz, S.I. Yang, *In vitro* examination of an oleosome-based sun protection product on the influence of UVB-induced inflammation markers in human epidermal skin equivalent tissue model, *J. Photochem. Photobiol. B* 179 (2018) 39–45, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.12.023>.
- [8] T.L.C. Cezar, R.M. Martinez, C. Rocha, C.P.B. Melo, D.L. Vale, S.M. Borghi, V. Fattori, J.A. Vignoli, D. Camillos-Neto, M.M. Baracat, S.R. Georgetti, W.A. Verri Jr., R. Casagrande, Treatment with maresin 1, a docosahexaenoic acid-derived pro-resolution lipid, protects skin from inflammation and oxidative stress caused by UVB irradiation, *Sci. Rep.* 9 (2019) 3062, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39584-6>.
- [9] B. Park, E. Hwang, S.A. Seo, J.G. Cho, J.E. Yang, T.H. Yi, *Eucalyptus globulus* extract protects against UVB-induced photoaging by enhancing collagen synthesis via regulation of TGF- β /Smad signals and attenuation of AP-1, *Arch. Biochem. Biophys.* 637 (2019) 31–39, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.11.007>.
- [10] F. La Russa, D.M. Lopes, C. Hobbs, F. Argunhan, S. Brain, S. Bevan, D.L.H. Bennett, S.B. McMahon, Disruption of the sensory system affects sterile cutaneous inflammation *in vivo*, *J. Invest. Dermatol.* 139 (2019) 1936–1945, <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.01.037>.
- [11] O. Gouin, K. L'Herondelle, N. Lebonvallet, C. Le Gall-Ianotto, M. Sakka, V. Buhé, E. Plée-Gautier, J.L. Carré, L. Lefevre, L. Misery, TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation: pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization, *Protein Cell* 8 (2017) 644–661, <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0395-5>.
- [12] J.E. Choi, A. Di Nardo, Skin neurogenic inflammation, *Semin. Immunopathol.* 40 (2018) 249–259, <https://doi.org/10.1007/s00281-018-0675-z>.
- [13] R. Atoyán, D. Shander, N.V. Botchkareva, Non-neuronal expression of transient receptor potential type A1 (TRPA1) in human skin, *J. Invest. Dermatol.* 129 (2009) 2312–2315, <https://doi.org/10.1038/jid.2009.58>.
- [14] A. Parenti, F. De Logu, P. Geppetti, S. Benemei, What is the evidence for the role of TRP channels in inflammatory and immune cells? *Br. J. Pharmacol.* 173 (2016) 953–969, <https://doi.org/10.1111/bph.13392>.
- [15] M.M. Norões, L.G. Santos, E.C. Gavioli, V.P.S. Rachetti, M.F. Otuki, D.A. Cabrini, A.S. Prudente, J.R.J.M. Oliveira, M.C. Gonçalves, J. Ferreira, D. Preti, F. De Logu, R. Nassini, E. André, Role of TRPA1 receptors in skin inflammation induced by volatile chemical irritants in mice, *Eur. J. Pharmacol.* 858 (2019) 172460, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172460>.
- [16] M. Trevisani, J. Stemann, S. Materazzi, D.M. Bautista, R. Nassini, B. Campi, N. Imamachi, E. André, R. Patacchini, G.S. Cottrell, R. Gatti, A.I. Basbaum, N.W. Bunnett, D. Julius, P. Geppetti, 4-hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1, *PNAS* 104 (2007) 13519–13524, <https://doi.org/10.1073/pnas.0705923104>.
- [17] Y. Sawada, H. Hosokawa, K. Matsumura, S. Kobayashi, Activation of transient receptor potential ankyrin 1 by hydrogen peroxide, *Eur. J. Neurosci.* 27 (2008) 1131–1142, <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06093.x>.
- [18] Y. Zhou, D. Han, T. Follansbee, X. Wu, S. Yu, B. Wang, Z. Shi, D.T. Domocos, M. Carstens, E. Carstens, S.T. Hwang, Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) positively regulates imiquimod-induced, psoriasisform dermal inflammation in mice, *J. Cell. Mol. Med.* 23 (2019) 4819–4828, <https://doi.org/10.1111/jcmm.14392>.
- [19] C.R. Silva, S.M. Oliveira, M.F. Rossato, G.D. Dalmolin, G.P. Guerra, A.S. Prudente, D.A. Cabrini, M.F. Otuki, E. André, J. Ferreira, The involvement of TRPA1 channel activation in the inflammatory response evoked by topical application of cinnamaldehyde to mice, *Life Sci.* 88 (2011) 1077–1087, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.03.017>.
- [20] J. Kang, Y. Ding, B. Li, H. Liu, X. Yang, M. Chen, TRPA1 mediated aggravation of allergic contact dermatitis induced by DINP and regulated by NF- κ B activation, *Sci. Rep.* 7 (2017) 43586, <https://doi.org/10.1038/srep43586>.
- [21] C.K.T. Michael, The pivotal role of transient receptor potential (TRP) ion channels in the pathogenesis of sensitive skin, *Res J. Nerv. Syst.* 1 (2017) 1–7.
- [22] C. Camponogara, R. Casoti, I. Brusco, M. Piana, A.A. Boligon, D.A. Cabrini, G. Trevisan, J. Ferreira, C.R. Silva, S.M. Oliveira, *Tabernaemontana catharinensis* leaves exhibit topical anti-inflammatory activity without causing toxicity, *J. Ethnopharmacol.* 231 (2019) 205–216, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.11.021>.
- [23] M.F.P. Fialho, E.S. Brum, N.S. Pegoraro, A.C.G. Couto, G. Trevisan, L. Cruz, S.M. Oliveira, Topical transient receptor potential ankyrin 1 antagonist treatment attenuates nociception and inflammation in an ultraviolet B radiation-induced burn model in mice, *J. Dermatol. Sci.* 97 (2020) 135–142, <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2020.01.005>.
- [24] K. Hill, M. Schaefer, Ultraviolet light and photosensitising agents activate TRPA1 via generation of oxidative stress, *Cell Calcium* 45 (2009) 155–164, <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2008.08.001>.
- [25] C. Camponogara, R. Casoti, I. Brusco, M. Piana, A.A. Boligon, D.A. Cabrini, G. Trevisan, J. Ferreira, C.R. Silva, S.M. Oliveira, *Tabernaemontana catharinensis* leaves effectively reduce the irritant contact dermatitis by glucocorticoid receptor-dependent pathway in mice, *Biomed. Pharmacother.* 109 (2019) 646–657, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.132>.
- [26] M. Kucharekova, P.C.M. Van De Kerkhof, P.G.M. Van Der Valk, A randomized comparison of a emollient containing skin-related lipids with a petrolatum-based emollient as adjunct in the treatment of chronic hand dermatitis, *Contact Dermatitis* 48 (2003) 293–299, <https://doi.org/10.1034/j.1600-0536.2003.00119.x>.
- [27] K. Sakai, K.M. Sanders, M.R. Youssef, K.M. Yanusheski, L. Jensen, G. Yosipovitch, T. Akiyama, Mouse model of imiquimod-induced psoriatic itch, *Pain* 157 (2016) 2536–2543, <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000674>.
- [28] Z. Xu, Z. Qin, J. Zhang, Y. Wang, Microglia-mediated chronic psoriatic itch induced by imiquimod, *Mol. Pain* 16 (2020) 1–4, <https://doi.org/10.1177/1744806920934998>.
- [29] C.T.D. Antoniazzi, S.D.T. Prá, P.R. Ferro, M.A. Arnoldi, G. Adamante, A.S. Almeida, C. Camponogara, C.R. Silva, G.S. De Bem, P.C.L. Silveira, S.M. Oliveira, F.K. Rigo, F. De Logu, R. Nassini, G. Trevisan, Topical treatment with a transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) antagonist reduced nociception and inflammation in a thermal lesion model in rats, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 125 (2018) 28–38, <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.09.012>.
- [30] J.C. McGrath, E. Lilley, Implementing guidelines on reporting research using animals (ARRIVE etc.): new requirements for publication in *BJP*, *Br. J. Pharmacol.* 172 (2015) 3189–3193, <https://doi.org/10.1111/bph.12955>.
- [31] N.S. Pegoraro, C. Camponogara, M. Gehrcke, L.M. Giuliani, D.T. Silva, L.H. Maurer, P. Dias, T. Emanuelli, L. Cruz, S.M. Oliveira, Oleic acid-containing semisolid dosage forms exhibit *in vivo* anti-inflammatory effect via glucocorticoid receptor in a UVB radiation-induced skin inflammation model, *Inflammopharmacology* 28 (2020) 773–786, <https://doi.org/10.1007/s10787-019-00675-5>.
- [32] S.P. Divya, X. Wang, P. Pratheeshkumar, Y.O. Son, R.V. Roy, D. Kim, J. Dai, J.A. Hiltrom, L. Wang, P. Asha, X. Shi, Z. Zhang, Blackberry extract inhibits UVB-induced oxidative damage and inflammation through MAP kinases and NF- κ B signalling pathways in SKH-1 mice skin, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 284 (2016) 92–99, <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.02.003>.
- [33] B.O. Cho, D.N. Che, J.Y. Shin, H.J. Kang, S.I. Jang, Ameliorative effects of fruit stem extract from Muscat Bailey A against chronic UV-induced skin damage in BALB/c mice, *Biomed. Pharmacother.* 97 (2018) 1680–1688, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.12.003>.
- [34] M.C.L. Marchiori, C. Rigon, C. Camponogara, S.M. Oliveira, L. Cruz, Hydrogel containing silibinin-loaded pomegranate oil based nanocapsules exhibits anti-inflammatory effects on skin damage UVB radiation-induced in mice, *J. Photochem. Photobiol. B* 170 (2017) 25–32, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.03.015>.
- [35] N.S. Pegoraro, A.V. Barbieri, C. Camponogara, J. Mattiazzi, E.S. Brum, M.C.L. Marchiori, S.M. Oliveira, L. Cruz, Nanoencapsulation of coenzyme Q10 and vitamin E acetate protects against UVB radiation-induced skin injury in mice, *Colloids Surf B Biointerfaces* 150 (2017) 32–40, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.11.013>.
- [36] C. Camponogara, C.R. Silva, I. Brusco, M. Piana, H. Faccin, L.M. Carvalho, A. Schuch, G. Trevisan, S.M. Oliveira, *Nasturtium officinale* R. Br. effectively reduces the skin inflammation induced by croton oil via glucocorticoid receptor-dependent and NF- κ B pathways without causing toxicological effects in mice, *J. Ethnopharmacol.* 229 (2019) 190–204, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.10.011>.
- [37] S.L. Hempel, G.R. Buettner, Y.Q. O'Malley, D.A. Wessels, D.M. Flaherty, Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-

- dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123, *Free Radic. Biol. Med.* 27 (1999) 146–159, [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00061-1](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00061-1).
- [38] S. Vandresen-Filho, W.C. Martins, D.B. Bertoldo, G. Mancini, B.A. Herculano, A.F. De Bem, C.I. Tasca, Atorvastatin prevents cell damage via modulation of oxidative stress, glutamate uptake and glutamine synthetase activity in hippocampal slices subjected to oxygen/glucose deprivation, *Neurochem. Int.* 62 (2013) 948–955, <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.03.002>.
- [39] S.C. Leary, B.C. Hill, C.N. Lyons, C.G. Carlson, D. Michaud, C.S. Kraft, K. Kenton, D.M. Glerum, C.D. Moyes, Chronic treatment with azide *in situ* leads to an irreversible loss of cytochrome c oxidase activity via holoenzyme dissociation, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 11321–11328, <https://doi.org/10.1074/jbc.M112303200>.
- [40] M.F. Rossato, C. Hoffmeister, R. Tonello, A.P.O. Ferreira, J. Ferreira, Anti-inflammatory effects of vitamin E on adjuvant-induced arthritis in rats, *Inflammation* 38 (2015) 606–615, <https://doi.org/10.1007/s10753-014-9967-1>.
- [41] C.D.S. Horinouchi, D.A.G.B. Mendes, S. Nolte, P.S. Britto, B.S. Soley, G.M. Favero, V.A. Facundo, A.R.S. Santos, D.A. Cabrini, M.F. Otuki, Anti-proliferative and anti-inflammatory effects of 3 β ,6 β ,16 β -Trihydroxylup-20(29)-ene on cutaneous inflammation, *J. Ethnopharmacol.* 195 (2017) 298–308, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.11.035>.
- [42] J. Kun, Z. Helyes, A. Perkecz, Á. Bán, B. Polgár, J. Szolcsányi, E. Pintér, Effect of surgical and chemical sensory denervation on non-neural expression of the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptors in the rat, *J. Mol. Neurosci.* 48 (2012) 795–803, <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9766-9>.
- [43] G. Trevisan, M.F. Rossato, C.I.B. Walker, J.Z. Klafke, F. Rosa, S.M. Oliveira, R. Tonello, G.P. Guerra, A.A. Boligon, R.B. Zanon, M.L. Athayde, J. Ferreira, Identification of the plant steroid α -spinasterol as a novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist with antinociceptive properties, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 343 (2012) 258–269, <https://doi.org/10.1124/jpet.112.195909>.
- [44] R. Nassini, S. Materazzi, J. Vriens, J. Prenen, S. Benemei, G. De Siena, G. La Marca, E. André, D. Preti, C. Avonto, L. Sadošky, V. Di Marzo, L. De Petrocellis, G. Dussor, F. Porreca, O. Tagliatalata-Scafati, G. Appendino, B. Niluis, P. Geppetti, The ‘headache tree’ via umbellulone and TRPA1 activates the trigeminovascular system, *Brain* 135 (2012) 376–390, <https://doi.org/10.1093/brain/awr272>.
- [45] S. Abbas, S. Alam, A. Pal, M. Kumar, D. Singh, K.M. Ansari, UVB exposure enhanced benzanthrone-induced inflammatory responses in SKH-1 mouse skin by activating the expression of COX-2 and iNOS through MAP kinases/NF- κ B/AP-1 signalling pathways, *Food Chem. Toxicol.* 96 (2016) 183–190, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.07.034>.
- [46] X. Xiao, H. Xie, D. Jian, Y. Deng, X. Chen, J. Li, Rebounding triad (severe itching, dryness and burning) after facial corticosteroid discontinuation defines a specific class of corticosteroid-dependent dermatitis, *J. Dermatol.* 42 (2015) 697–702, <https://doi.org/10.1111/1346-8138.12877>.
- [47] N. Tiraravesti, S. Yakaew, R. Rukhchay, W. Luangbudnark, C. Viennet, P. Humbert, J. Viyoch, *Artocarpus altilis* heartwood extract protects skin against UVB *in vitro* and *in vivo*, *J. Ethnopharmacol.* 175 (2015) 153–162, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.09.023>.
- [48] A.A. Aubdool, X. Kodji, N. Abdul-Kader, R. Heads, E.S. Fernandes, S. Bevan, S.D. Brain, TRPA1 activation leads to neurogenic vasodilation: involvement of reactive oxygen nitrogen species in addition to CGRP and NO, *Br. J. Pharmacol.* 173 (2016) 2419–2433, <https://doi.org/10.1111/bph.13519>.
- [49] R. Nassini, P. Pedretti, N. Moretto, C. Fusi, C. Carnini, F. Facchinetti, A.R. Viscomi, A.R. Pisano, S. Stokesberry, C. Brunmark, N. Svitacheva, L. McGarvey, R. Patacchini, A.B. Damholt, P. Geppetti, S. Materazzi, Transient receptor potential ankyrin 1 channel localized to non-neuronal airway cells promotes non-neurogenic inflammation, *PLoS One* 7 (2012) e42454, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042454>.
- [50] F. De Logu, R. Nassini, S. Materazzi, M.C. Gonçalves, D. Nosi, D.R. Degl’Innocenti, I.M. Marone, J. Ferreira, S. Li Puma, S. Benemei, G. Trevisan, D.S.M. Araújo, R. Patacchini, N.W. Bunnett, P. Geppetti, Schwann cells TRPA1 mediates neuroinflammation that sustains macrophage-dependent neuropathic pain in mice, *Nat. Commun.* 8 (2017) 1887, <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01739-2>.
- [51] T.M. Cunha, W.A. Verri Jr., I.R. Schivo, M.H. Napimoga, C.A. Parada, S. Poole, M.M. Teixeira, S.H. Ferreira, F.Q. Cunha, Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception, *J. Leukoc. Biol.* 83 (2008) 824–832, <https://doi.org/10.1189/jlb.0907654>.
- [52] A.T. Billeter, N. Galbraith, S. Walker, C. Lawson, S.A. Gardner, H. Sarojini, S. Galandiuk, H.C. Polk Jr., TRPA1 mediates the effects of hypothermia on the monocyte inflammatory response, *Surgery* 158 (2015) 646–654, <https://doi.org/10.1016/j.surg.2015.03.065>.
- [53] R.M. Martinez, A.L.M. Ivan, D.L. Vale, M.Z. Campanini, V.S. Ferreira, V.S. Steffen, F.T.M.C. Vicentini, F.M.P. Vilela, M.J.V. Fonseca, M.M. Baracat, S.R. Georgetti, W.A. Verri Jr., R. Casagrande, Topical emulsion containing pyrrolidone dithiocarbamate: effectiveness against ultraviolet B irradiation-induced injury of hairless mouse skin, *J. Pharm. Pharmacol.* 70 (2018) 1461–1473, <https://doi.org/10.1111/jphp.12997>.
- [54] G. Trevisan, S. Benemei, S. Materazzi, F. De Logu, G. De Siena, C. Fusi, M.F. Rossato, E. Coppi, I.M. Marone, J. Ferreira, P. Geppetti, R. Nassini, TRPA1 mediates trigeminal neuropathic pain in mice downstream of monocytes/macrophages and oxidative stress, *Brain* 139 (2016) 1361–1377, <https://doi.org/10.1093/brain/aww038>.
- [55] F. De Logu, S. Li Puma, L. Landini, F. Portelli, A. Innocenti, D.S.M. Araújo, M.N. Janal, R. Patacchini, N.W. Bunnett, P. Geppetti, R. Nassini, Schwann cells expressing nociceptive TRPA1 orchestrate ethanol-evoked neuropathic pain in mice, *J. Clin. Invest.* 129 (2019) 5424–5441, <https://doi.org/10.1172/JCI128022>.
- [56] A. Glady, M. Tanaka, C.S. Moniaga, M. Yasui, M. Hara-Chikuma, Involvement of NADPH oxidase 1 in UVB-induced cell signaling and cytotoxicity in human keratinocytes, *Biochem Biophys Rep* 14 (2018) 7–15, <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2018.03.004>.
- [57] M.Z. Campanini, F.A. Pinho-Ribeiro, A.L.M. Ivan, V.S. Ferreira, F.M.P. Vilela, F.T.M.C. Vicentini, R.M. Martinez, A.C. Zarpelon, M.J. Fonseca, T.J. Faria, M.M. Baracat, W.A. Verri Jr., S.R. Georgetti, R. Casagrande, Efficacy of topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract against UVB-induced oxidative stress and inflammation, *J. Photochem. Photobiol. B* 127 (2013) 153–160, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.08.007>.
- [58] Y. Kim, S.K. Lee, S. Bae, H. Kim, Y. Park, N.K. Chu, H.R. Kim, Y.I. Hwang, J.S. Kang, W.J. Lee, The anti-inflammatory effect of alloferon on UVB-induced skin inflammation through the down-regulation of pro-inflammatory cytokines, *Immunol. Lett.* 149 (2013) 110–118, <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2012.09.005>.
- [59] J.O. Moore, S.R. Palep, R.N. Saladi, D. Gao, Y. Wang, R.G. Phelps, M.G. Lebwohl, H. Wei, Effects of ultraviolet B exposure on the expression of proliferating cell nuclear antigen in murine skin? *Photochem. Photobiol.* 80 (2004) 587–595, <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2004.tb00134.x>.
- [60] S.J. Jiang, A.W. Chu, Z.F. Lu, M.H. Pan, D.F. Che, X.J. Zhou, Ultraviolet B-induced alterations of the skin barrier and epidermal calcium gradient, *Exp. Dermatol.* 16 (2007) 985–992, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2007.00619.x>.
- [61] L. Pecze, P. Pelsóczy, M. Kecskés, Z. Winter, A. Papp, K. Kaszás, T. Letoha, C. Vizler, Z. Oláh, Resiniferatoxin mediated ablation of TRPV1 + neurons removes TRPA1 as well, *Can J Neurol Sci* 36 (2009) 234–241, <https://doi.org/10.1017/s0317167100006600>.
- [62] C. Gewehr, M.A. Silva, G.S. Trevisan, M.F. Rossato, S.M. Oliveira, C.C. Drewes, A.M. Pazini, G.P. Guerra, M.A. Rubin, J. Ferreira, Contribution of peripheral vanilloid receptor to the nociception induced by injection of spermine in mice, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 99 (2011) 775–781, <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.07.002>.
- [63] Á. Kemény, X. Kodji, S. Horváth, R. Komlódi, É. Szöke, Z. Sándor, A. Perkecz, C. Gyömörei, G. Sétáló, B. Kelemen, T. Bíró, B. István, S.D. Brain, E. Pintér, R. Gyulai, TRPA1 acts in a protective manner in imiquimod-induced psoriasisiform dermatitis in mice, *J Invest Dermatol* 138 (2018) 1774–1784, <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.02.040>.
- [64] V. Spahn, C. Stein, C. Zöllner, Modulation of transient receptor vanilloid 1 activity by transient receptor potential ankyrin 1, *Mol. Pharmacol.* 85 (2014) 335–344, <https://doi.org/10.1124/mol.113.088997>.
- [65] L. Pecze, K. Szabó, M. Széll, K. Jósavay, K. Kaszás, E. Kúsz, T. Letoha, J. Prorok, I. Koncz, A. Tóth, L. Kemény, C. Vizler, Z. Oláh, Human keratinocytes are vanilloid resistant, *PLoS One* 3 (2008) e3419, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003419>.
- [66] E.S. Fernandes, M.A. Fernandes, J.E. Keeble, The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves, *Br. J. Pharmacol.* 166 (2012) 50–521, <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01851.x>.
- [67] L. Riol-Blanco, J. Ordovas-Montanes, M. Perro, E. Naval, A. Thiriot, D. Alvarez, S. Paust, J.N. Wood, U.H. von Andrian, Nociceptive sensory neurons drive interleukin-23 mediated psoriasisiform skin inflammation, *Nature* 510 (2014) 157–161, <https://doi.org/10.1038/nature13199>.
- [68] J. Sun, R.D. Ramnath, M. Bhatia, Neuropeptide substance P upregulates chemokine and chemokine receptor expression in primary mouse neutrophils, *Am J Physiol Cell Physiol* 293 (2007) C696–C704, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00060.2007>.

6 ARTIGOS CIENTÍFICOS

6.2 ARTIGO CIENTÍFICO 2

Inflammopharmacology (2021) 29:879–895
<https://doi.org/10.1007/s10787-021-00802-1>

Inflammopharmacology

ORIGINAL ARTICLE



Diosmetin, a novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist, alleviates the UVB radiation-induced skin inflammation in mice

Camila Camponogara¹ · Evelyn S. Brum¹ · Natháli S. Pegoraro¹ · Indiara Brusco¹ · Natália Brucker² · Sara Marchesan Oliveira^{1,3}

Received: 15 October 2020 / Accepted: 6 March 2021 / Published online: 22 March 2021
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2021

Abstract

UVB radiation-mediated inflammation and the oxidative process involve the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channel activation in neuronal and non-neuronal cells. Once diosmetin has been identified as a novel TRPV1 antagonist, we evaluated the action of diosmetin from the inflammatory [ear oedema, myeloperoxidase (MPO) activity, histological changes, and cytokines levels] and oxidative [nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase and SOD activities] parameters in mice exposed to UVB radiation (0.5 j/cm²). We also verified the action of diosmetin on UVB radiation-induced inflammatory parameters after cutaneous nerve fibers denervation by RTX (50 µg/kg s.c.). The topical treatment with the novel TRPV1 antagonist, diosmetin (1%; 15 mg/ear), reduced ear oedema, MPO activity, and MIP-2 and IL-1β cytokines levels by 82 ± 8%, 59 ± 10%, 40 ± 12%, and 85 ± 9%, respectively. The action of diosmetin on ear oedema and inflammatory cell infiltration was histologically confirmed. Topical diosmetin (1%) also reduced NADPH oxidase activity by 67 ± 10% and reverted SOD activity by 81 ± 13%. After cutaneous nerve fibers denervation using RTX, diosmetin reduced ear oedema, but not the inflammatory cell infiltration in mice exposed to UVB radiation. Diosmetin can be a promising molecule against skin inflammatory disorders as a result of sunburn induced by UVB radiation exposure.

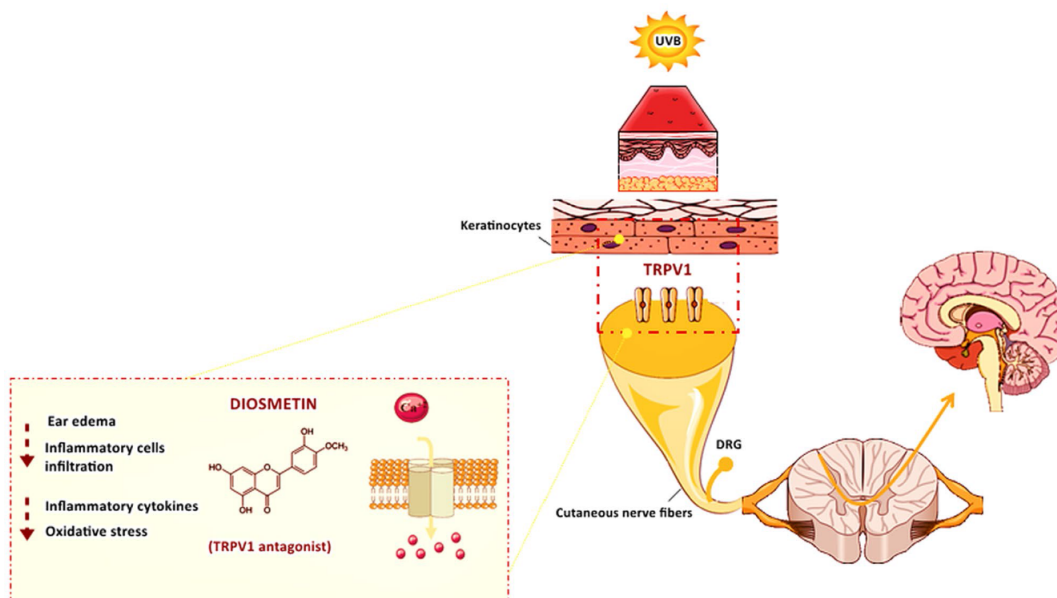
✉ Sara Marchesan Oliveira
saramarchesan@hotmail.com; saramarchesan@ufsm.br

¹ Laboratory Neurotoxicity and Psychopharmacology, Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

² Graduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

³ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Santa Maria, Av. Roraima 1000, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

Graphical abstract



Keywords Ultraviolet radiation · Sunburn · Oxidative stress · TRP channels · Diosmetin · Resiniferatoxin

Abbreviations

ANOVA	Analysis of variance
BSA	Serum albumin
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
Dexa 0.5%	0.5% Dexamethasone
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
HCl	Hydrochloric acid
HTAB	Hexadecyl trimethylammonium bromide
IL-1 β	Interleukin 1 β
i.p	Intraperitoneal
MIP-2	Protein inflammatory macrophage 2
MPO	Myeloperoxidase
Na ₂ CO ₃	Sodium carbonate
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NaOH	Sodium hydroxide
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
OD	Optical density
PMSF	Phenylmethane sulfonyl fluoride
ROS	Reactive oxygen species
RTX	Resiniferatoxin
SEM	Standard error of the mean
SP	Substance P

TRP	Potential transient receptor
TRPV1	Potential transient receptor vanilloid 1
UI	International units
UVB	Ultraviolet type B

Introduction

Ultraviolet type B (UVB) radiation is the main active constituent of sunlight responsible for sunburn-induced skin damage (Lopes and McMahon 2016; Cho et al. 2017). Brazil is located in a geographical region with intense solar irradiation, leading to a high risk of developing skin burns, early photoaging, and skin cancer (melanoma and non-melanoma) (Urasaki et al. 2016).

Glucocorticoids are commonly used to treat UVB-induced sunburn. However, these drugs often lack durable effectiveness, and their uncontrolled use may cause adverse effects and exacerbate skin problems (Lopes and McMahon 2016). Thus, understanding the molecular mechanisms underlying UVB-induced sunburn becomes crucial for developing novel and promising therapies.

UVB radiation exposure triggers skin inflammation, characterised by erythema, vasodilation (oedema formation), and

inflammatory cell infiltration (Pegoraro et al. 2017). Sunburn induced by UVB radiation exposure is also associated with the increased production of reactive oxygen species (ROS) and the depletion of endogenous antioxidant reserves (Martínez et al. 2017). In this sense, the oxidative stress process supports the initiation and amplification of the inflammatory process upon UVB radiation exposure (Saito et al. 2018).

Although the interaction between inflammatory and resident cells in the skin contributes to the pathophysiology of inflammatory skin diseases, the cutaneous sensory nerve fibers can also modulate the inflammatory response under a process known as neurogenic skin inflammation, which involves the activation of transient receptor potential (TRP) channels in afferent nerve endings (Gouin et al. 2017; Choi and Nardo 2018).

The transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) is a calcium-permeable non-selective cation channel that is also expressed by non-neuronal cells (occurs in keratinocytes, fibroblasts, mast cells, and neutrophils) (Gouin et al. 2017). Previous studies demonstrated the role of the TRPV1 channel in the inflammatory process and oxidative stress induced by UVB radiation exposure (Lee et al. 2009, 2011; Huang et al. 2019). However, no study has detailed the role of neuronal and non-neuronal TRPV1 on the inflammatory process (Caterina and Pang 2016), including those induced by UVB radiation exposure. Thereby, it is crucial to clarify the involvement of both neuronal and non-neuronal systems underlying sunburns induced by UVB radiation exposure. In this sense, the TRPV1 channel appears as an essential target for the study.

Understanding the mechanisms involved in sunburns induced by UVB exposure allows us to search for a potential new antagonist to treat this type of inflammatory condition. Diosmetin (3', 5,7-trihydroxy-4'-methoxy flavone; aglycone of diosmin flavonoid. Figure 1), a novel TRPV1 antagonist (Adamante et al. 2019), commonly found in citrus fruits, *Acacia farnesiana* Wild legumes, and several plant species (Domínguez et al. 2011; Adamante et al. 2019), possess anti-inflammatory and antioxidant properties, including in skin inflammation models (Domínguez et al. 2011; Yang et al. 2017). However, until now, no study has reported the potential topical anti-inflammatory and antioxidant of diosmetin on sunburn induced by UVB radiation exposure in mice. Thus, discovering novel and promising molecules with action against UVB radiation-induced skin inflammation allows new approaches and alternatives for the pharmaceutical companies regarding the potential therapies development for UVB-radiation-induced sunburn.

Materials and methods

Chemicals

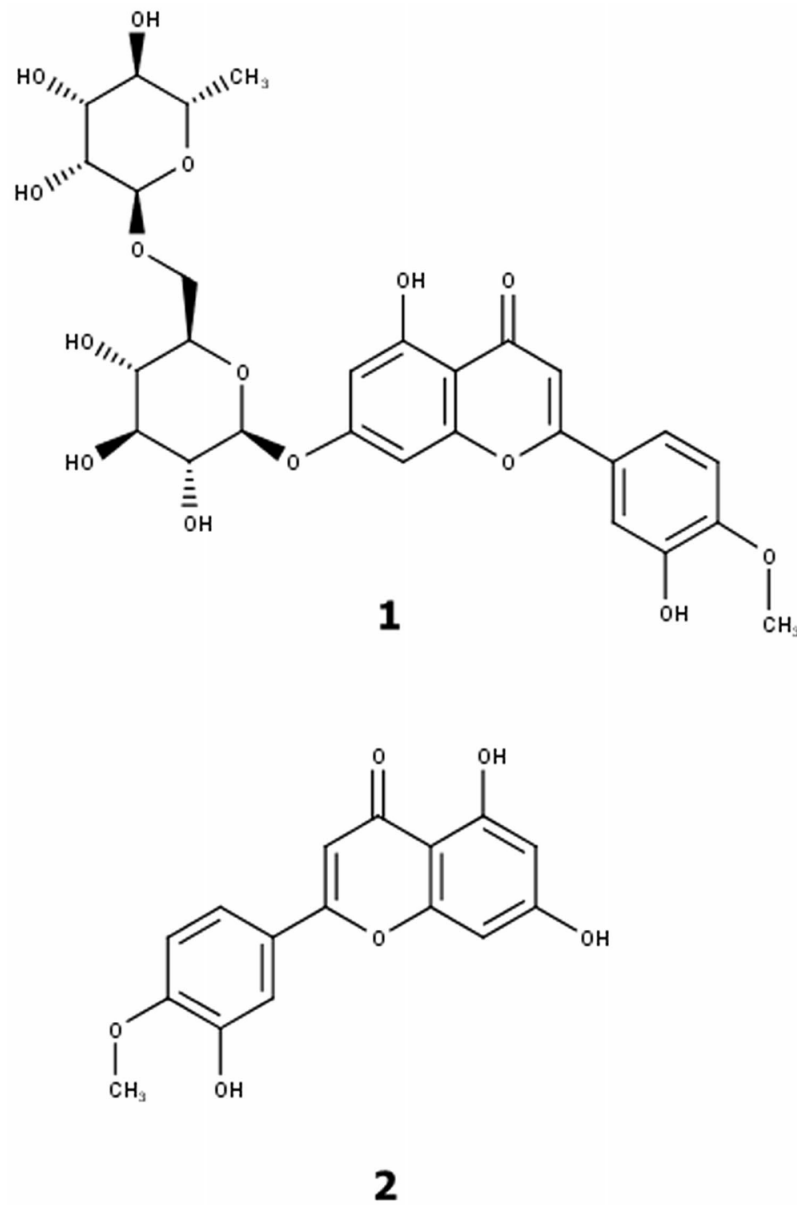
All reagents used were of analytical grade. Hematoxylin–eosin and paraffin were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Hexadecyl trimethylammonium bromide (HTAB), tetramethylbenzidine (TMB), diosmetin, dexamethasone, capsaicin, resiniferatoxin (RTX), epinephrine, tween[®]20, tween[®]80, monobasic sodium phosphate, dibasic sodium phosphate, phenylmethane sulfonyl fluoride (PMSF), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), sodium hydroxide (NaOH), sodium carbonate (Na₂CO₃), base trisma, dimethyl sulfoxide (DMSO), and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA). Isoflurane (Baxter, Sao Paulo, Brazil), xylazine (Syntecvet, Sao Paulo, Brazil), ketamine (Syntecvet, Sao Paulo, Brazil), sodium acetate, absolute ethanol, methanol, acetic acid, hydrochloric acid (HCl) and formaldehyde (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) were used. Lanette[®] base cream was purchased from Nova Derme (Santa Maria, Brazil). Enzyme-linked immunoassay kit for macrophage inflammatory protein (MIP)-2 and interleukin (IL)-1 β were purchased from Peprotech (Sao Paulo, Brazil).

Treatments

We acquired diosmetin and dexamethasone separately and incorporated both substances into the Lanette[®] base cream (used as a vehicle; 15 mg/ear) to develop semisolid formulations containing 0.5% dexamethasone used as a positive control (on several studies related to inflammatory skin diseases) (Camponogara et al. 2019a, b; Milani et al. 2019) or diosmetin (at different concentrations; 0.01%, 0.1%, and 1%). We prepared semisolid formulations before in vivo experiments. First, we tested the 1% concentration of diosmetin. Once its anti-inflammatory efficacy (seen by the maximum inhibition calculated) was similar to the topical dexamethasone, a non-steroidal anti-inflammatory therapy used against inflammatory skin diseases, we choose lower concentrations (0.1 and 0.01%) of diosmetin to obtain a logarithmic dose scale, as similarly performed by Antoniazzi et al. (2018).

We evaluated inflammatory parameters upon UVB radiation single exposure through different experimental groups as it follows: naive (neither UVB radiation exposure nor treatment); mice ears exposed to UVB radiation (0.5 J/cm²; no treatment); mice ears exposed to UVB radiation (0.5 J/cm²) and treated with vehicle (Lanette[®] base; 15 mg/ear); mice ears exposed to UVB radiation (0.5 J/

Fig. 1 Chemical structures of Diosmin flavonoid (1) and Diosmetin (3', 5,7-trihydroxy-4'-methoxy flavone; aglycone of diosmin flavonoid) (2)



cm²) and treated with a semisolid formulation containing 0.01% diosmetin; mice ears exposed to UVB radiation (0.5 J/cm²) and treated with a semisolid formulation containing 0.1% diosmetin; mice ears exposed to UVB radiation (0.5 J/cm²) and treated with a semisolid formulation containing 1% diosmetin; mice ears exposed to UVB

radiation (0.5 J/cm²) and treated with a semisolid formulation containing 0.5% dexamethasone.

To assess oxidative parameters upon UVB radiation single exposure, we divided mice into different experimental groups as it follows: naive (neither UVB radiation exposure nor treatment); mice ears exposed to UVB radiation (0.5 J/

cm²; no treatment); mice ears exposed to UVB radiation (0.5 J/cm²) and treated with vehicle (Lanette[®] base; 15 mg/ear); mice ears exposed to UVB radiation (0.5 J/cm²) and treated with a semisolid formulation containing 1% diosmetin; mice ears exposed to UVB radiation (0.5 J/cm²) and treated with a semisolid formulation containing 0.5% dexamethasone.

We also assessed the TRPV1-positive cutaneous nerve fibers desensitisation upon UVB radiation single exposure through different experimental groups as it follows: naive (neither UVB radiation exposure nor treatment); mice ears exposed to UVB radiation (0.5 J/cm²; no treatment); RTX-mice exposed to UVB radiation (0.5 J/cm²; no treatment); RTX-mice exposed to UVB radiation (0.5 J/cm²) and treated with vehicle (Lanette[®] base; 15 mg/ear); RTX-mice exposed to UVB radiation (0.5 J/cm²) and treated with a semisolid formulation containing 1% diosmetin; RTX-mice exposed to UVB radiation (0.5 J/cm²) and treated with a semisolid formulation containing 0.5% dexamethasone.

Animals

Male adult *Swiss* mice (25–30 g) were kept at 22 ± 2 °C (60–80% humidity) under a 12-h/light–dark cycle and standard laboratory food and water ad libitum. All experiments were approved by the Institutional Committee for Animal Care and Use of the Federal University of Santa Maria (Process number 7999090818/2018) and carried out in accordance to ARRIVE guidelines (McGrath and Lilley 2015), following national and international legislation (guidelines of Brazilian Council of Animal Experimentation—CONCEA—and of US Public Health Service's Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals—PHS Policy). Animals were randomly assigned to different treatment groups, and all experimental protocols were performed blindly concerning drug administration. For inflammatory parameters evaluation (seen in the 2.5 section it follows), we used the same animals per group. Right after in vivo assay (ear edema measurement), we subdivided each group's animals into different ex vivo experiments: MPO activity measurement and cytokine levels were performed in the same animals' subgroup, whereas histological analysis was performed in another animals' subgroup (details in the captions for figures). At the end of the experiments, mice were euthanised with an overdose of sodium thiopental (100 mg/kg, i.p.) followed by cervical dislocation. The mice's right ears were removed to further analyses.

UVB-irradiation models

UVB radiation source

We used a Philips TL40W/12 RS lamp (Medical-Eindhoven, The Netherlands) as UVB radiation source, with light spectrum between 290 and 315 nm (an emission peak at 300 nm), positioned at 12 cm from the mouse ear. UVB output was measured using a radiometer (UV monitor MS-211-1, EKO Instruments, Japan), which achieved an emission rate of 0.61 mV/cm² (Camponogara et al. 2020a; Pegoraro et al. 2017, 2020). First, the animals were acclimated in the experimental room for at least 30 min and then were intraperitoneally (i.p.) anaesthetised with ketamine (90 mg/kg) plus xylazine (30 mg/kg). After that, only the ears of mice were exposed to UVB radiation, while the body was protected with cotton cloth, which prevents the passage of UVB radiation, as described by Liu and Zhang (2015) [study that showed the clothing effect on human exposure to UVB radiation, which it was measured in different anatomical sites, using an ultraviolet radiometer UV-B 365 Probe (wavelengths 320–400 nm)].

Skin inflammation model induced by a single exposure to UVB radiation

Anaesthetised mice had their right ear exposed for 14 min (840 s) to the UVB radiation source at a distance of 12 cm, reaching a dose of 0.5 J/cm² (Pegoraro et al. 2017, 2020). Immediately after the UVB irradiation process, the ear of anaesthetised mice was topically treated with semisolid formulations containing vehicle (Lanette[®] base; 15 mg/ear), diosmetin (0.01–1%), or dexamethasone (0.5%).

Evaluation of inflammatory parameters

Ear oedema measurement

Ear thickness (µm) was measured before (basal measurement) and at 24 h after the single exposure to UVB radiation in mice previously anaesthetised with isoflurane (via nose cone), using a digital micrometer (Digimess; 0–25 mm) following Pegoraro et al. (2020). Ear oedema formation was observed by the ear thickness increase, represented by the measurement variation between before and at 24 h after UVB radiation exposure.

Myeloperoxidase (MPO) activity

Twenty-four hours after UVB radiation exposure, mice were euthanised, and their ears removed. Approximately 30 mg of ear tissue was homogenised with a motor-driven homogeniser in 250 µL of acetate buffer (80 mM, pH 5.4) plus

HTAB (0.5%) and centrifuged (16,000×g for 20 min). The supernatant (25 µL) resulting was collected to assess neutrophil infiltration through MPO activity measure, as described previously (Pegoraro et al. 2017; Camponogara et al. 2019a). We analysed colorimetrically the enzyme activity by a spectrophotometer (Fisher Biotech Microkinetics BT 2000 microplate reader) at 630 nm. Results were expressed as optical density (OD)/mL sample.

Histology

Twenty-four hours after the single exposure to UVB radiation, the ear tissue (approximately 30 mg) of mice previously euthanised was collected and prepared to assess histological features, as previously described (Pegoraro et al. 2017; Camponogara et al. 2019b). Histological slides were qualitatively analysed from an optical microscope (model Axio Lab.A1, Carl Zeiss). Histological images were captured at 20× and 40× (objectives) magnification (10× magnification to the ocular lens), using a camera AxioCam ICc 1. For the quantification of inflammatory cells infiltrated, we counted two fields from 4 to 6 different histological slides (images at 200× magnification) of each experimental group using ImageJ software (NIH, USA).

Measurement of macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2) and Interleukin (IL)-1β levels

Twenty-four hours after UVB radiation exposure, mice were euthanised, and ear tissue was collected, homogenised [phosphate buffer solution (80 mM; pH 7.4) containing 0.5% Tween 20, 0.1 mM PMSF, 2 mM EDTA, and 0.1% BSA] and centrifuged (16,000×g) at 4 °C for 20 min (Camponogara et al. 2019c). We assessed MIP-2 and IL-1β levels in the supernatant (100 µL) using enzyme-linked immunoassay kits (Peprotech, Brasil). Results were expressed as ng cytokine/mL sample from standard solutions to MIP-2 or IL-1β.

Oxidative parameters

Superoxide dismutase (SOD)-like activity

The SOD-like activity was evaluated in mice ears by inhibiting superoxide anion-dependent epinephrine auto-oxidation to adrenochrome, a yellow chromophore. Twenty-four hours after UVB radiation exposure, ear tissue (approximately 30 mg) of mice previously euthanised was collected, homogenised in Tris/HCl buffer (50 mM, pH 7.4; 300 µL) and centrifuged (3,000 rpm) at 4 °C for 10 min. The supernatant (5, 10, and 15 µL) was incubated with 50 mM Na₂CO₃ buffer (pH 10.2) at 30 °C. The reaction was initiated by the addition of 60 mM epinephrine (pH 2.0; 30 µL; kept on ice and

protected from light). The SOD-like activity was measured spectrophotometrically at 480 nm by kinetic reaction for up to 2 min, as previously described with minor modifications (Camponogara et al. 2020b; Pereira et al. 2020). SOD-like activity was calculated from the linear regression obtained of epinephrine auto-oxidation curve reduction by the samples containing different SOD concentrations (5–15 µL of supernatant). Results were expressed as UI SOD/mL sample.

Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase activity

NADPH oxidase activity was measured in mice ears collected at 24 h after UVB radiation exposure. Ear tissue (approximately 30 mg) was collected of mice previously euthanised, homogenised in Tris/HCl buffer (50 mM, pH 7.4; 300 µL), and centrifuged (3,000 rpm) at 4 °C for 10 min. Enzyme activity was evaluated from the supernatant (10 µL), using a commercial assay kit (CY0100, cytochrome c reductase, NADPH Assay Kit, Sigma-Aldrich) as previously described (Antoniazzi et al. 2018). Results were expressed as units of the NADPH oxidase/mL sample.

Cutaneous nerve fibers denervation by RTX

Animals were previously anaesthetised (90 mg/kg ketamine and 30 mg/kg xylazine), and the baseline ear thickness was evaluated before subcutaneous administration of RTX (an ultra-potent TRPV1 channel agonist; 50 µg/kg) or vehicle (0.5% ethanol and 0.5% Tween[®] 80 in saline) (Trevisan et al. 2012). Eye wiping assay was performed seven days after the RTX or vehicle administration to confirm the TRPV1-positive fibers desensitisation process (Trevisan et al. 2012). In this assay, we analysed the animal's eye wiping movements for 2 min after ocular instillation of 1 nmol capsaicin solution (TRPV1 agonist that causes irritation) (Nassini et al. 2012). The TRPV1-positive fibers desensitization process is declared successful if one drop of capsaicin solution did not cause eye wiping movements (no eye pungency) by the animal (Pozsgai et al. 2007; Nassini et al. 2012). After that, mice ears were exposed to UVB radiation (as described above), and immediately after, semisolid formulations containing vehicle (Lanette[®] base; 15 mg/ear), diosmetin (1%), or dexamethasone (0.5%) were topically applied. Twenty-four hours after the UVB radiation exposure, ear thickness was again measured. Next, animals were euthanised, and the ear tissue (approximately 30 mg) was collected for MPO activity and histological analysis.

Statistical analysis

Results were expressed as mean + standard error of the mean (S.E.M). The maximum inhibitory effect was calculated

based on treatments' ability to reduce the evaluated parameters concerning only the UVB radiation exposed group, which we considered 100% of the effect. Statistical difference between groups was assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey post hoc test. *p* values lower than 0.05 ($p < 0.05$) denote significant differences among groups. Statistical software GraphPad Prism version 6.00 (San Diego, California, USA) and ImageJ software (inflammatory cells count) were used.

Results

Diosmetin reduces oedematogenic response induced by UVB radiation exposure

Exposure to UVB radiation increased ear thickness to $77 \pm 8 \mu\text{m}$. Topical treatment with diosmetin (0.1 and 1%), a novel TRPV1 antagonist, or dexamethasone (0.5%; positive control) reduced ear oedema with maximum inhibition (I_{max}) of $82 \pm 9\%$ and $97 \pm 1\%$ to diosmetin (1%) and dexamethasone (0.5%), respectively, compared to UVB radiation group (Fig. 2a).

Diosmetin reduces inflammatory cell infiltration induced by UVB radiation exposure

UVB radiation increased MPO enzyme activity, indicating neutrophil infiltration in ear tissue. Topical diosmetin (1%) or dexamethasone (0.5%) reduced MPO activity with I_{max} of $59 \pm 10\%$ and $93 \pm 2\%$, respectively (Fig. 2b).

Histologically, we observed UVB radiation exposure promoted the development of inflammatory processes such as oedema formation and inflammatory cell infiltration in the dermis, and topical diosmetin (1%) or dexamethasone (0.5%) reduced them (Fig. 3a–e.). Quantitatively, UVB radiation exposure caused intense inflammatory cell infiltration (156 ± 8 inflammatory cells/field) in mice ears when compared with the naive group (88 ± 8 inflammatory cells/field), while topical diosmetin (1%) or dexamethasone (0.5%) reduced inflammatory cell infiltrated by $89 \pm 6\%$ and 100%, respectively (Fig. 3f).

Diosmetin decreases MIP-2 and IL-1 β inflammatory cytokines levels induced by UVB radiation exposure

Exposure to UVB radiation increased MIP-2 and IL-1 β cytokine levels in the skin. Topical diosmetin (1%) and dexamethasone (0.5%) reduced both skin inflammatory cytokines levels, with I_{max} of $40 \pm 12\%$ and $54 \pm 7\%$ to MIP-2 (Fig. 4a) and $85 \pm 9\%$ and 100% to IL-1 β (Fig. 4b), respectively.

Diosmetin attenuates oxidative damage induced by UVB radiation exposure

Exposure to UVB radiation decreased twofold the skin SOD activity. Both topical diosmetin (1%) and dexamethasone (0.5%) reversed SOD activity by 100%. The topical vehicle (Lanette[®] base) was also able to reduce this oxidative parameter by $81 \pm 13\%$ (Fig. 5a). Otherwise, UVB radiation exposure increased fourfold the NADPH oxidase activity. The topical diosmetin (1%) reduced not significantly the NADPH oxidase by $67 \pm 10\%$ (Fig. 5b).

Depletion of TRPV1-positive cutaneous sensory nerve fibers modulates oedematogenic response induced by UVB radiation exposure

Exposure to UVB radiation increased ear thickness to $82 \pm 7 \mu\text{m}$. RTX-pretreatment reduced UVB radiation-induced ear oedema by $66 \pm 8\%$ ($28 \pm 7 \mu\text{m}$ ear thickness) compared to the non-desensitised and exposed to UVB radiation group. Topical diosmetin (1%) or dexamethasone (0.5%) decreased ear oedema in the RTX-pretreated and exposed to UVB radiation group, with I_{max} of $87 \pm 7\%$ and $96 \pm 4\%$, respectively, when compared with RTX-pretreated and exposed to UVB radiation group (Fig. 6a).

Denervation of TRPV1-positive cutaneous sensory nerve fibers fully reduces inflammatory cell infiltration induced by UVB radiation exposure

Exposure to UVB radiation increased twofold the MPO activity in the non-desensitised group. Otherwise, MPO activity was reduced completely in the RTX-pretreated and exposed to UVB radiation group. Topical diosmetin (1%) or dexamethasone (0.5%) did not affect inflammatory cell (neutrophil) infiltration (Fig. 6b).

We confirmed histologically the results above. The group's histological sections exposed to UVB radiation without RTX pretreatment presented oedema development and inflammatory cell recruitment in the dermis layer. The RTX pretreatment mitigated ear oedema, and fully decreased the inflammatory cell infiltration. The RTX pretreatment in the group exposed to UVB radiation and treated with a semisolid formulation containing diosmetin (1%), or dexamethasone (0.5%) reduced the ear oedema without alter the inflammatory cell recruited (Figs. 7, 8).

Discussion

Sunburn is recognised as UVB-mediated cutaneous inflammation, which causes erythema, vasodilatation (promoting skin oedema), proinflammatory molecules release, and

Fig. 2 Topical anti-inflammatory effect of diosmetin on skin inflammation model induced by exposure to UVB radiation. **a** Ear oedema, **b** MPO activity. Each bar represents the mean + S.E.M for 6–8 animals/group (a), 6 animals/group (b). Dexamethasone 0.5% abbreviation means topical treatment with 0.5% dexamethasone. ### $p < 0.001$ when compared with the naive group. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ compared with mice ears only exposed to UVB radiation (one-way ANOVA followed by Tukey post hoc test)

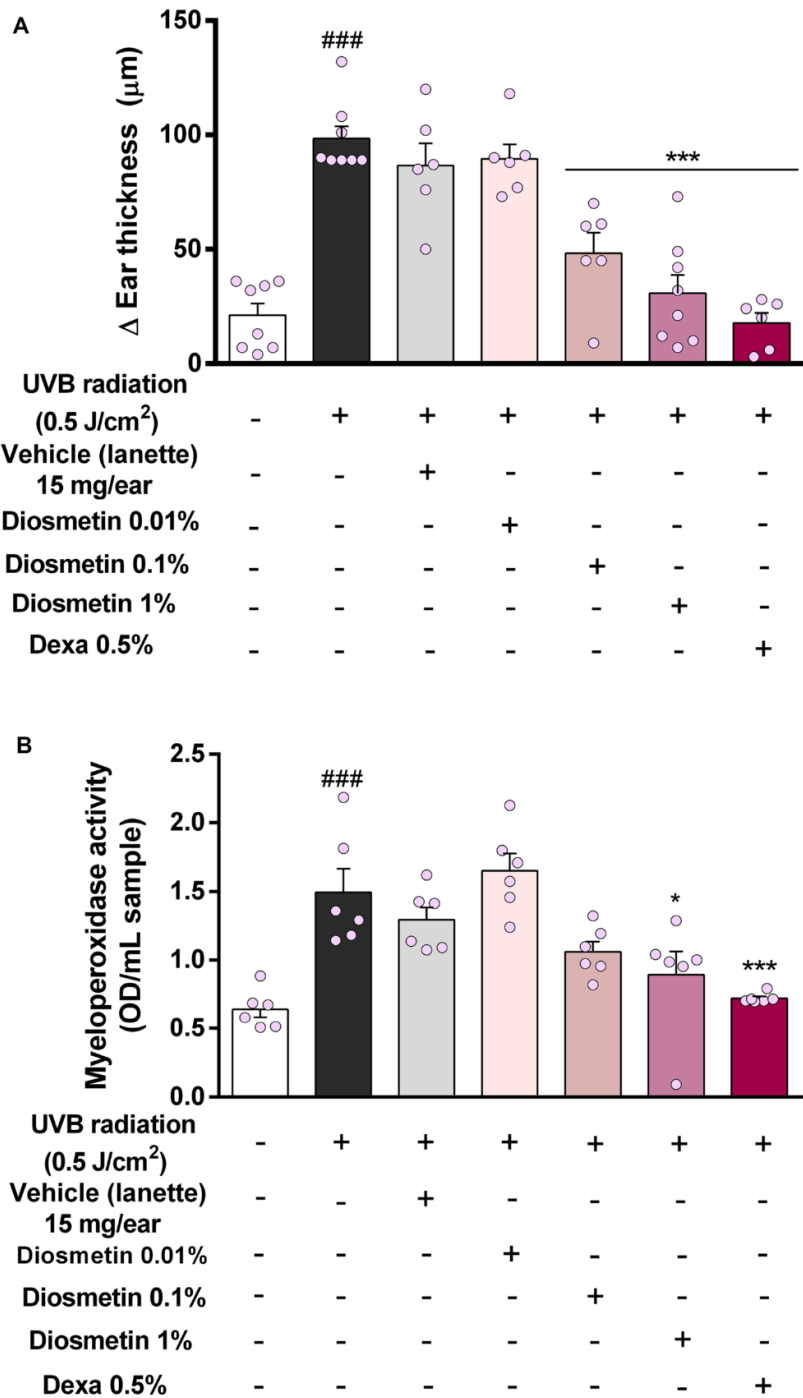


Fig. 3 Topical anti-inflammatory effect of diosmetin on skin inflammation model induced by exposure to UVB radiation. **a–e** histological changes (Hematoxylin–eosin; objectives at 20x and 40x) and **f** number of inflammatory cells/field. Each bar represents the mean + SEM for 5–6 different histological slides analysed/group (2 animals/group). Dexamethasone 0.5% abbreviation means topical treatment with 0.5% dexamethasone. Black arrows indicate the presence of inflammatory cells infiltrated into ear tissue. Figure captions represent: **a** Naive (neither UVB radiation exposure nor treatment); **b** mice ears exposed to UVB radiation (0.5 J/cm²; no treatment); **c** mice ears exposed to UVB radiation (0.5 J/cm²) and treated with vehicle (15 mg/ear); **d** mice ears exposed to UVB radiation (0.5 J/cm²) and treated with semisolid formulation containing 1% diosmetin; **e** mice ears exposed to UVB radiation (0.5 J/cm²) and treated with semisolid formulation containing 0.5% dexamethasone. (Dexa 0.5%). Scale bar, 50 μm. ##*p* < 0.01 when compared with the naive group. ***p* < 0.01, and ****p* < 0.001 compared with mice ears only exposed to UVB radiation (one-way ANOVA followed by Tukey post hoc test)

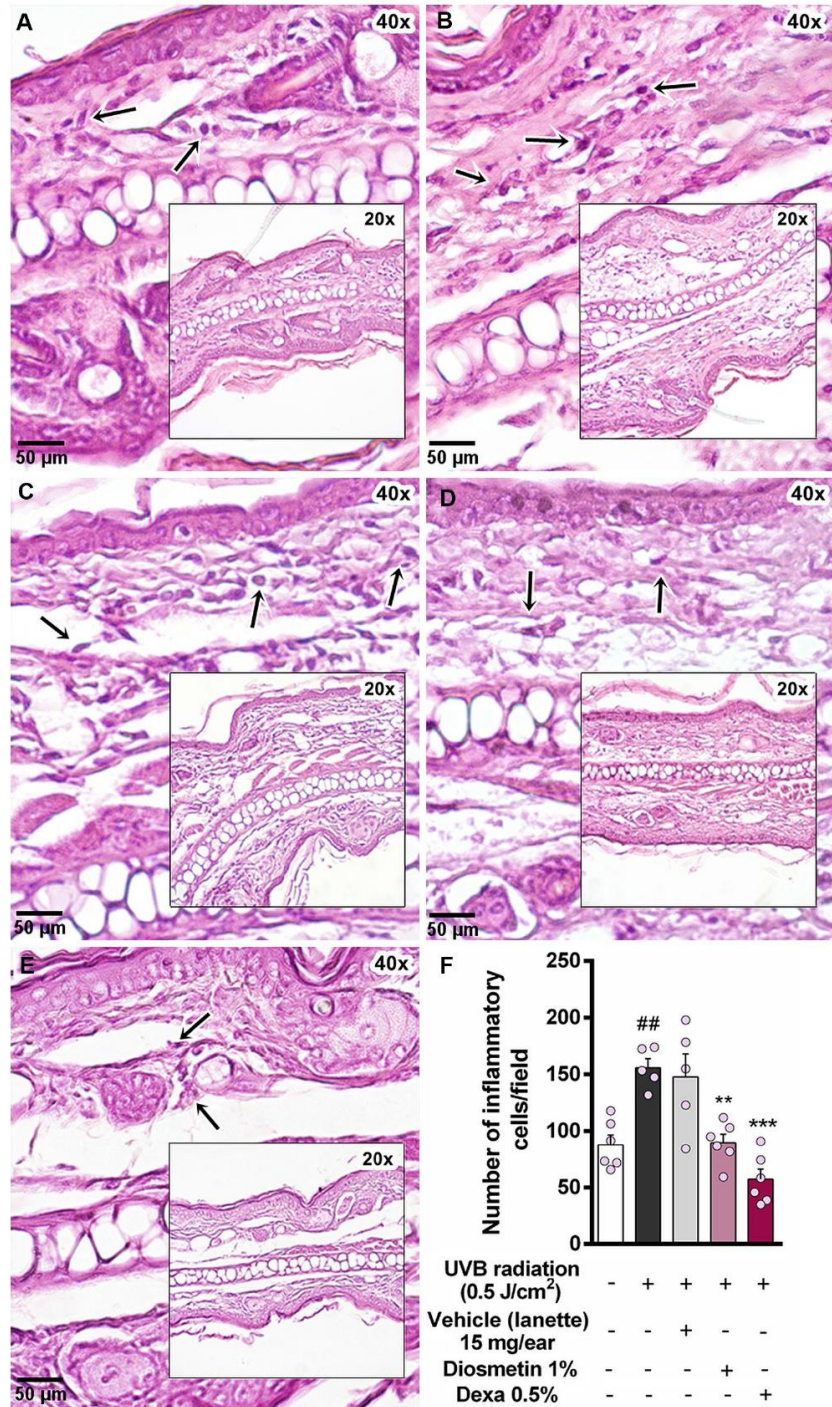
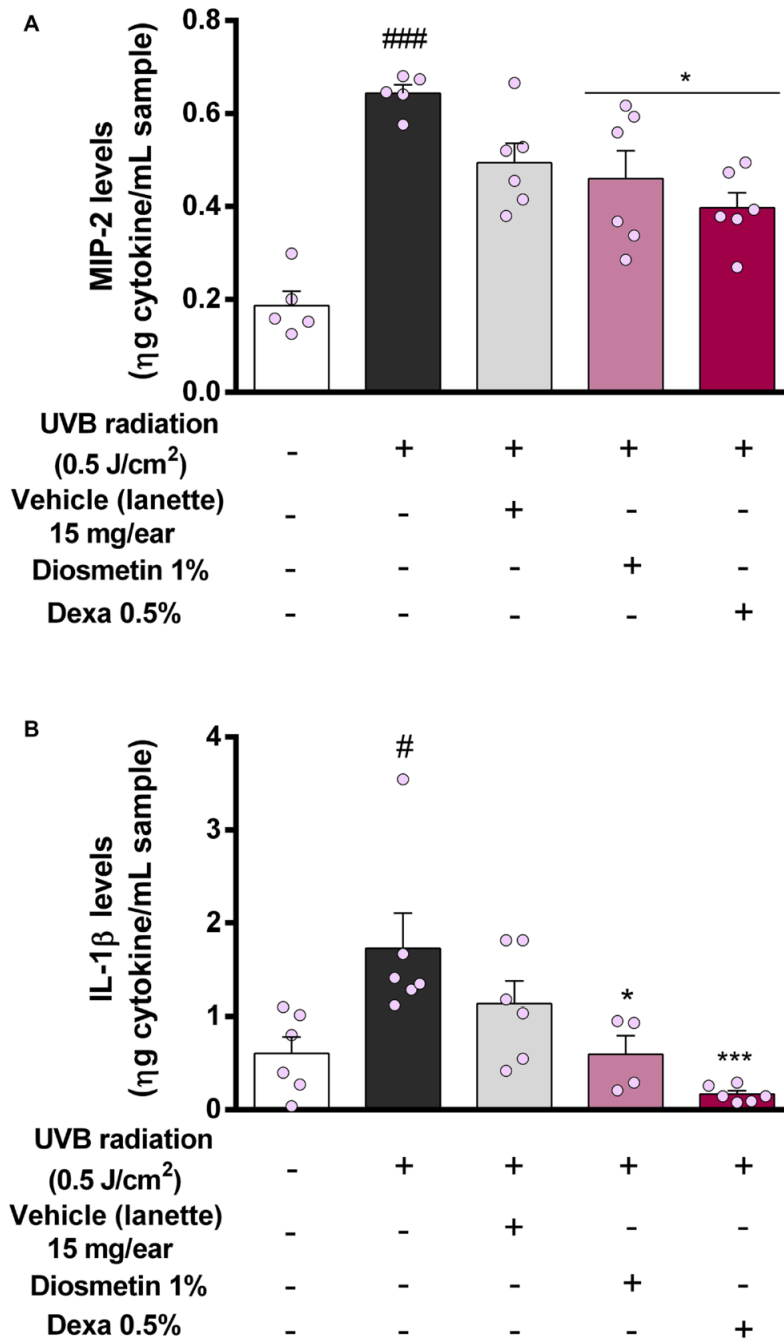


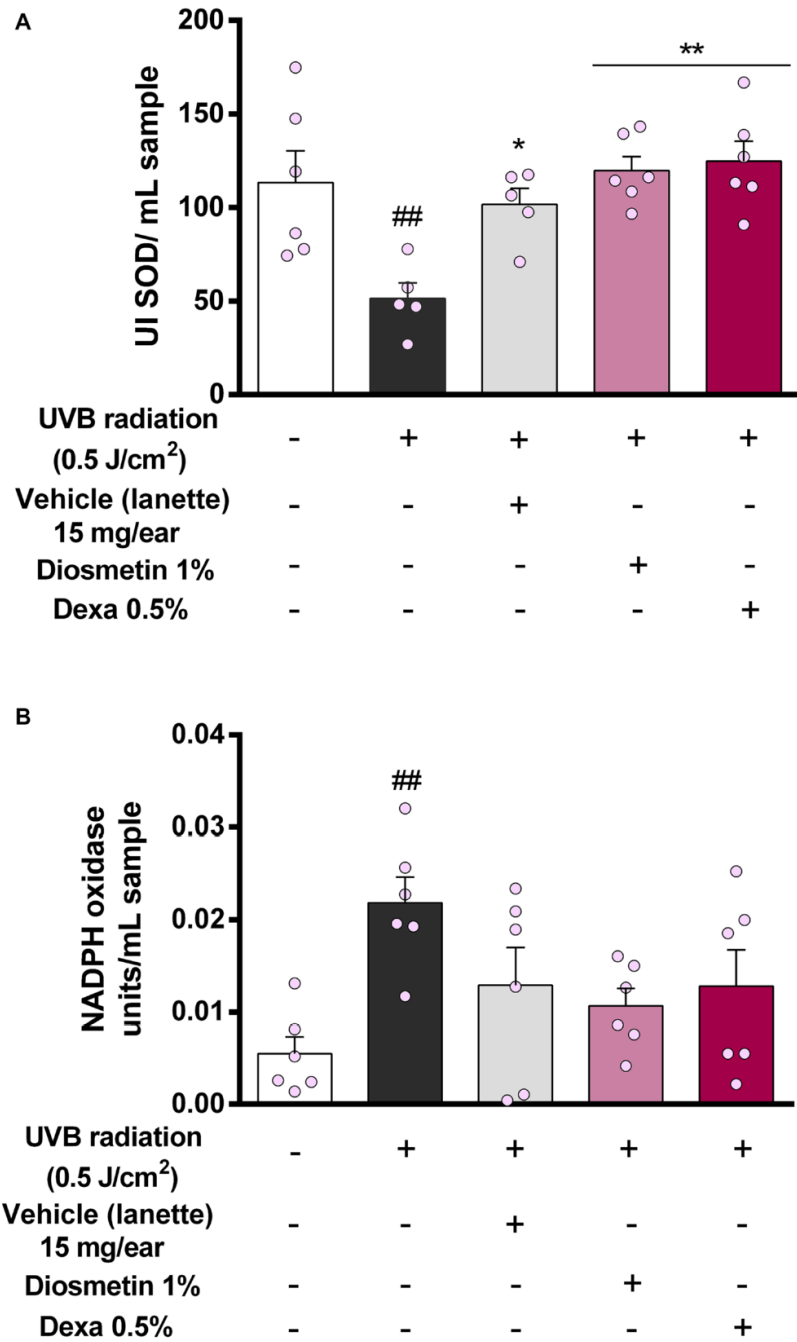
Fig. 4 Topical anti-inflammatory effect of diosmetin on skin inflammation model induced by exposure to UVB radiation. **a** MIP-2 and **b** IL-1 β levels. Each bar represents the mean + S.E.M for 4–6 animals/group. Dexamethasone 0.5% abbreviation means topical treatment with 0.5% dexamethasone. # $p < 0.05$ and ### $p < 0.001$ when compared with naive group. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ compared with mice ears only exposed to UVB radiation (one-way ANOVA followed by Tukey post hoc test)



inflammatory cell infiltration (Saito et al. 2018; Pegoraro et al. 2020). UVB radiation can also increase the radical oxygen production in the skin, exacerbating the damage (Cho

et al. 2017). Although communication between resident and infiltrated cells in the skin provides the theoretical basis for the initiation and maintenance of skin inflammation,

Fig. 5 Topical effect of diosmetin on oxidative damage induced by exposure to UVB radiation. **a** Superoxide dismutase (SOD) activity and **b** NADPH oxidase. Each bar represents the mean + SEM for 5–6 animals/group. Dexamethasone (Dexa) 0.5% abbreviation means topical treatment with 0.5% dexamethasone. ##*p* < 0.01 when compared with the naive group. **p* < 0.05 and ***p* < 0.01 compared with mice ears only exposed to UVB radiation (one-way ANOVA followed by Tukey post hoc test)



UVB-mediated inflammation is thought to cause alterations in neuronal and non-neuronal systems (Choi and Nardo 2018; La Russa et al. 2019).

In this sense, UVB radiation-mediated skin inflammation becomes an interesting *in vivo* model to investigate the interaction between neuronal and non-neuronal systems. Our study demonstrated that the novel TRPV1 antagonist,

Fig. 6 Effect of TRPV1-positive sensory nerve fibers desensitisation on skin inflammation model induced by UVB radiation exposure. **a** Ear oedema, **b** MPO activity. Mice ears were UVB irradiated at 7 days after RTX administration (50 µg/kg; s.c). Each bar represents the mean + SEM for 6 animals/group (a), 5 animals/group (b). Dexamethasone 0.5% abbreviation means topical treatment with 0.5% dexamethasone. ^{##}*p* < 0.01 and ^{###}*p* < 0.001 when compared with naive group. ^{***}*p* < 0.001 and ^{*}*p* < 0.05 compared with mice ears only exposed to UVB radiation. [&]*p* < 0.05 and ^{&&}*p* < 0.01 compared with RTX-pretreated mice and exposed to UVB radiation. (one-way ANOVA followed Tukey post hoc test)

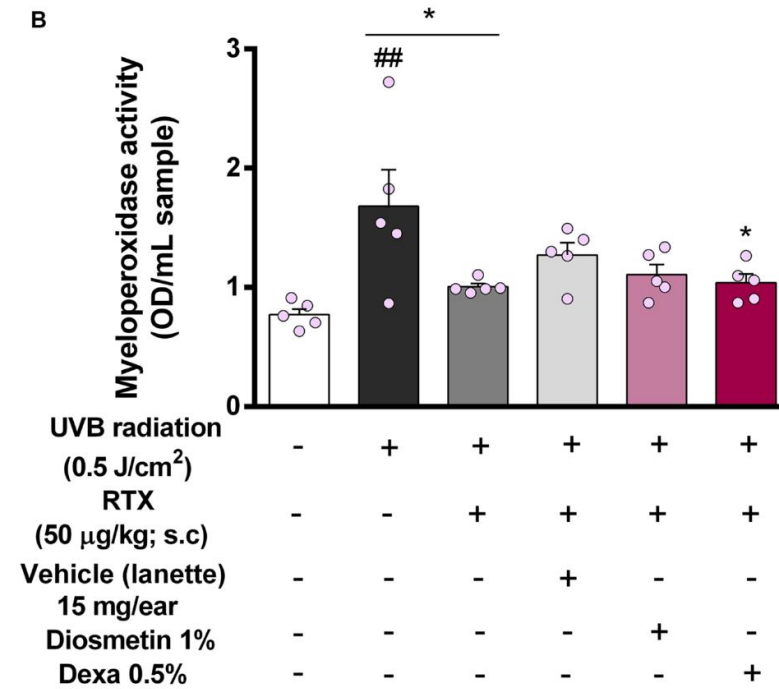
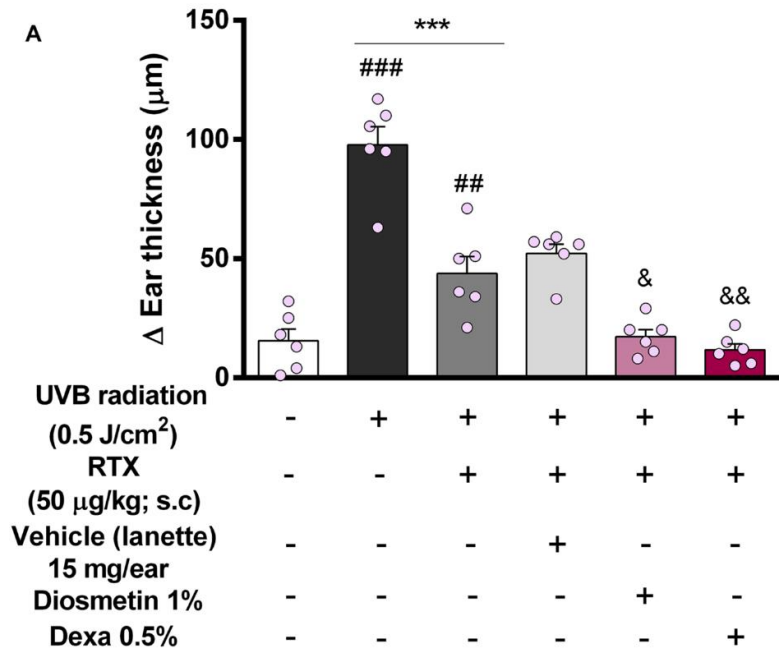


Fig. 7 Effect of TRPV1-positive sensory nerve fibers desensitisation on skin inflammation model induced by UVB radiation exposure. **a–f** Histological changes (Hematoxylin–eosin; objectives at 20 \times and 40 \times) of mice ears UVB irradiated at 7 days after RTX administration (50 μ g/kg; s.c). We analysed two fields of 4–6 different histological slides/group (2 animals/group). Dexamethasone 0.5% abbreviation means topical treatment with 0.5% dexamethasone. Black arrows indicate the presence of inflammatory cells infiltrated into ear tissue. Figure captions represent: **a** Naive (neither UVB radiation exposure nor treatment); **b** mice ears exposed to UVB radiation (0.5 J/cm²; no treatment); **c** RTX-mice exposed to UVB radiation (0.5 J/cm²; no treatment); **d** RTX-mice exposed to UVB radiation (0.5 J/cm²) and treated with vehicle (15 mg/ear); **e** RTX-mice exposed to UVB radiation (0.5 J/cm²) and treated with semisolid formulation containing 1% diosmetin; **f** RTX-mice exposed to UVB radiation (0.5 J/cm²) and treated with semisolid formulation containing 0.5% dexamethasone (Dexa 0.5%). Scale bar, 50 μ m

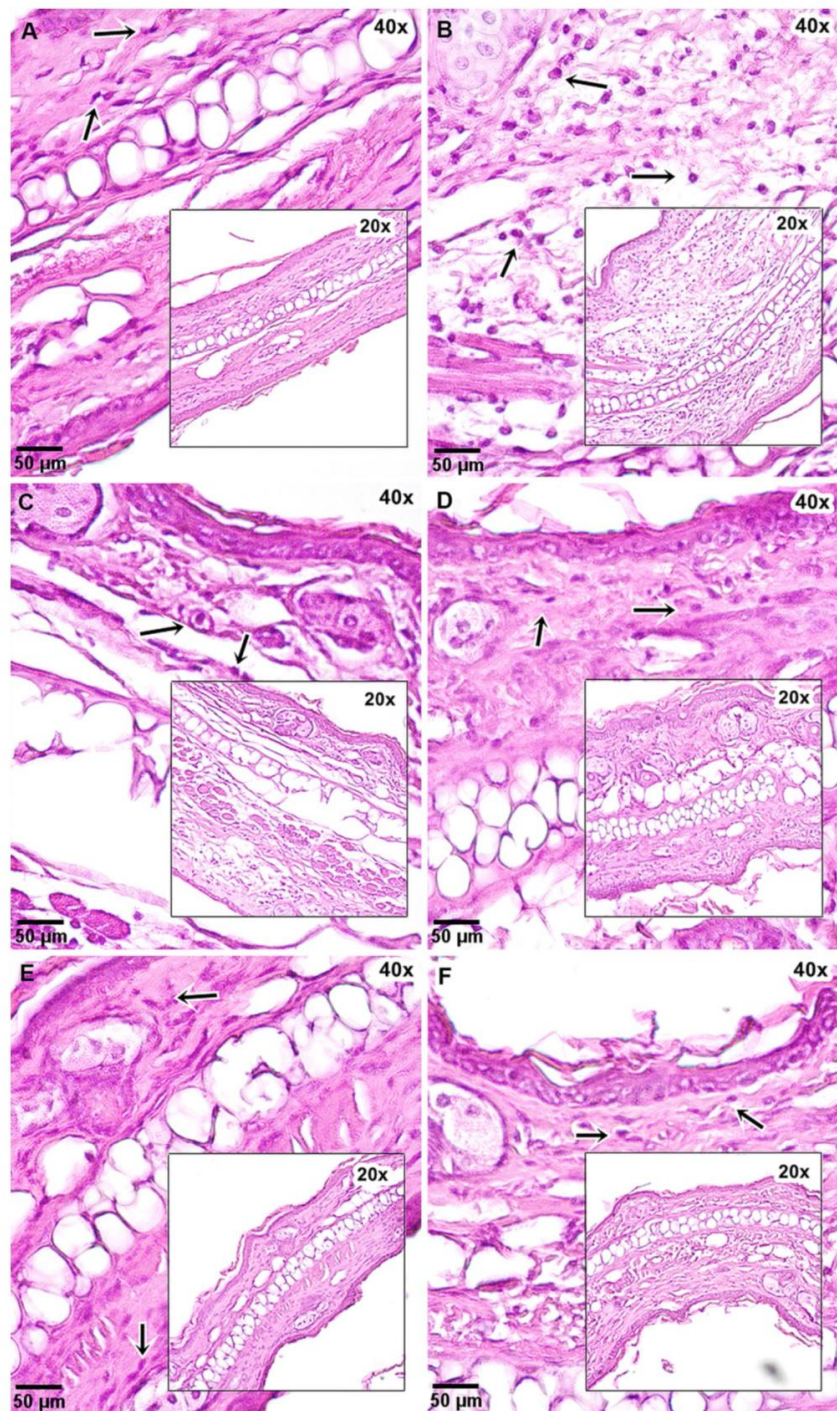
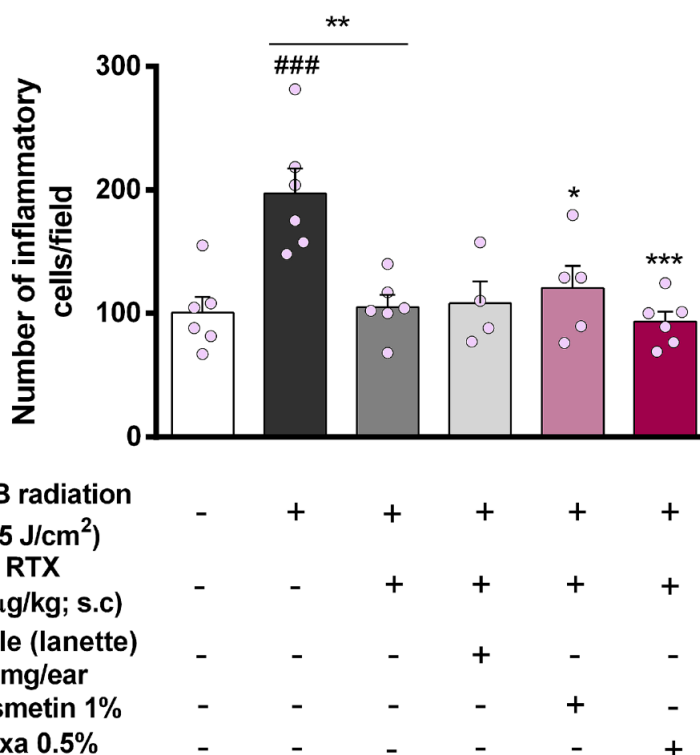


Fig. 8 Effect of TRPV1-positive sensory nerve fibers desensitisation on the skin inflammation model induced by UVB radiation exposure. The number of inflammatory cells/field induced by the exposure to UVB radiation in RTX-desensitised mice (50 µg/kg; s.c). Each bar represents the mean + SEM for 4–6 histological slides analysed/group. Dexamethasone 0.5% abbreviation means topical treatment with 0.5% dexamethasone. ### $p < 0.001$ when compared with the naive group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ compared with mice ears only exposed to UVB radiation (one-way ANOVA followed Tukey post hoc test)



diosmetin, mitigated the inflammatory signals induced by UVB radiation, and its actions may be mediated by TRPV1 channel expression in neurons and non-neuronal cells.

We first demonstrated that mice ears exposed to UVB radiation presented oedema, an essential marker of skin inflammation, according to Cho et al. (2017). The ear oedema caused by UVB radiation exposure was reduced by the TRPV1 antagonist diosmetin. Our results corroborate with previous studies that demonstrated the effectiveness of TRPV1 blockade in reducing ear thickness in different skin inflammation models, including those induced by UV radiation exposure (Lee et al. 2011; Camponogara et al. 2019c).

TRPV1 activation in cutaneous sensory nerve fibers promotes the release of neuropeptides, including calcitonin gene-related peptide (CGRP) and substance P (SP), which directly (via endothelial cells activation) or indirectly (via inflammatory and skin cells activation) elicits vascular permeability changes and oedema formation (Choi and Nardo 2018). In addition, TRPV1 channels expressed in non-neuronal cells may also potentiate cutaneous neurogenic inflammation, contributing to the inflammatory response with UVB radiation (Gouin et al. 2017).

Neuropeptides released from neurons after TRPV1 activation stimulates the production of proinflammatory

cytokines, vasoactive amines, and adhesion molecules by endothelial, skin, and inflammatory cells, which also contribute to the recruitment of inflammatory cells to the inflamed tissue, amplifying the inflammatory process (Choi and Nardo 2018). Neutrophils are the first inflammatory cells recruited from the bloodstream into inflamed tissue and play a crucial role in sunburn's pathophysiology induced by UVB radiation exposure since these cells potentiate skin damage through the release of harmful substances (Martínez et al. 2017).

One of the main enzymatic constituents present in neutrophils azurophilic granules is the myeloperoxidase (MPO) enzyme, commonly used as an indirect marker of neutrophil infiltration into tissue (Pegoraro et al. 2017). Diosmetin also reduced MPO activity, which was confirmed by the histological analysis of mice ear tissue. Previous studies support the role of TRPV1 in the inflammatory cell infiltration in different inflammation models, including inflammatory skin diseases (Camponogara et al. 2019c), making the TRPV1 blockade a potential target to control the neutrophil infiltration associated with UVB radiation exposure.

Underlying the anti-inflammatory effect of diosmetin that was reported previously, we also investigated whether the TRPV1 blockade may regulate the production of

inflammatory cytokines. Diosmetin reduced the IL-1 β and MIP-2 (a functional analogue of IL-8 in humans) cytokines levels in mice ears after sunburn induced by UVB radiation exposure. Because these inflammatory cytokines are responsible for neutrophil chemotaxis (Endo et al. 2016), we suggest the reduction of IL-1 β and MIP-2 cytokines by diosmetin treatment may be related to its effect on controlling neutrophil infiltration.

It is well established that UV radiation activates the transcription factor nuclear *Kappa* B (NF- κ B), which is responsible for the transcription of several inflammatory mediators (Lee et al. 2011; Gouin et al. 2017; La Russa et al. 2019). Previous studies demonstrated that TRPV1 activation induces NF- κ B-mediated cytokine production in human corneal epithelial cells (Wang et al. 2011). Taken together, we suggest TRPV1 present in nerve endings and inflammatory/skin cells may also modulate the production of inflammatory mediators via NF- κ B signaling during sunburn induced by UVB radiation exposure. However, further studies are needed to elucidate this relationship.

The cutaneous inflammatory process upon UVB radiation exposure is accompanied by ROS overproduction and depletion of endogenous antioxidants (Yin et al. 2019). The synergistic effect between acute inflammation and oxidative stress occurs when neutrophils produce superoxide anions through nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase 2 activity (Martínez et al. 2017). Moreover, ROS may contribute to inflammation by activating multiple inflammatory signaling pathways involved in cytokine production (Martínez et al. 2018). Considering the relationship between ROS and the inflammatory skin process, the use of molecules with antioxidant and anti-inflammatory properties becomes a promising approach to control UVB radiation-induced skin damage.

Diosmetin reduced the activity of NADPH oxidase and restored the skin antioxidant capacity by inhibiting the superoxide dismutase depletion. UVB-induced superoxide anion production and accumulation may occur via NADPH oxidase and depletion of the superoxide dismutase enzyme, respectively (Martínez et al. 2017; Yin et al. 2019). Thus, we suggest that TRPV1 blockade by diosmetin represents an additional mechanism to avoid oxidative damage caused by sunburn mediated by UVB radiation exposure. It corroborates with previous studies, which indicated that TRPV1-mediated calcium influx induced ROS generation in dermal fibroblasts exposed to UVB radiation (Huang et al. 2019).

Understanding the processes that modulate the interactions between the sensory nerves and the skin's immune systems is essential for the effective development of treatments for inflammatory skin processes (Choi and Nardo 2018). Although the interaction between these systems and TRPV1 has already been reported, little is known about the specific contribution of neuronal and non-neuronal TRPV1

on inflammatory processes upon UVB radiation exposure (Lee et al. 2011; Lopes and McMahon 2016; La Russa et al. 2019).

We demonstrated that the neuronal and non-neuronal TRPV1 channel might be involved in the inflammatory skin processes after UVB radiation exposure. We first assessed the role of TRPV1-positive cutaneous sensory nerve fibers in the vascular permeability change induced by UVB radiation exposure from the RTX pretreatment-induced desensitization process. The denervation process with systemic RTX pretreatment has been widely used to evaluate the neuronal TRPV1 channel contribution in several pathologic processes, including those related to inflammation (Trevisan et al. 2012).

Our study showed non-neuronal TRPV1 actively contributed to ear oedema formation upon UVB radiation exposure. Also, diosmetin treatment reduced ear oedema, even in animals desensitized with RTX, suggesting its anti-inflammatory effect could still be mediated by non-neuronal TRPV1. Previous studies demonstrated that UVB radiation triggered oedema by combining neurogenic mechanisms, non-neuronal mediators, and ROS (La Russa et al. 2019), which reinforce the role of neuronal and non-neuronal TRPV1 in the development of this inflammatory parameter.

Neuronal TRPV1 seems to predominantly mediate the inflammatory cell infiltration upon UVB exposure. Our results follow previous findings which demonstrated that cutaneous sensory fibers depletion reduced the recruitment of inflammatory cells in skin inflammation, and this effect could, consequently, be related to sensory neuropeptide depletion (Costa et al. 2006; Riol-Blanco et al. 2014). Cutaneous inflammation induced by UVB exposure promotes sensory hyperinnervation and TRPV1 expression with a consequent increase in neuropeptides in the inflamed areas (Legat et al. 2002; Lee et al. 2009; Rodriguez et al. 2009).

Especially, substance P released from sensory nerve fibers has a vital role in enhancing the chemotactic responses of primary neutrophils to MIP-2 (Sun et al. 2007). Thus, this evidence helps to clarify the importance of neuronal TRPV1 in controlling inflammatory cell recruitment upon UVB radiation exposure, although further studies are still needed to understand this complex process better. We demonstrated, for the first time, that topical treatment with the novel TRPV1 antagonist, diosmetin, effectively inhibited UVB radiation-induced oxidative stress and inflammation in mice skin by neuronal and non-neuronal TRPV1 pathways. Thus, the diosmetin flavonoid is an attractive therapeutic alternative for treating UVB radiation-induced sunburn and other inflammatory skin disorders.

Acknowledgements We thank the professor of the Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry (Federal University of Santa Maria), Vera Morsch, for loaning equipment and all authors for

their contribution. We also acknowledge fellowships from CNPq and CAPES.

Author contributions Participated in research design: [CC; SMO]. Conducted experiments: [CC; IB; ESB; NSP; NB; SMO]. Performed data analysis: [CC; SMO]. Wrote or contributed to the writing of the manuscript: [CC; SMO]. All the authors reviewed the manuscript.

Funding Study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul-FAPERGS [Grant #17/2551-0001082-5] (Brazil); by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq [Grant #406098/2018-2], and by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior—CAPES/PROEX [#23038.005450/2020-19, Grant: #0578/2020]. SMO is recipient of fellowship from CNPq [Grant #304985/2020-1]. CC, ESB, IB and NSP are recipient of fellowship from CAPES/PROEX (process #88882.182152/2018-01; process #88887.185973/2018-00; process #88882.182148/2018-01 and process #88882.182128/2018-01).

Declarations

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution at which the studies were conducted and ethical approval was obtained from Institutional Committee for Animal Care and Use of the Federal University of Santa Maria (Process number 7999090818/2018).

References

- Adamante G, Almeida AS, Rigo FK, Silveira ES, Coelho YO, De Prá SDT, Milioli AM, Camponogara C, Casoti R, Bellinaso F, Desideri AV, Santos MFC, Ferreira J, Oliveira SM, Trevisan G (2019) Diosmetin as a novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist with antinociceptive activity in mice. *Life Sci* 216:215–226. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.11.029>
- Antoniazzi CTD, Prá SDT, Ferro PR, Arnoldi MA, Adamante G, Almeida AS, Camponogara C, Silva CR, De Bem GS, Silveira PCL, Oliveira SM, Rigo FK, De Logu F, Nassini R, Trevisan G (2018) Topical treatment with a transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) antagonist reduced nociception and inflammation in a thermal lesion model in rats. *Eur J Pharm Biopharm* 125:28–38. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.09.012>
- Camponogara C, Silva CR, Brusco I, Piana M, Faccin H, Carvalho LM, Schuch A, Trevisan G, Oliveira SM (2019a) *Nasturtium officinale* R. Br. effectively reduces the skin inflammation induced by croton oil via glucocorticoid receptor-dependent and NF- κ B pathways without causing toxicological effects in mice. *J Ethnopharmacol* 229:190–204. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.10.011>
- Camponogara C, Casoti R, Brusco I, Piana M, Boligon AA, Cabrini DA, Trevisan G, Ferreira J, Silva CR, Oliveira SM (2019b) *Tabernaemontana catharinensis* leaves effectively reduce the irritant contact dermatitis by glucocorticoid receptor-dependent pathway in mice. *Biomed Pharmacother* 109:646–657. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.132>
- Camponogara C, Casoti R, Brusco I, Piana M, Boligon AA, Cabrini DA, Trevisan G, Ferreira J, Silva CR, Oliveira SM (2019c) *Tabernaemontana catharinensis* leaves exhibit topical anti-inflammatory activity without causing toxicity. *J Ethnopharmacol* 231:205–216. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.11.021>
- Camponogara C, Brum ES, Pegoraro NS, Brusco I, Rocha FG, Brandenburg MM, Cabrini DA, André E, Trevisan G, Oliveira SM (2020a) Neuronal and non-neuronal transient receptor potential ankyrin 1 mediates UVB radiation-induced skin inflammation in mice. *Life Sci* 262:118557. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118557>
- Camponogara C, Brum ES, Belke BV, Brum TF, Jesus RS, Piana M, Bauermann LF, Oliveira SM (2020b) *Casearia decandra* leaves present anti-inflammatory efficacy in a skin inflammation model in mice. *J Ethnopharmacol* 249:112436. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112436>
- Caterina MJ, Pang Z (2016) TRP channels in skin biology and pathophysiology. *Pharmaceuticals* 9:1–28. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01056-8>
- Cho BO, Che DN, Shin JY, Kang HJ, Kim JH, Kim HY, Cho WG, Jang SI (2017) Ameliorative effects of *Diospyros lotus* leaf extract against UVB-induced skin damage in BALB/c mice. *Biomed Pharmacother* 95:264–274. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.159>
- Choi JE, Nardo AD (2018) Skin neurogenic inflammation. *Semin Immunopathol* 40:249–259. <https://doi.org/10.1007/s00281-018-0675-z>
- Costa SKP, Yshii LM, Poston RN, Muscará MN, Brain SD (2006) Pivotal role of endogenous tachykinins and the NK1 receptor in mediating leukocyte accumulation, in the absence of oedema formation, in response to TNF- α in the cutaneous microvasculature. *J Neuroimmunol* 171:99–109. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.09.006>
- Domínguez M, Avila JG, Nieto A, Céspedes CL (2011) Anti-inflammatory activity of *Penstemon gentianoides* and *Penstemon campanulatus*. *Pharm Biol* 49:118–124. <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.503708>
- Endo D, Saito T, Umeki Y, Susuki K, Aratani Y (2016) Myeloperoxidase negatively regulates the expression of proinflammatory cytokines and chemokines by zymosan-induced mouse neutrophils. *Inflamm Res* 65:151–159. <https://doi.org/10.1007/s00011-015-0899-5>
- Gouin O, L'Herondelle KL, Lebonvallet N, Le Gall-Ianotto C, Sakka M, Buhé V, Plée-Gautier E, Carré JL, Lefeuvre L, Misery L, Le Garrec R (2017) TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation: pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization. *Protein Cell* 8:644–661. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0395-5>
- Huang KF, Ma KH, Jhap TY, Liu PS, Chueh SH (2019) Ultraviolet B irradiation induced Nrf2 degradation occurs via activation of TRPV1 channels in human dermal fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 141:220–232. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.06.020>
- La Russa F, Lopes DM, Hobbs C, Argunhan F, Brain S, Bevan S, Bennett DLH, McMahon SB (2019) Disruption of the sensory system affects sterile cutaneous inflammation in vivo. *J Invest Dermatol* 139:1936–1945. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.01.037>
- Lee Y, Kim YK, Kim KH, Park SJ, Kim SJ, Chung JH (2009) A novel role for the TRPV1 channel in UV-induced matrix metalloproteinase (MMP)-1 expression in HaCaT cells. *J Cell Physiol* 219:766–775. <https://doi.org/10.1002/jcp.21729>
- Lee Y, Kang SM, Lee SR, Kong KH, Lee JY, Kim EJ, Chung JH (2011) Inhibitory effects of TRPV1 blocker on UV-induced responses in the hairless mice. *Arch Dermatol Res* 303:727–736. <https://doi.org/10.1007/s00403-011-1153-9>
- Legat FJ, Griesbacher T, Schicho R, Althuber P, Schuligoi R, Kerl H, Wolf P (2002) Repeated subinflammatory ultraviolet B irradiation increases substance P and calcitonin gene-related peptide content and augments mustard oil-induced neurogenic inflammation in the

- skin of rats. *Neurosci Lett* 329:309–313. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(02\)00428-7](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(02)00428-7)
- Liu J, Zhang W (2015) The influence of the environment and clothing on human exposure to ultraviolet light. *PLoS ONE* 10:1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124758>
- Lopes DM, McMahon SB (2016) Ultraviolet radiation in the skin: a painful experience? *CNS Neurosci Ther* 22:118–126. <https://doi.org/10.1111/cns.12444>
- Martinez RM, Pinho-Ribeiro FA, Steffen VS, Caviglione CV, Fattore V, Bussmann AJC, Bottura C, Fonseca MJV, Vignoli JA, Baracat MM, Georgetti SR, Verri WA Jr, Casagrande R (2017) Trans-Chalcone, a flavonoid precursor, inhibits UV-induced skin inflammation and oxidative stress in mice by targeting NADPH oxidase and cytokine production. *Photochem Photobiol Sci* 16:1162–1173. <https://doi.org/10.1039/c6pp00442c>
- Martinez RM, Ivan ALM, Vale DL, Campanini MZ, Ferreira VS, Steffen VS, Vicentini FTMC, Vilela FMP, Fonseca MJV, Baracat MM, Georgetti SR, Verri WA Jr, Casagrande R (2018) Topical emulsion containing pyrrolidone dithiocarbamate: effectiveness against ultraviolet B irradiation-induced injury of hairless mouse skin. *J Pharm Pharmacol* 70:1461–1473. <https://doi.org/10.1111/jphp.12997>
- McGrath JC, Lilley E (2015) Implementing guidelines on reporting research using animals (ARRIVE etc.): new requirements for publication in *BJP*. *Br J Pharmacol* 172:3189–3193. <https://doi.org/10.1111/bph.12955>
- Milani GB, Camponogara C, Piana M, Silva CR, Oliveira SM (2019) *Cariniana domestica* fruit peels present topical anti-inflammatory efficacy in a mouse model of skin inflammation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 392:1–16. <https://doi.org/10.1007/s00210-018-1594-1>
- Nassini R, Materazzi S, Vriens J, Prenen J, Benemei S, De Siena G, Marca G, André E, Preti D, Avonto C, Sadofsky L, Di Marzo V, De Petrocellis L, Dussor G, Porreca F, Tagliabue Scafati O, Appendino G, Nilius B, Geppetti P (2012) The 'headache tree' via umbellulone and TRPA1 activates the trigeminovascular system. *Brain* 135:376–390. <https://doi.org/10.1093/brain/awr272>
- Pegoraro NS, Barbieri AV, Camponogara C, Mattiazzi J, Brum ES, Marchiori MCL, Oliveira SM, Cruz L (2017) Nanoencapsulation of coenzyme Q10 and vitamin E acetate protects against UVB radiation-induced skin injury in mice. *Colloid Surf B* 150:32–40. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.11.013>
- Pegoraro NS, Camponogara C, Gehrcke M, Giuliani LM, Silva DT, Maurer LH, Dias P, Emanuelli T, Cruz L, Oliveira SM (2020) Oleic acid-containing semisolid dosage forms exhibit in vivo anti-inflammatory effect via glucocorticoid receptor in a UVB radiation-induced skin inflammation model. *Inflammopharmacology* 28:773–786. <https://doi.org/10.1007/s10787-019-00675-5>
- Pereira GC, Piton E, Santos BM, Silva RM, Almeida AS, Dalenogare DP, Schiefelbein NS, Fialho MFP, Moresco RN, Santos GT, Marchesan S, Bochi GV (2020) Apocynin as an antidepressant agent: in vivo behavior and oxidative parameters modulation. *Behav Brain Res* 388:112643. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112643>
- Pozsgai G, Sándor K, Perkecz A, Szolcsányi J, Helyes Z, Brain SD, Pintér E (2007) Topical acetone treatment induces neurogenic oedema on the sensitized mouse ear: an in vivo study using transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptor knockout mice. *Inflamm Res* 56:459–467. <https://doi.org/10.1007/s00011-007-7065-7>
- Riol-Blanco L, Ordovas-Montanes J, Perro M, Naval E, Thiriot A, Alvarez D, Paust S, Wood JN, Von Andrian UH (2014) Nociceptive sensory neurons drive interleukin-23 mediated psoriasiform skin inflammation. *Nature* 510:157–161. <https://doi.org/10.1038/nature13199>
- Rodriguez AL, Stefani FS, Oliveira Praes CE, Piaciski A, Oliveira MP, Martins P, Silva VD, Bonorino C, Bauer ME (2009) Effects of ultraviolet radiation on human cutaneous nerve fibers. *Cell Prolif* 42:562–567. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2009.00620.x>
- Saito P, Melo CPB, Martinez RM, Fattori V, Cezar TLC, Pinto IC, Bussmann AJC, Vignoli JA, Georgetti SR, Baracat MM, Verri WA Jr, Casagrande R (2018) The lipid mediator resolvin D1 reduces the skin inflammation and oxidative stress induced by UV irradiation in hairless mice. *Front Pharmacol* 9:1–15. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01242>
- Sun J, Ramnath RD, Bhatia M (2007) Neuropeptide substance P upregulates chemokine and chemokine receptor expression in primary mouse neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol* 293:C696–704. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00060.2007>
- Trevisan G, Rossato MF, Walker CIB, Klafke JZ, Rosa F, Oliveira SM, Tonello R, Guerra GP, Boligon AA, Zanon RB, Athayde ML, Ferreira J (2012) Identification of the plant steroid α -spinasterol as a novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist with antinociceptive properties. *J Pharmacol Exp Ther* 343:258–269. <https://doi.org/10.1124/jpet.112.195909>
- Urasaki MBM, Muradi MM, Silva MT, Maekawa TA, Zonta GMA (2016) Exposure and sun protection practices of university students. *Braz J Nurs* 69:114–121. <https://doi.org/10.1590/0034-7167.2016690117i>
- Wang Z, Yang Y, Yang H, Capó-Aponte JE, Tachado SD, Wolosin JM, Reinach PS (2011) NF- κ B feedback control of JNK1 activation modulates TRPV1-induced increases in IL-6 and IL-8 release by human corneal epithelial cells. *Mol Vis* 17:3137–3146
- Yang Y, Gong X-B, Huang L-G, Wang Z-X, Wan R-Z, Zhang P, Zhang Q-Y, Chen Z, Zhang B-S (2017) Diosmetin exerts anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects to protect against endotoxin-induced acute hepatic failure in mice. *Oncotarget* 8:30723–30733. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15413>
- Yin S, Wang Y, Liu N, Yang M, Hu Y, Li X, Fu Y, Luo M, Sun J, Yang X (2019) Potential skin protective effects after UVB irradiation afforded by an antioxidant peptide from *Odorrana andersoni*. *Biomed Pharmacother* 120:109535. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109535>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

7 DISCUSSÃO

A radiação UV é considerada uma das principais causas do desenvolvimento de malignidades cutâneas, incluindo câncer de pele (melanoma e não melanoma) (PRASAD; SINGH; KATIYAR, 2017). Do espectro de radiação UV que atinge a terra, a radiação UVB é considerada como a mais citotóxica e genotóxica, a qual promove um extensivo dano à pele, bem como ao desenvolvimento de queimaduras solares (HATAKEYAMA et al., 2017). A exposição à radiação UVB proveniente do sol pode culminar com o desenvolvimento da inflamação de pele, devido à ativação de diversas cascatas de sinalização inflamatória, que se inicia imediatamente após a irradiação UVB (BORKOWSKI et al., 2015; CHOI et al., 2014; HUR et al., 2010; KUO et al., 2017).

Embora a comunicação entre as células residentes e infiltrantes na pele forneça a base teórica para a iniciação e manutenção da inflamação de pele, as fibras nervosas sensoriais que inervam a pele são também importantes moduladores do processo inflamatório cutâneo (CHIU; VON HEHN; WOOLF, 2012; COHEN; WU; KAPLAN, 2020; PINHO-RIBEIRO; VERRI Jr; CHIU, 2017). Com base em nossos resultados, nós demonstramos por bloqueio farmacológico que o canal TRPA1 está envolvido na patofisiologia da queimadura de pele induzida pela radiação UVB, e que um novo antagonista do canal TRPV1, a diosmetina, quando aplicado topicamente, é eficaz em conter os processos inflamatórios e oxidativos de pele induzidos pela radiação UVB. Além disso, destacamos também que os processos inflamatórios observados após a exposição à radiação UVB podem ser mediados tanto por vias neuronais quanto por vias não neuronais, já que estes canais estão presentes não somente em fibras nervosas sensoriais, mas também em diferentes tipos de células (residentes e infiltradas) da pele (CAMPONOGARA et al., 2020; CATERINA; PANG, 2016; FIALHO et al., 2020).

Estes achados corroboram com o envolvimento dos sistemas neuronais e não neuronais na iniciação e amplificação das patologias cutâneas, não sendo diferente para aquelas induzidas pela radiação UVB. Entretanto, reforçamos que esta interação entre os sistemas neuronais e não neuronais observados na queimadura de pele induzida pela radiação UVB devam ser melhores esclarecidos em estudos futuros. Por exemplo, avaliar o efeito da dessensibilização de fibras nervosas sensoriais positivas para os canais TRPA1/V1 pela RTX na produção de citocinas inflamatórias, incluindo a MIP-2, seria uma interessante estratégia para confirmar se os mecanismos neurogênicos associados ao TRPA1 e TRPV1 neuronal são fatores determinantes para a quimiotaxia de neutrófilos na queimadura de pele induzida pela

radiação UVB. Além disso, avaliar a expressão de neuropeptídeos, como a SP, em animais expostos à radiação UVB e que foram dessensibilizados ou não dessensibilizados pela RTX seria fundamental para confirmar se a via neuronal é o sistema preponderante na liberação desses neuropeptídeos e se a depleção gênica ou farmacológica desse neuropeptídeo afetaria os parâmetros inflamatórios dependentes do sistema neuronal. Investigar também o efeito da dessensibilização pela RTX sobre os parâmetros proliferativos e oxidativos induzidos pela radiação UVB, uma vez que a denervação cutânea auxilia na redução desses parâmetros, como já observados em outras doenças inflamatórias de pele (KODJI et al., 2019).

Além disso, nós observamos que o tratamento tópico com o anti-inflamatório esteroidal, a dexametasona, apresentou uma eficácia similar ao antagonista TRPA1, HC030031, e a diosmetina em ambos os modelos de queimadura de pele induzidos pela radiação UVB (exposição única e repetida). Os glicocorticoides tópicos são considerados a primeira linha de tratamento contra as queimaduras de pele, enquanto que seu uso sistêmico tem se mostrado inefetivo para este fim. É recomendada que a terapia com glicocorticoide inicie-se dentro de 6 horas ou no máximo um dia após a exposição solar (FAURSCHEU; WULF, 2008; LOPES; MCMAHON, 2016). Embora os glicocorticoides sejam eficazes, o uso prolongado de medicamentos dessa classe pode vir acompanhado de efeitos adversos tópicos e sistêmicos (HAJAR et al., 2015; POETKER; REH, 2010; SIMPSON et al., 2014; XIAO et al., 2015).

O principal mecanismo de ação anti-inflamatória da dexametasona está no controle da expressão de moléculas inflamatórias (transrepressão) ou anti-inflamatórias (transativação), através da ligação do complexo glicocorticoide-receptor aos elementos responsivos ao glicocorticoide (região promotora do DNA) (MIGUEL et al., 2012). Além disso, os glicocorticoides (complexo glicocorticoide-receptor) também podem bloquear a expressão de mediadores e enzimas inflamatórias através da inibição da ligação do NF- κ B (p50p65 nuclear) e AP-1 (c-Fos-c-Jun) a regiões promotoras de genes (ALMAWI; MELEMEDJIAN, 2002; CAMPONOGARA et al., 2019a; LEBWOHL; TANGHETTI; GOLD, 2021). Além da comprovada ação anti-inflamatória, os glicocorticoides apresentam um proeminente efeito antiproliferativo (AHLUWALIA, 1998; ALMAWI; MELEMEDJIAN, 2002). Surpreendentemente, a dexametasona pode reduzir a expressão do canal TRPA1 em queratinócitos, já que os glicocorticoides controlam as vias transcricionais (LUOSTARINEN; HÄMÄLÄINEN; MOILANEN, 2021). Dessa maneira, sugerimos que dentre os efeitos terapêuticos da dexametasona, o controle da expressão de canais TRP,

como o TRPA1, pode ser fator contribuinte para aliviar os diversos sinais da queimadura de pele induzida pela radiação UVB.

Quando a intensidade da radiação UVB excede a capacidade do organismo em se defender/adaptar, o processo inflamatório deflagra-se, havendo desenvolvimento de eritema, produção de mediadores inflamatórios, alterações vasculares (edema), infiltração de células inflamatórias, hiperplasia e dor (GRUBER; HOLTZ; YANG, 2018; KIM et al., 2015). Neste sentido, nós primeiramente avaliamos o envolvimento do canal TRPA1 e o efeito da diosmetina, sobre parâmetros inflamatórios observados na queimadura de pele induzida pela exposição única à radiação UVB em camundongos. Vários estudos demonstram que a exposição à radiação UVB leva ao desenvolvimento de edema de pele, sendo considerado, portanto, um marcador da inflamação de pele induzida pela radiação UV (CHO et al., 2017; PEGORARO et al., 2020). O tratamento tópico com um antagonista TRPA1 e com a diosmetina reduziu o edema de orelha induzido pela radiação UVB. Os canais TRPA1 e TRPV1 participam especificamente do processo de inflamação neurogênica cutânea. Estudos já demonstraram que o bloqueio de ambos os canais TRPA1 e TRPV1 é capaz de reduzir a espessura da orelha de animais em diferentes modelos de dermatite de contato alérgica e irritante (CAMPONOGARA et al., 2019c; HORVÁTH et al., 2015; LIU et al., 2013; NORÕES et al., 2019; SILVA et al., 2011).

A ativação destes canais, em fibras nervosas sensoriais cutâneas, promove a liberação de neuropeptídeos, incluindo o CGRP e SP (CHOI; NARDO, 2018; PETERS et al., 2006). Esses neuropeptídeos estão entre os mais potentes mediadores envolvidos no aumento da permeabilidade vascular e formação de edema, uma vez que atuam diretamente (via seus respectivos receptores) sobre as células musculares lisas e células endoteliais vasculares causando dilatação arteriolar e constrição venular que culmina no extravasamento plasmático (CHOI; NARDO, 2018; MEHTA; GRAINSTEN, 2018). Além disso, os neuropeptídeos também agem indiretamente sobre o desenvolvimento de edema, uma vez que modulam a produção e/ou liberação de mediadores inflamatórios (prostaglandinas, citocinas, quimiocinas e histamina) de células-alvo vizinhas, incluindo queratinócitos, fibroblastos, células dendríticas, mastócitos e neutrófilos (GOUIN et al., 2017). Devido à localização em células neuronais e não neuronais, os canais TRPA1 e TRPV1 potencializam a inflamação neurogênica, aumentando as respostas celulares (GOUIN et al., 2017; SOUTHALL et al., 2003).

Como resultado da ativação de canais TRPA1 e TRPV1, a liberação de neuropeptídeos desencadeia não somente alterações vasculares, mas também induzem a expressão de

moléculas de adesão, fornecendo um mecanismo para promoção da infiltração de leucócitos ao tecido inflamado (ATOYAN; SHANDER; BOTCHKAREVA, 2009; HIMI et al., 2012; SCHOLZEN et al., 1999). Os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias a serem recrutadas da circulação sanguínea para o tecido inflamado e apresentam um papel de destaque na patofisiologia da inflamação de pele induzida pela radiação UVB, uma vez que contribuem para o dano tecidual através da liberação de citocinas, produção de EROs, proteases, bem como outros fatores contidos em seus grânulos citoplasmáticos (MARTINEZ et al., 2020; OLIVEIRA; ROSOWSKI; HUTTENLOCHER, 2016; RIJKEN; BRUIJNZEEL-KOOMEN, 2011; SAITO et al., 2018). Um dos principais constituintes enzimáticos em neutrófilos é a enzima MPO, a qual é armazenada em grandes quantidades nos grânulos azurófilos destas células. Neste sentido, a avaliação da atividade da enzima MPO tem sido usada como um marcador indireto da infiltração de neutrófilos ao tecido (CAMPONOGARA et al., 2019a). Aqui, nós observamos que o tratamento tópico com um antagonista TRPA1 e com a diosmetina também atenuou a infiltração de neutrófilos induzida pela exposição à radiação UVB, observada através da redução da atividade enzimática da MPO. Estes resultados foram consistentes com a análise histológica (coloração hematoxilina-eosina) do tecido da orelha dos animais, revelando que o bloqueio dos canais TRPA1 e TRPV1 reduzem a infiltração de células inflamatórias no tecido cutâneo exposto à radiação UVB.

A ativação de cascatas de sinalização inflamatória pela radiação UVB, incluindo fatores de transcrição e proteínas quinases, estimula a produção de mediadores inflamatórios, tais como citocinas (IL-1 β , IL-6 e IL-8), as quais contribuem para o fotodano cutâneo (LI, X-Q. et al., 2018; TANG, S-C. et al., 2017). Além disso, as citocinas inflamatórias auxiliam na propagação do processo inflamatório, uma vez que promovem o recrutamento de leucócitos ao tecido, amplificando, dessa forma, a inflamação de pele induzida pela radiação UVB (IVAN et al., 2014; MIRZOEVA et al., 2018). Como consequência à exposição da pele à radiação UVB, os queratinócitos e outras células residentes associadas à pele contribuem para a iniciação da inflamação cutânea, via produção de mediadores inflamatórios (TANG, S-C. et al., 2017; TIRARAVESIT et al., 2015). A interação entre os sistemas neuro-imune permite com que os mediadores inflamatórios liberados pelas células residentes da pele sensibilizem e/ou ativem receptores ou canais, incluindo os canais TRPA1 e TRPV1, presentes nas terminações nervosas cutâneas, de forma a amplificar a inflamação de pele, via liberação de neuropeptídeos (inflamação neurogênica cutânea) (GOUIN et al., 2017; PETERS et al., 2006). Além disso, a ativação dos canais TRPA1 e TRPV1, presentes em células não neuronais, como em queratinócitos, também contribui para a modulação de genes

responsáveis pela produção de mediadores inflamatórios, os quais estão envolvidos na inflamação cutânea (GOUIN et al., 2017; LEE et al., 2009, 2011; LEE et al., 2018; TANG et al., 2019; SOUTHALL et al., 2003).

Nesta perspectiva, nós avaliamos o efeito dos antagonistas dos canais TRPA1 e TRPV1 sobre os níveis de citocinas inflamatórias (IL-1 β e MIP-2), após 24 horas da exposição à radiação UVB. Aqui, nós vimos que o tratamento tópico com um antagonista do canal TRPA1 reduziu os níveis de MIP-2 induzidos pela radiação UVB, o que explica seus efeitos sobre a infiltração de células inflamatórias (vista pela atividade da enzima MPO e análise histológica) e edema de orelha. Nesta perspectiva, nós podemos inferir que o canal TRPA1 está envolvido na indução dos processos inflamatórios cutâneos induzidos pela exposição única à radiação UVB.

Já a aplicação tópica de diosmetina reduziu os níveis de ambas as citocinas inflamatórias avaliadas (MIP-2 e IL-1 β). A partir desses resultados, podemos sugerir que o efeito anti-inflamatório tópico da diosmetina poderia ocorrer não somente pelo antagonismo ao canal TRPV1, mas também por outros mecanismos anti-inflamatórios subjacentes (DOMÍNGUEZ et al., 2011; LIU et al., 2017; YU et al., 2014). Além disso, vale ressaltar que a diosmetina reduziu os níveis de IL-1 β de maneira mais expressiva do que para citocina MIP-2. Este achado corrobora fortemente com estudos prévios, os quais mostram que a diosmetina pode reduzir os níveis de mediadores inflamatórios, incluindo a citocina IL-1 β , tanto pela inibição do fator NF- κ B, responsável pela produção da forma inativa pró-IL-1 β , quanto pela inibição do inflamassoma NLRP3, responsável pela conversão da citocina inativa pró-IL-1 β em sua forma ativa IL-1 β (LIU et al., 2017; YU et al., 2014).

A exposição à radiação UVB também resulta na produção excessiva de EROs, incluindo radicais hidroxila, ânion superóxido, oxigênio singlete e peróxido de hidrogênio (MUZAFFER et al., 2019; SAMIVEL et al., 2020), ao mesmo tempo que gera uma redução das reservas antioxidantes (catalase, superóxido redutase, glutatona peroxidase e glutatona reduzida) (CEZAR et al., 2019; GEGOTEK et al., 2017). Nesse sentido, um desequilíbrio entre esses processos acarreta no desenvolvimento de estresse oxidativo, com consequente dano às macromoléculas (lipídios, proteínas e DNA) e organelas celulares (formação EROs mitocondriais) (BAEK et al., 2017; FANG et al., 2017; PEGORARO et al., 2017; SAMIVEL et al., 2020). Além disso, o estresse oxidativo está intimamente relacionado com o dano tecidual e inflamação local na pele queimada, uma vez que as EROs são moléculas sinalizadoras chaves na indução e amplificação dos sinais inflamatórios induzido pela radiação UVB, através da ativação de diversas cascatas de sinalização inflamatória:

inflamassoma NLRP3, MAPKs, NF- κ B e AP-1 (CEZAR et al., 2019; GEGOTEK et al., 2017; MITTAL et al., 2014; WANG et al., 2018). Vale ressaltar que após a instalação do processo inflamatório, com células infiltradas no tecido, como os neutrófilos, a produção continuada de EROs por essas células está amplamente associada com a progressão do dano tecidual e amplificação do processo inflamatório induzido pela radiação UVB (SAITO et al., 2018).

Nesta perspectiva, nós observamos que a exposição única à radiação UVB aumentou a produção de EROs, incluindo o peróxido de hidrogênio (espécie intermediária de oxigênio) e a atividade da enzima NADPH oxidase, ao passo que reduziu a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD). Já o tratamento tópico com um antagonista do canal TRPA1 foi capaz de reduzir os níveis de EROs (incluindo o peróxido de hidrogênio) e a atividade da enzima NADPH oxidase, enquanto que o tratamento tópico com diosmetina reduziu a atividade da NADPH oxidase e restabeleceu a atividade da SOD. É importante salientar que a enzima NADPH oxidase, presente em queratinócitos, fibroblastos, neutrófilos e macrófagos é uma grande produtora de EROs (não mitocondrial) durante a inflamação (GLADY et al., 2018; HUANG et al., 2019; LAMBETH, 2004).

Diversos estudos demonstraram que a produção de EROs nessas células pode ocorrer pela interação entre os canais TRPV1 e TRPA1 com a enzima NADPH oxidase (DE LOGU et al., 2017, 2020; GLADY et al., 2018). Interessantemente, a radiação UV evoca um aumento no cálcio citosólico pela ativação de canais TRP presentes na pele. A sinalização celular dependente de cálcio promove a produção de EROs através da ativação da enzima NADPH oxidase (BELLONO et al., 2013; HUANG et al., 2017, 2018, 2019). Nossos estudos corroboram com os achados anteriores, demonstrando que ambos os canais TRPA1 e TRPV1 expressos em células não neuronais podem deflagar a produção de EROs induzida pela radiação UVB, através da ativação da NADPH oxidase, com conseqüente produção de ânion superóxido que, por sua vez, aciona vias oxidativas subseqüentes. Nesse seguimento, a enzima SOD faz parte do sistema antioxidante intracelular, a qual catalisa a conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio. Estudos anteriores reportaram que as enzimas antioxidantes são depletadas após um dano cutâneo induzido pela exposição direta à radiação UVB (KARTHIKEYAN et al., 2016; SAMIVEL et al., 2020; YIN et al., 2019). Ademais, vale destacar que a depleção da enzima SOD induzida pela radiação UVB pode ocorrer pelo aumento de cálcio intracelular mediado pela ativação do canal TRPV1 (HUANG et al., 2018). Dessa forma, nós podemos sugerir que a alta eficácia da diosmetina em restaurar a atividade da enzima SOD durante o dano oxidativo cutâneo induzido pela radiação UVB seja mediada por dois mecanismos: 1º) ação dependente do antagonismo ao canal TRPV1; 2º) ação

independente do canal TRPV1, conforme já comprovado em estudos prévios (LIAO et al., 2014; LIU et al., 2018; YANG et al., 2017).

Assim como observado na inflamação de pele induzida pela exposição única à radiação UVB, a exposição repetida à radiação UVB também promove a formação de eritema, edema e infiltração de células inflamatórias (CHE et al., 2017; PARK et al., 2014). O processo de fotoenvelhecimento está intimamente associado com os processos inflamatórios cutâneos induzidos pela exposição repetida/crônica de radiação UVB, uma vez que os danos resultantes a essa exposição promovem alterações na estrutura e função da pele e, conseqüentemente, na formação de rugas, flacidez, aspereza, e pigmentação irregular da pele (KARTHIKEYAN et al., 2016; MURATA et al., 2014). Além disso, estudos histológicos mostram que a exposição repetida à radiação UVB promove alterações na espessura epidermal (hiperplasia epidermal) e na organização do tecido conjuntivo (componentes da matriz extracelular), sendo, portanto, considerados como parâmetros marcadores de fotodano (CHO et al., 2017; SEITÉ et al., 2010; ZHANG et al., 2014).

Nós também observamos que a exposição repetida à radiação UVB induziu o desenvolvimento de edema de orelha, infiltração de células inflamatórias, bem como, a hiperplasia epidermal. O tratamento tópico com um antagonista do canal TRPA1 reduziu estes parâmetros. Além dos sinais inflamatórios característicos da queimadura de pele induzida pela radiação UVB, a hiperplasia epidermal é comumente encontrada no tecido cutâneo após a irradiação UVB, muito devido às alterações na homeostasia da barreira cutânea associado ao desequilíbrio entre os processos proliferativos e de diferenciação celular (CHOI et al., 2017; KIM et al., 2013). Vários estudos reportam que a radiação UVB induz a hiperplasia epidermal (proliferação celular descontrolada na camada basal da epiderme) sobre a pele, e que este processo estaria intimamente relacionado com a inflamação cutânea crônica (KIM et al., 2013). Neste sentido, a partir de uma análise imunohistoquímica podemos verificar os efeitos da exposição repetida à radiação UVB sobre a hiperplasia epidermal, através da mensuração da expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). O PCNA é uma proteína nuclear envolvida na replicação do DNA, recombinação e reparo. Na pele normal, esta proteína é encontrada ao longo da camada basal epidérmica. Entretanto, sob condições de dano cutâneo induzido pela radiação UVB, o PCNA pode migrar para as camadas superiores da epiderme, indicando além do dano ao DNA, um aumento dos processos proliferativos celulares (MOORE et al., 2004).

Nessa perspectiva, nós observamos que a exposição repetida à radiação UVB causou hiperplasia epidermal, a qual foi confirmada pelo aumento das células epidérmicas

imunomarcadas para o PCNA. Em contrapartida, o tratamento tópico com um antagonista TRPA1 foi capaz de reduzir este parâmetro hiperproliferativo epidermal, reforçando, dessa forma, a participação do canal TRPA1 no dano cutâneo induzido pela exposição repetida à radiação UVB. Diversas são as teorias envolvidas no aumento da capacidade proliferativa das células epidérmicas após a exposição à radiação UVB. Entre elas podemos destacar: a reação fotoadaptativa frente a um potencial dano cutâneo (CELA et al., 2015); o aumento da produção de algumas citocinas específicas pelos queratinócitos (IL-12 e IL-23) (KIM et al., 2013); a superexpressão da COX-2 epidermal (queratinócitos basais), a qual a produção da prostaglandina E₂ atuaria como uma “proteção” às células epidermais frente à apoptose (RODRÍGUEZ-LUNA et al., 2018; TRIPP et al., 2003) e a mutação do fator de transcrição nuclear p53. Em condições normais, o p53 é responsável pela transativação de genes envolvidos na indução da parada do ciclo celular (reparo celular) e/ou apoptose (OZAKI; NAKAGAWARA, 2011). Após a exposição crônica à radiação UVB, ocorre uma mutação na p53 que, conseqüentemente, contribui para a expansão seletiva das células com p53 mutante, levando a resistência a apoptose e estimulando a hiperproliferação (MELNIKOVA et al., 2005).

Além disso, existe uma forte correlação entre as alterações na membrana lipídica e a hiperplasia epidermal após a irradiação UVB (PERMATASARI; ZHOU; LUO, 2013; TAKAGI et al., 2005). Estudos vêm demonstrando que as mudanças na permeabilidade de membrana e, conseqüentemente, na diferenciação e proliferação são dependentes da alteração do gradiente de cálcio entre as camadas da epiderme (DOBRZYNSKA et al., 2018; JIANG et al., 2007). Na epiderme normal (humana e de murinos), o conteúdo de cálcio extracelular é baixo nas camadas basais e espinhosas, com aumento gradual nas camadas superiores (pico máximo dentro do estrato granuloso). Em contrapartida, a exposição à radiação UVB aumenta o conteúdo de cálcio extracelular e citosólico dentro da epiderme inferior, sugerindo um padrão de distribuição alterado do cálcio epidérmico (observado a partir de 48 horas após a irradiação UVB) (JIANG et al., 2007). Interessantemente, Hennings et al. (1980) demonstrou que nos queratinócitos humanos e murinos, baixas concentrações de cálcio no meio extracelular direcionam para uma proliferação, enquanto que altas concentrações de cálcio extracelular direcionam para uma diferenciação.

Embora o dano cutâneo causado pela radiação UVB implique na alteração dos gradientes de cálcio nas camadas epidérmicas, as alterações nos processos de proliferação e diferenciação podem ser decididas por mecanismos adicionais associados à exposição à radiação UVB. Nesta perspectiva, um estudo revelou que a radiação UVB aumenta a

expressão de um canal iônico seletivo ao cálcio e, o consequente influxo deste cátion resultaria na indução da proliferação de queratinócitos e supressão da diferenciação terminal dessas células (LEE; LEE, 2018). A partir desses fortes indícios nós observamos por análise imunohistoquímica que a exposição repetida à radiação UVB também levou ao aumento da expressão do canal TRPA1 na pele, inclusive na epiderme. Desta forma, podemos inferir que o excesso de cálcio extracelular nas camadas inferiores da pele causadas pelo dano cutâneo inicial induzido pela radiação UVB, favorece um ambiente propício para o influxo de cálcio dependente do canal TRPA1 (ativado também pela radiação UVB). Assim, a passagem de cálcio do meio extracelular para o meio intracelular mediado pelo canal TRPA1, favoreceria a indução dos processos proliferativos, conforme descrito por Hennings et al. (1980).

Além disso, um dado interessante observado pela análise imunohistoquímica foi que o tratamento tópico com um antagonista TRPA1 promoveu uma espécie de “autorredução” da expressão do canal, sugerindo que o influxo de cálcio mediado pelo canal TRPA1 pode modular sua própria expressão (efeito autócrino). Nós fortemente hipotetizamos que esta modulação poderia ocorrer através da ativação de vias de sinalização dependentes de cálcio, incluindo fatores de transcrição como o NF- κ B. Entretanto, mais estudos deveriam comprovar quais as vias realmente podem fazer parte da automodulação transcricional do canal TRPA1. A partir dos nossos resultados, o aumento da expressão do canal TRPA1 no tecido cutâneo das orelhas dos animais também foi observado na derme. Os fibroblastos são células presentes na camada dérmica que ativamente expressam o canal TRPA1 (ATOYAN; SHANDER; BOTCHKAREVA, 2009). Atoyán, Shander e Botchkareva (2009) também demonstraram que o nível de expressão do canal TRPA1 é maior em fibroblastos do que em queratinócitos e melanócitos, o qual foi corroborado a partir dos nossos resultados de análise imunohistoquímica. Hu et al. (2010) demonstrou que agonistas TRPA1 (isotiocianato de alila e cinamaldeído) evocam correntes de cálcio em fibroblastos. Nesse sentido, estudos prévios demonstraram que o influxo de cálcio mediado pelo canal TRPA1 de fibroblastos poderia modular a produção de citocinas inflamatórias e MMPs em doenças inflamatórias (YAP et al., 2020; YIN et al., 2018).

Jain et al. (2011) relatou que a ativação do canal TRPA1 em fibroblastos dermais, pode promover a liberação de mediadores inflamatórios (prostaglandinas e leucotrienos), influenciando a vasodilatação local e a sensibilização neuronal. Além disso, em um modelo de dermatite atópica, os fibroblastos estimulados aumentaram a proliferação de queratinócitos, através da liberação de citocinas (IL-6) e fatores de crescimento (fator estimulador de colônias granulócitos e macrófagos) (OYOSHI et al., 2012). Entretanto, ainda não há estudos que

associem a ativação do canal TRPA1 de fibroblastos com a indução de processos inflamatórios e proliferativos observados em doenças inflamatórias de pele, incluindo aquelas induzidas pela radiação UVB. Apesar disso, não podemos descartar a hipótese de que o aumento da expressão desse canal em células da camada dérmica da pele pode contribuir para a manutenção e amplificação dos processos inflamatórios e proliferativos de pele observados após a exposição à radiação UVB.

O entendimento dos processos que modulam as interações entre sistema nervoso sensorial e o sistema imune da pele são essenciais para o efetivo desenvolvimento de tratamentos para processos inflamatórios de pele, os quais componentes da inflamação neurogênica estão envolvidos (LOTTI; D'ERME; HERCOGOVÁ, 2014). Ambos os sistemas (neuronal e não neuronal) são essenciais para defesa do organismo e restauração do dano tecidual frente a estímulos nocivos (CHIU; VON HEHN; WOOLF, 2012). As terminações das fibras nervosas sensoriais (nociceptores) que inervam a pele respondem a qualquer estímulo nocivo e, quando estimuladas, podem transmitir sinais, não somente de forma ortodrômica (sentido periferia – sistema nervoso central), mas também antidromicamente via liberação de neuropeptídeos ao tecido circundante, permitindo uma rápida resposta, bem antes de o sistema imunológico cutâneo ser ativado (CHOI; NARDO, 2018).

De maneira geral, as fibras nervosas sensoriais cutâneas podem comunicar-se com as diferentes células residentes da pele ou infiltrantes, por meio da liberação de neuropeptídeos. A maior parte das células do tecido cutâneo expressam receptores funcionais para estes neuropeptídeos, possibilitando o recebimento de sinais via sistema nervoso. Em contrapartida, as células residentes da pele e infiltrantes produzem e liberam diversas substâncias inflamatórias, incluindo, neuropeptídeos, os quais promovem a estimulação continuada das fibras nervosas cutâneas. Assim, esta troca de sinais entre o sistema neuronal e não neuronal cria uma retroalimentação bidirecional positiva, culminando na amplificação da resposta inflamatória (PETERS et al., 2006; PETERS, 2012).

Embora já tenha sido relatada a interação entre estes sistemas em diversas condições inflamatórias, bem como o envolvimento dos canais TRPA1 e TRPV1 neste processo, pouco se sabe sobre a contribuição específica destes canais, tanto no sistema neuronal, quanto não neuronal, no desenvolvimento dos parâmetros inflamatórios observados em um modelo de inflamação de pele induzida por radiação UVB. Neste sentido, nós realizamos o pré-tratamento sistêmico com RTX, um potente agonista seletivo do canal TRPV1, o qual tem sido aplicado como uma ferramenta farmacológica para dessensibilizar fibras nervosas sensoriais positivas ao canal TRPV1, em estudos de dor e inflamação (KUN et al., 2012).

Embora seja extremamente específica ao seu alvo, a administração de RTX também pode levar a depleção de outros canais TRP, incluindo o TRPA1, o qual está expresso em praticamente 100% das fibras sensoriais que expressam o canal TRPV1, reforçando, assim, a perda funcional de ambos os canais TRPA1 e TRPV1 neuronais (PECZE et al., 2009; SPAHN et al., 2014). Embora esses canais também estejam co-expressos em células não neuronais (queratinócitos, fibroblastos e linfócitos), a administração de RTX, na dose de 50 µg/kg, não promove efeitos citotóxicos sobre estas células (FERNANDES et al., 2012; KUN et al., 2012; PECZE et al., 2008).

A partir dos resultados obtidos em nosso estudo, foi possível determinar a importância dos sistemas neuronal e não neuronal na indução do edema de orelha e infiltração de células inflamatórias induzidas pela exposição à radiação UVB. Primeiramente, nós observamos que o processo de dessensibilização nervosa pela administração sistêmica de RTX reduziu, mas não aboliu completamente o edema de orelha causado pela exposição à radiação UVB. Além disso, o tratamento tópico com um antagonista do canal TRPA1 (HC030031) ou com a diosmetina reduziram o edema de orelha, mesmo em animais dessensibilizados com RTX, sugerindo que os canais TRPA1 e TRPV1 presentes em células não-neuronais, incluindo queratinócitos, podem contribuir parcialmente na formação do edema de orelha induzido pela radiação UVB.

A ativação dos canais TRPA1 e TRPV1 expressos em queratinócitos pode modular a expressão de diversas substâncias inflamatórias (citocinas, quimiocinas, neuropeptídeos, prostaglandinas) associadas ao desenvolvimento de reações inflamatórias de pele, incluindo a formação do edema (JAIN et al., 2011; LEE et al., 2009, 2011; LIU et al., 2013; SOUTHALL et al., 2003). Além disso, a liberação de prostaglandina E₂, SP e leucotrieno B₄, resultantes da ativação desses canais TRP expressos em outros tipos celulares (células não neuronais) que não os queratinócitos, também auxiliam na degranulação de mastócitos e liberação de histamina e, conseqüentemente, no aumento da permeabilidade vascular (vasodilatação) e formação do edema (ATOYAN; SHANDER; BOTCHKAREVA, 2009; JAIN et al., 2011; LEE et al., 2011; SOUTHALL et al., 2003). Em contrapartida, a dessensibilização nervosa induzida por RTX reduziu a infiltração de células inflamatórias (observadas pela atividade da MPO e análise histológica) no tecido cutâneo, restabelecendo aos níveis basais (pele não dessensibilizada e nem exposta à radiação UVB; naïve). Nossos resultados se assemelham a estudos anteriores, os quais demonstram que a administração sistêmica de RTX reduziu a infiltração de células inflamatórias após a indução de um processo inflamatório cutâneo (RIOL-BLANCO et al., 2014). A SP liberada em decorrência da ativação de fibras nervosas

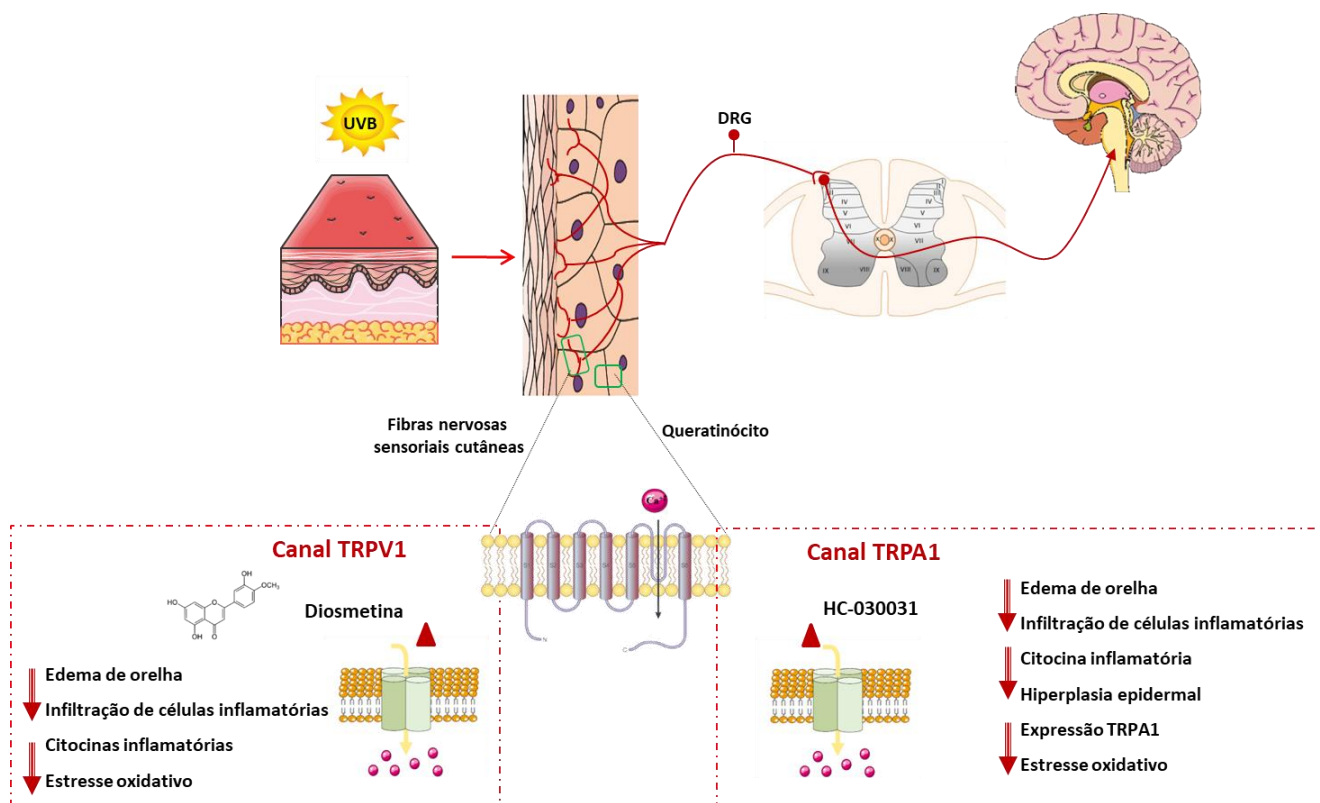
cutâneas está intimamente ligada ao processo de infiltração de células inflamatórias ao tecido, uma vez que este neuropeptídeo induz a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais, bem como, facilita a ativação de células polimorfonucleares (neutrófilos) a estímulos inflamatórios (DIANZINI et al., 2001; NAKAGAWA; SANO; IWAMOTO, 1995). Estes achados também corroboram com Sun et al. (2007), o qual demonstraram que a SP, especialmente liberada pelas fibras nervosas sensoriais, tem um papel determinante no aumento das repostas quimiotáticas de neutrófilos à citocina MIP-2.

Além disso, evidências experimentais demonstram que a estimulação do sistema neuronal em locais inflamatórios pode liberar uma alta concentração local de SP, quando comparado aos sistemas não neuronais, já que os canais (TRPA1 e TRPV1) envolvidos nestes processos estão situados em maiores quantidades em fibras nervosas sensoriais do que em células residentes da pele (DIANZINI et al., 2001; KUN et al., 2012). Nesta perspectiva, nós sugerimos que a ativação/sensibilização dos canais TRPA1 e TRPV1 neuronais seja primordial na indução da infiltração de células inflamatórias à pele observada na queimadura de pele induzida pela radiação UVB.

8 CONCLUSÃO

O canal TRPA1 está envolvido na patofisiologia das queimaduras de pele induzida pela radiação UVB. Logo, moléculas antagonistas deste canal podem ser estratégias terapêuticas potenciais no controle das lesões cutâneas causadas pela exposição solar. Além disso, um novo antagonista do canal TRPV1, a diosmetina, mostrou ser altamente eficaz na redução de parâmetros inflamatórios e oxidativos envolvidos na patogênese das queimaduras de pele induzida pela radiação UVB, reforçando seu uso tópico como possível terapia desta condição de pele. Nosso estudo foi o pioneiro a demonstrar que o envolvimento dos canais TRPA1 (descoberto em nosso estudo) e TRPV1 (já previamente comprovado) em ambos os sistemas neuronais e não neuronais são importantes para a indução dos sinais inflamatórios observados na queimadura de pele induzida pela radiação UVB (Figura 6). Este achado, embora de forma preliminar, pode contribuir para nortear os estudos futuros quanto ao real entendimento da patofisiologia desta condição cutânea, bem como determinar a escolha mais apropriada de moléculas terapêuticas que atuem em alvos presentes em ambos os sistemas neuronais e não neuronais, estabelecendo, assim, um controle mais efetivo dos processos inflamatórios de pele ocasionados pela exposição à radiação solar.

Figura 6 – Envolvimento do canal TRPA1 e efeito antioxidante e anti-inflamatório tópico da diosmetina na queimadura de pele induzida pela radiação UVB. Os sinais inflamatórios observados na queimadura de pele induzida pela radiação UVB podem ser mediados, em parte, pelos canais TRPA1 e TRPV1 presentes em ambos os sistemas neuronais e não neuronais. (DRG – Gânglio da Raiz Dorsal).



9 PERSPECTIVAS

- Avaliar as cascatas de sinalização dependentes de cálcio que podem ser acionadas após a ativação dos canais TRPA1 e TRPV1 pela radiação UVB;
- Aprofundar os estudos sobre o envolvimento das interações neuro-imune na patofisiologia das queimaduras de pele induzida pela radiação UVB;
- Avaliar o potencial preventivo da diosmetina contra as queimaduras de pele induzida pela radiação UVB em pele sintética, a fim de investigar seu potencial como um possível adjuvante em protetores solares;
- Aliar a tecnologia farmacêutica, através da nanotecnologia, no desenvolvimento de uma formulação estável, efetiva e segura contendo diosmetina, realizando conjuntamente estudos de permeação *in vitro* e *in vivo* da formulação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, F., MIJOUIN, L., PICHON, C. Skin Immune Landscape: Inside and Outside the Organism. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, 5095293, Out. 2017.

ABDEL-MAGID, A.F. Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) Antagonists May Provide a Superior Treatment for Pain and Migraine. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v.12, p.1193-1195, Jun. 2021.

ABRAIRA, V.E., GINTY, D.D. The sensory neurons of touch. **Neuron**, v. 79, p. 618–639, Fev. 2013.

ACHANTA, S., et al. TRPA1 and CGRP antagonists counteract vesicant-induced skin injury and inflammation. **Toxicology Letters**, v.293, p.140-148, Set. 2018.

ADAMANTE, G., et al. Diosmetin as a novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist with antinociceptive activity in mice. **Life Sciences**, v.216, p.215-226, Jan. 2019.

ADELSON, D., et al. Substance P release and neurokinin 1 receptor activation in the rat spinal cord increases with the firing frequency of C-fibers. **Neuroscience**, v.161, p.538-553, Jun. 2009.

AHERN, G.P., WANG, X., MIYARES, R.L. Polyamines are potent ligands for the capsaicin receptor TRPV1. **The Journal of Biological Chemistry**, v.281, p.8991–8995, Mar. 2006.

AHLUWALIA, A. Topical glucocorticoids and the skin—mechanisms of action: an update. **Mediators of Inflammation**, v.7, p.183-193, 1998.

AHMED, M., WINTHER, M.P.J., BOSSCHE, J.V.D. Epigenetic mechanisms of macrophage activation in type 2 diabetes. **Immunobiology**, v.222, p.937-943, Out. 2017.

AKIYAMA, T., et al. The Human Cathelicidin LL-37 Host Defense Peptide Upregulates Tight Junction-Related Proteins and Increases Human Epidermal Keratinocyte Barrier Function. **Journal of Innate Immunity**, v.6, p.739-756, Mai. 2014.

ALMAWI, W.Y., MELEMEDJIAN, O.K. Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. **Journal of Leukocyte Biology**, v.71, p.9-15, Jan. 2002.

ANDERSSON, D.A., et al. Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. **The Journal of Neuroscience**, v.28, p.2485–2494, Mar. 2008.

ANDERSSON, D.A., et al. Streptozotocin stimulates TRPA1 directly: involvement of peroxynitrite. **Journal of Biological Chemistry**, v.290, p.15185-15196, Abr. 2015.

ANDRADE, E.L., MEOTTI, F.C., CALIXTO, J.B. TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, v.133, p.189-204, Fev. 2012.

ANSAR, W., GHOSH, S. Inflammation and Inflammatory Diseases, Markers, and Mediators: Role of CRP in Some Inflammatory Diseases. **Biology of C Reactive Protein in Health and Disease**, v.24, p.67-107, Mar. 2016.

ARATANI, Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.640, p.47-52, Jan. 2018.

ARIZZA, V., et al. Transcriptional and in silico analyses of Mif cytokine and tLR signalling interplay in the LpS inflammatory response of *Ciona robusta*. **Scientific Reports**, v.10, 11339, Jul. 2020.

ARORA, S., et al. Macrophages: Their role, activation and polarization in pulmonary diseases. **Immunobiology**, v.223, p.383-396, Mai. 2018.

ASSIS, L.V.M., et al. Melanopsin and rhodopsin mediate UVA-induced immediate pigment darkening: Unravelling and photosensitive system of the skin. **European Journal of Cell Biology**, v. 97, p. 150-162, Abr. 2018.

ATOYAN, R., SHANDER, S., BOTCHKAREVA, N.V. Non-Neuronal Expression of Transient Receptor Potential Type A1 (TRPA1) in Human Skin. **The Journal of Investigative Dermatology**, v.129, p.2312-2315, Mar. 2009.

AUBDOOL, A.A., et al. TRPA1 activation leads to neurogenic vasodilatation: involvement of reactive oxygen nitrogen species in addition to CGRP and NO. **British Journal of Pharmacology**, v.173, p.2419-2433, Ago. 2016.

AUDIGER, C., et al. The importance of dendritic cells in maintaining immune tolerance. **Journal of Immunology**, v.198, p.2223-2231, Mar. 2017.

AZIZI, G., YAZDANI, R., MIRSHAFIEY, A. Th22 cells in autoimmunity: a review of current knowledge. **European Annals of Allergy and Clinical Immunology**, v.47, p.108-117, Jul. 2015.

BABES, A., et al. Photosensitization in Porphyrias and Photodynamic Therapy Involves TRPA1 and TRPV1. **The Journal of Neuroscience**, v.36, p.5264-5278, Mai. 2016.

BABES, A., et al. Psoralens activate and photosensitize Transient Receptor Potential channels Ankyrin type 1 (TRPA1) and Vanilloid type 1 (TRPV1). **European Journal of Pain**, v.25, p.122-125, 2021.

BAEK, J.Y., et al. Protective Role of Mitochondrial Peroxiredoxin III against UVB-induced Apoptosis of Epidermal Keratinocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, v.137, p. 1333-1342, Jun. 2017.

BAIS, A.F., et al. Environmental effects of ozone depletion, UV radiation and interactions with climate change: UNEP Environmental Effects Assessment Panel, update 2017. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v.17, p.127-179, Feb. 2018.

BANDELL, M., et al. Noxious Cold Ion Channel TRPA1 Is Activated by Pungent Compounds and Bradykinin. **Neuron**, v.41, p.849-857, Mar. 2004.

BANG, S., HWANG, S.W. Polymodal Ligand Sensitivity of TRPA1 and Its Modes of Interactions. **Journal of General Physiology**, v.133, p.257-262, Mar. 2009.

BANGERT, C., BRUNNER, P.M., STINGL, G. Immune functions of the skin. **Clinics in Dermatology**, v.29, p.360-376, Ago. 2011.

BASBAUM, A.I., et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, v.139, p.267-284, Out. 2009.

BÄSLER, K., BRANDNER, J.M. Tight junctions in skin inflammation. **Pflügers Archiv: European Journal of Physiology**, v.469, p.3-14, Jan. 2017.

BAUTISTA, D.M., et al. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.102, p.12248–12252, Ago. 2005.

BAUTISTA, D.M., et al. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. **Cell**, v.124, p.1269–1282, Mar. 2006.

BAUTISTA, D.M., PELLEGRINO, M., TSUNOZAKI, M. TRPA1: A Gatekeeper for Inflammation. **Annual Review of Physiology**, v.75, p.181-200, 2013.

BELKAID, Y., SEGRE, J.A. Dialogue between skin microbiota and immunity. **Science**, v.346, p.954-959, Nov. 2014.

BELLONO, N.W., et al. UV light phototransduction activates transient receptor potential A1 ion channels in human melanocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.110, p.2383–2388, Fev. 2013.

BENÍTEZ-ANGELES, M., et al. TRPV1: Structure, Endogenous Agonists, and Mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v.21, p.3421, Mai. 2020.

BERNARD, J.J., GALLO, R.L., KRUTMANN, J. Photoimmunology: how ultraviolet radiation affects the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v.19, p.688-701, Jun. 2019.

BESSAC, B.F., et al. TRPA1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons. **The Journal of Clinical Investigation**, v.118, p.1899–1910, Mai. 2008.

BISWAS, S., DAS R., BANERJEE, E.R. Role of free radicals in human inflammatory diseases. **AIMS Biophysics**, v.4, p.596-614, Out. 2017.

BONCHAK, J.G., SWERLICK, R.A. Emerging therapies for atopic dermatitis: TRPV1 antagonists. **Journal of American Dermatology**, v.78, p.S63-S66, Mar. 2018.

BORA, N.S., et al. Protective effect of a topical sunscreen formulation fortified with melatonin against UV-induced photodermatitis: an immunomodulatory effect via NF- κ B suppression. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v.41, p.130-139, Fev. 2019.

BORKOWSKI, A.W., et al. Toll-Like Receptor 3 Activation Is Required for Normal Skin Barrier Repair Following UV Damage. **Journal of Investigative Dermatology**, v.135, p. 569-578, Fev. 2015.

BOSSCHE, J.V.D., et al. Macrophage polarization: the epigenetic point of view. **Current Opinion in Lipidology**, v.25, p.367-373, Out. 2014.

BREDERSON, J-D., KYM, P.R., SZALLASI, A. Targeting TRP channels for pain relief. **European Journal of Pharmacology**, v.716, p.61-76, Set. 2013.

CAMPONOGARA, C., et al. *Nasturtium officinale* R. Br. effectively reduces the skin inflammation induced by croton oil via glucocorticoid receptor-dependent and NF- κ B pathways without causing toxicological effects in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.229, p.190-204, Jan. 2019a.

CAMPONOGARA, C., et al. *Tabernaemontana catharinensis* leaves effectively reduce the irritant contact dermatitis by glucocorticoid receptor-dependent pathway in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.109, p.646-657, Jan. 2019b.

CAMPONOGARA, C., et al. *Tabernaemontana catharinensis* leaves exhibit topical anti-inflammatory activity without causing toxicity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.231, p.205-2016, Mar. 2019c.

CAMPONOGARA, C., et al. Neuronal and non-neuronal transient receptor potential ankyrin 1 mediates UVB radiation-induced skin inflammation in mice. **Life Sciences**, v.262, 118557, Dez. 2020.

CAMPONOGARA, C., et al. Diosmetin, a novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist, alleviates the UVB radiation-induced skin inflammation in mice. **Inflammopharmacology**, v.29, p.879-895, 2021.

CANCEL, J-C., et al. Are Conventional Type 1 Dendritic Cells Critical for Protective Antitumor Immunity and How? **Frontiers in Immunology**, v.10, 9, Fev. 2019.

CAO, E., et al. TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. **Nature**, v.504, p.113–118, Dez. 2013.

CATERINA, M.J., et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v.389, p.816-824, Out. 1997.

CATERINA, M.J. TRP Channel Cannabinoid Receptors in Skin Sensation, Homeostasis, and Inflammation. **ACS Chemical Neuroscience**, v.5, p.1107-1116, Nov. 2014.

CATERINA, M.J., PANG, Z. TRP Channels in Skin Biology and Pathophysiology. **Pharmaceuticals**, v. 9, 77, Dez. 2016.

CELA, E.M., et al. Time-course study of different innate immune mediators produced by UV-irradiated skin: comparative effects of short and daily versus a single harmful UV exposure. **Immunology**, v.145, p.82-93, Mai. 2015.

CÉSPEDES, C.L., et al. Anti-inflammatory Activity of *Aristolelia chilensis* Mol. (Stuntz) (Elaeocarpaceae). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v.9, p.127-135, Mar. 2010.

CEZAR, T.L.C., et al. Treatment with maresin 1, a docosahexaenoic acid-derived pro-resolution lipid, protects skin from inflammation and oxidative stress caused by UVB irradiation. **Scientific Reports**, v.9, 3062, Feb. 2019.

CHAMBERS, E.S., VUKMANOVIC-STEJIC, M. Skin barrier immunity and ageing. **Immunology**, v.160, p.116-125, Nov. 2019.

CHE, D.N., et al. Protective effects of grape stem extract against UVB-induced damage in C57BL mice skin. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, v. 173, p. 551-559, Ago. 2017.

CHEN, J., et al. Selective blockade of TRPA1 channel attenuates pathological pain without altering noxious cold sensation or body temperature regulation. **Pain**, v.152, p.1165–1172, Mai. 2011.

CHEN, Y.E., FISCHBACH, M.A., BELKAID, Y. Skin microbiota-host interactions. **Nature**, v.553, p.427-436, Jan. 2018.

CHEN, L., et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v.9, p.7204-7218, Jan. 2018.

CHEN, F., et al. 6-shogaol, a active constituents of ginger prevents UVB radiation mediated inflammation and oxidative stress through modulating Nrf2 signaling in human epidermal keratinocytes (HaCaT cells). **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 197, 111518, Ago. 2019.

CHEN, S.X., ZHANG, L-J., GALLO, R.L. Dermal White Adipose Tissue: A Newly Recognized Layer of Skin Innate Defense. **The Journal of Investigative Dermatology**, v.139, p.1002-1009, Mai. 2019.

CHEN, X., et al. Diosmetin induces apoptosis and enhances the chemotherapeutic efficacy of paclitaxel in non-small cell lung cancer cells via Nrf2 inhibition. **British Journal of Pharmacology**, v.176, p.2079-2094, Jan. 2019.

CHEN, L., SHEN, Z. Tissue-resident memory T cells and their biological characteristics in the recurrence of inflammatory skin disorders. **Cellular & Molecular Immunology**, v.17, p.64-75, Jan. 2020.

CHEN, S., et al. Epigenetic regulation of macrophages: from homeostasis maintenance to host defense. **Cellular & Molecular Immunology**, v.17, p.36-49, 2020.

CHESSA, C. et al. Antiviral and Immunomodulatory Properties of Antimicrobial Peptides Produced by Human Keratinocytes. **Frontiers in Microbiology**, v.11, 1155, Jun. 2020.

CHIU, I.M., VON HEHN, C.A., WOOLF, C.J. Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology. **Nature Neuroscience**, v.15, p.1063-1067, Jul. 2012.

CHO, B.O., et al. Ameliorative effects of *Diospyros lotus* leaf extract against UVB-induced skin damage in BALB/c mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.95, p.264-274, Nov. 2017.

CHOI, K-S., et al. Rutin inhibits UVB radiation-induced expression of COX-2 and iNOS in hairless mouse skin: p38 MAP kinase and JNK as potential targets. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 559, p. 38-45, Oct. 2014.

CHOI, J.E., NARDO, A.D. Skin Neurogenic Inflammation. **Seminars in Immunopathology**, v.40, p.249-259, 2018.

CHU, C., ARTIS, D., CHIU, I.M. Neuro-immune Interactions in the Tissues. **Immunity**, v.52, p.464-474, Mar. 2020.

CHUNG, G., et al. Activation of transient receptor potential ankyrin 1 by eugenol. **Neuroscience**, v. 261, p.153–160, Mar. 2014.

CLARK, R. A. Skin-Resident T Cells: The Ups and Downs of On Site Immunity. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 130, p. 362-370, Feb. 2010.

CLAYTON, K., et al. Langerhans Cells – Programmed by the Epidermis. **Frontiers in Immunology**, v.8, 1676, Nov. 2017.

COHEN, J.A., WU, J., KAPLAN, D.H. Neuronal Regulation of Cutaneous Immunity. **Journal of Immunology**, v.204, p.264-270, Jan. 2020.

COLLIN, M., MILNE, P. Langerhans cell origin and regulation. **Current Opinion in Hematology**, v.23, p.28-35, Jan. 2016.

COOPER, P.O., et al. Dermal Drivers of Injury-Induced Inflammation: Contribution of Adipocytes and Fibroblasts. **International Journal of Molecular Sciences**, v.22, 1933, Feb. 2021.

COSENS, D.J., MANNING, A. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. **Nature**. v.224, p.285-287, Oct. 1969.

CRISPIN, M.K., et al. Gene Profiling of Narrowband UVB-Induced Skin Injury Defines Cellular and Molecular Innate Immune Responses. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, p.692-701, Mar. 2013.

DAINICHI, T., HANAKAWA, S., KABASHIMA, K. Classification of inflammatory skin diseases: A proposal based on the disorders of the three-layered defense systems, barrier, innate immunity and acquired immunity. *Journal of Dermatological Science*, v.76, p.81-89, Nov. 2014.

DALLAZEM, L.N.D., et al. Knowledge and habits of sun exposure in university students: a cross-sectional study in Southern Brazil. **Brazilian Annals of Dermatology**, v.94, p.172-181, 2019.

DATASUS. Informações de Saúde: **Mortalidade Hospitalar (queimaduras e corrosão) do Sistema Único de Saúde (SUS) do Brasil**, 2021.

Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defptohtm.exe?sih/cnv/niuf.def>>.

DE BENEDETTO, A., et al. Tight Junction Defects in Atopic Dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.127, p.773-786, Mar. 2011.

DECKERS, J., HAMMAD, H., HOSTE, E. Langerhans Cells: Sensing the environment in Health and Disease. **Frontiers in Immunology**, v.9, 93, Fev. 2018.

DENDA, M., TSUTSUMI, M. Roles of Transient Receptor Potential Proteins (TRPs) in Epidermal Keratinocytes. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.704, p.847-860, 2011.

DE LOGU, F., et al. Schwann cells expressing nociceptive channel TRPA1 orchestrate ethanol-evoked neuropathic pain in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v.129, p.5424-5441, Dez. 2019.

DE LOGU, F., et al. Macrophages and Schwann cell TRPA1 mediate chronic allodynia in a mouse model of complex regional pain syndrome type I. **Brain, Behavior, and Immunity**, v.88, p.535-546, Ago. 2020.

DE PRÁ, S.D.T., et al. Antinociceptive activity and mechanism of action of hydroalcoholic extract and dichloromethane fraction of *Amphilophium crucigerum* seeds in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.195, p.283-297, Jan. 2017.

DIANZANI, C., et al. Priming effects of substance P on calcium changes evoked by interleukin-8 in human neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 69, p. 1013-1018, Jun. 2001.

DI MEGLIO, P., PERERA, G.K., NESTLE, F.O. The Multitasking Organ: Recent Insights into Skin Immune Function, **Immunity**, v.35, p.857-869, Nov. 2011.

DI NUZZO, S., et al. UVB Radiation Preferentially Induces Recruitment of Memory CD4⁺ T Cells in Normal Human Skin: Long-Term Effect After a Single Exposure. **The Journal of Investigative Dermatology**, v.110, p.978-981, Jun. 1998.

DIVYA, S.P., et al. Blackberry extract inhibits UVB-induced oxidative damage and inflammation through MAP kinases and NF- κ B signalling pathways in SKH-1 mice skin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.284, p.92-99, Abr. 2015.

DOBRZYNSKA, I., et al. Effects of rutin on the physicochemical properties of skin fibroblasts membrane disruption following UV radiation. **Chemico-Biological Interactions**, v.282, p. 29-35, Feb. 2018.

DOMÍNGUEZ, M., et al. Anti-inflammatory activity of *Penstemon gentianoides* and *Penstemon campanulatus*. **Pharmaceutical Biology**, v.49, p.118-124, Fev. 2011.

DI DOMIZIO, J., et al. The commensal skin microbiota triggers type I IFN-dependent innate repair responses in injured skin. **Nature Immunology**, v.21, p.1034-1045, Set. 2020.

DRISKELL, R.R., et al. Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. **Nature**, v.504, p.277–281, Dez. 2013.

EGEA, S.C., DICKERSON, I.M. Direct Interactions between Calcitonin-Like Receptor (CLR) and CGRP-Receptor Component Protein (RCP) Regulate CGRP Receptor Signaling. **Endocrinology**, v.153, p.1850-1860, Abr. 2012.

EL-CHAMI, C., et al. Organic osmolytes preserve the function of the developing tight junction in ultraviolet B-irradiated rat epidermal keratinocytes. **Scientific Reports**, v.8, 5167, Mar. 2018.

EYERICH, S., et al. Cutaneous Barriers and Skin Immunity: Differentiating A Connected Network. **Trends in Immunology**, v.39, p.315-327, Abr. 2018.

FANG, Q., et al. Astaxanthin protects against early burn-wound progression in rats by attenuating oxidative stress-induced inflammation and mitochondria-related apoptosis. **Scientific Reports**, v.7, p.1-13, Jan. 2017.

FAURSCHOU, A., WULF, H.C. Topical Corticosteroids in the Treatment of Acute Sunburn. **Archives of Dermatology**, v.144, p.620-624, Mai 2008.

FENG, J., et al. Sensory TRP channels contribute differentially to skin inflammation and persistent itch. **Nature Communications**, v.8, 980, Out. 2017.

FERNANDES, E.S., FERNANDES, M.A., KEEBLE, J.E. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. **British Journal of Pharmacology**, v.166, p.510-521, Mai. 2012.

FIALHO, M.F.P., et al. Topical transient receptor potential ankyrin 1 antagonist treatment attenuates nociception and inflammation in an ultraviolet B radiation-induced burn model in mice. **Journal of Dermatological Science**, v.97, p.135-142, Fev. 2020.

FINDLEY, K., GRICE, E.A. The Skin Microbiome: A Focus on Pathogens and Their Association with Skin Disease. **PLoS Pathogens**, v.10, e1004436, Nov. 2014.

FISCHETTI, L., et al. The synergistic effects of combining TLR ligand based adjuvants on the cytokine response are dependent upon p38/JNK signalling. **Cytokine**, v.99, p.287-296, Nov. 2017.

FLORES-LANGARICA, A., et al. Intestinal CD103⁺CD11b⁺ cDC2 Conventional Dendritic Cells Are Required for Primary CD4⁺ T and B Cell Responses to Soluble Flagellin. **Frontiers in Immunology**, v.9, 2409, Out. 2018.

FRAGA, I.B., et al. Influência da cicatrização e amplitude de movimento na qualidade de vida de pacientes queimados em acompanhamento ambulatorial, **Revista Brasileira de Queimaduras**, v.17, p.2-7, 2018.

FULLERTON, J.N., GILROY, D.W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. **Nature – Drug Discovery**, v.15, p.551-567, Mar. 2016.

FURMAN, D., et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. **Nature Medicine**, v.25, p.1822-1832, Dez. 2019.

FUSI, C., et al. Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) Is Downregulated in Keratinocytes in Human Non-Melanoma Skin Cancer. **Journal of Investigative Dermatology**, v.134, p.2408-2417, Abr. 2014.

GATTUSO, G., et al. Flavonoid Glycosides in Bergamot Juice (*Citrus bergamia* Risso). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.3929-3935, Jun. 2006.

GAVVA, N.R., et al. Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans. **Pain**, v.136, p.202-210, Mai. 2008.

GEGOTEK, A., et al. Time-dependent effect of rutin on skin fibroblasts membrane disruption following UV radiation. **Redox Biology**, v.12, p. 733-744, Ago. 2017.

GEPPETTI, P., et al. G Protein-Coupled Receptors: Dynamic Machines for Signaling Pain and Itch. **Neuron**, v.88, 635-649, Nov. 2015.

GINHOUX, F., et al. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. **Nature Immunology**, v.17, p.34-40, Jan. 2016.

GLADY, A., et al. Involvement of NADPH oxidase 1 in UVB-induced cell signaling and cytotoxicity in human keratinocytes. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v.14, p.7-15, Mar. 2018.

GLEDHILL, K., et al. Prostaglandin-E2 is produced by adult human epidermal melanocytes in response to UVB in a melanogenesis-independent manner. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v.23, p.394-403, Jun. 2010.

GONG, T., et al. DAMP- sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. **Nature Immunology**, v.20, p.95-112, Set. 2020.

GONZALES, K.A.U., FUCHS, E. Skin and Its Regenerative Powers: An Alliance between Stem Cells and Their Niche. **Developmental Cell**, v.43, p.387-401, Nov. 2017.

GOUIN, O., et al. Self-maintenance of neurogenic inflammation contributes to a vicious cycle in skin. **Experimental Dermatology**, v.24, p.723-726, Jul. 2015.

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

GRACE, M.S., et al. Transient receptor potential (TRP) channels in the airway: role in airway disease. **British Journal of Pharmacology**, v.171, p. 2593-2607, Mai. 2014

GRAZIOLI, S., PUGIN, J. Mitochondrial Damage-Associated Molecular Patterns: From inflammatory Signaling to Human Diseases. **Frontiers in Immunology**, v.9, 832, Mai. 2018.

GRUBER, J. V., HOLTZ, R., YANG, S. I. *In vitro* examination of an oleosome-based sun protection product on the influence of UVB-induced inflammation markers in human epidermal skin equivalent tissue model. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 179, p. 39-45, Fev. 2018.

GUILLIAMS, M., et al. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. **Nature Immunology**, v.14, p.571-578, Jul. 2014.

HAJAR, T., et al. A systematic review of topical corticosteroid withdrawal (“steroid addiction”) in patients with atopic dermatitis and other dermatoses. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.72, p.541–549, Mar. 2015.

HANIFFA, M., et al. Human Tissues Contain CD141hi Cross-Presenting Dendritic Cells with Functional Homology to Mouse CD103+ Nonlymphoid Dendritic Cells. **Immunity**, v.37, p.60-73, Jul. 2012.

HARDIE, R.C. TRP channels and lipids: from *Drosophila* to mammalian physiology. **Journal of Physiology**, v.578, p.9-24, Jan. 2007.

HATAKEYAMA, M., et al Anti-Inflammatory Role of Langerhans Cells and Apoptotic Keratinocytes in Ultraviolet-B–Induced Cutaneous Inflammation. **The Journal of Immunology**, v.199, p.2937-2947, Out. 2017.

HAWKSHAW, N.J., et al. UV radiation recruits CD4+GATA3+ and CD8+GATA3+ T cells while altering the lipid microenvironment following inflammatory resolution in human skin *in vivo*. **Clinical & Translational Immunology**, v.9, e01104, Abr. 2020.

HAYES, P., et al. Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1. **Pain**, v.88, p.205-215, Nov. 2000.

HEALTH, W.R., CARBONE, F.R. The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells. **Nature Immunology**, v.14, p.975-985, Out. 2013.

HEDL, M. et al. IRF5 is required for Bacterial Clearance in Human M1-Polarized Macrophages and *IRF5* Immune-Mediated Disease Risk Variants Modulate This Outcome. **Journal of Immunology**, v.202, p.920-930, Fev. 2019.

HENGGE, U.R., et al. Adverse effects of topical glucocorticosteroids. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 54, p. 1–15, Jan. 2006.

HENNINGS, H., et al. Calcium Regulation of Growth and Differentiation of Mouse Epidermal Cells in Culture. **Cell**, v.19, p.245-254, Jan. 1980.

HILL, K., SCHAEFER, M. TRPA1 Is Differentially Modulated by the Amphipathic Molecules Trinitrophenol and Chlorpromazine. **Journal of Biological Chemistry**, v.282, p.7145-7153, Mar. 2007.

HILL, K., SCHAEFER, M. Ultraviolet light and photosensitising agents activate TRPA1 via generation of oxidative stress. **Cell Calcium**, v.45, p.155-164, Fev. 2009.

HIMI, N., et al. Calcium influx through the TRPV1 channel of endothelial cells (ECs) correlates with a stronger adhesion between monocytes and ECs. **Advances in Medical Sciences**, v.57, p.224-229, 2012.

HINMAN, A., et al. TRP channel activation by reversible covalent modification. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.103, p.19565-19568, Dez. 2006.

HIRAI, T., et al. Keratinocyte-mediated activation of the cytokine TGF β maintains skin-recirculating memory CD8⁺ T cells. **Immunity**, v.50, p.1249-1261, Mai, 2019.

HO, A.W., KUPPER, T.S. T cells and the skin: from protective immunity to inflammatory skin disorders. **Nature Immunology**, v.19, p.490-502, Ago. 2019.

HOU, X., et al. Overexpression of Fibulin-5 attenuates burn-induced inflammation via TRPV1/CGRP pathway. **Experimental Cell Research**, v.357, p.320-327, Ago. 2017.

HOEFFEL, G., GINHOUX, F. Ontogeny of tissue-resident macrophages. **Frontiers in Immunology**, v.6, 486, Set. 2015.

HORVÁTH, G., et al. Effects of Some Natural Carotenoids on TRPA1- and TRPV1-Induced Neurogenic Inflammatory Processes In Vivo in the Mouse Skin. **Journal of Molecular Neuroscience**, v.56, p.113-121, Mai, 2015.

HU, H., et al. Activation of TRPA1 channels by fenamate nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v.459, p.579-592, Nov. 2009.

HUANG, K-F., et al. Ultraviolet B irradiation increases keratin 1 and keratin 10 expressions in HaCaT keratinocytes via TRPV1 activation and ERK phosphorylation. **Experimental Dermatology**, v.26, p.832-835, Set. 2017.

HUANG, K-F., et al. A new copper ionophore DPMQ protects cells against ultraviolet B irradiation by inhibiting the TRPV1 channel. **Journal of Cellular Physiology**, v.233, p.9594-9610, Dez. 2018.

HUANG, K-F., et al. Baicalein inhibits matrix metalloproteinase 1 expression via activation of TRPV1-Ca-ERK pathway in ultraviolet B- irradiated human dermal fibroblasts. **Experimental Dermatology**, v.28, p.568-575, Mai. 2019.

HUR, S., et al. Homoisoflavanone inhibits UVB-induced skin inflammation through reduced cyclooxygenase-2 expression and NF- κ B nuclear localization. **Journal of Dermatological Science**, v. 59, p. 163-169, Set. 2010.

HWANG, S.W., et al. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.97, p.6155–6160, 2000.

HWANG, Y.P., et al. N-Acetylglucosamine suppress collagenases activation in ultraviolet B-irradiated human dermal fibroblasts: Involvement of calcium ions and mitogen-activated protein kinases. **Journal of Dermatological Science**, v.63, p.93-103, Ago. 2011.

HWANG, J., et al. Photoprotective Activity of Topsentin, A Bis (Indole) Alkaloid from the Marine Sponge *Spongosorites genitrix*, by Regulation of COX-2 and Mir-4485 Expression in UVB-Irradiated Human Keratinocyte Cells. **Marine Drugs**, v.18, p.1-12, Jan. 2020.

HØJLAND, C.R., et al. A Human Surrogate Model of Itch Utilizing the TRPA1 Agonist Trans-cinnamaldehyde. **Acta dermato-Venereologica**, v.95, p.798-803, Set. 2015.

IVAN, A.L.M., et al. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits UVB-induced skin inflammation and oxidative stress in hairless mice and exhibits antioxidant activity *in vitro*. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 138, p. 124-133, Set. 2014.

JAIN, A., et al. TRP-channel-specific cutaneous eicosanoid release patterns. **Pain**, v.152, p. 2765-2772, Dez. 2011.

JAQUEMAR, D., SCHENKER, T., TRUEB, B. An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts. **The Journal of Biological Chemistry**, v.274, p.7325–7333, 1999.

JANCSÓ, N., JANCSÓ-GÁBOR, A., SZOLCSÁNYI, J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v.31, p.138-151, Set. 1967.

JESCHKE, M.G., et al. Burn Injury. **Nature Reviews Disease Primers**, v.6, 11, Fev. 2020.

Ji, C., et al. Salubrinal protects human skin fibroblasts against UVB-induced cell death by blocking endoplasmic reticulum (ER) stress and regulating calcium homeostasis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 493, p. 1371-1376, Dez. 2017.

JIA, Z., et al. Calycosin alleviates allergic contact dermatitis by repairing epithelial tight junctions via down-regulating HIF-1 α . **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.22, p.4507-4521, Set. 2018.

JIAN, W., et al. Toll-like receptor 7 contributes to inflammation, organ injury, and mortality in murine sepsis. **Anesthesiology**, v.131, p.105-118, Jul. 2019.

JIANG, S.J., et al. Ultraviolet B-induced alterations of the skin barrier and epidermal calcium gradient. **Experimental Dermatology**, v.16, p.985-992, 2007.

JIANG, Y., et al. Cytokines: the diverse contribution of keratinocytes to immune responses in skin. **JCI Insight**, v.5, e142067, Out. 2020.

KABASHIMA K., et al. The immunological anatomy of the skin. **Nature Immunology**, v.19, p.19-30, Jan. 2019.

KANAOKA, M., et al. Pro-fibrotic phenotype of human skin fibroblasts induced by periostin via modulating TGF- β signaling. **Journal of Dermatological Science**, v.90, p.199-208, Mai. 2018.

KANEKO, Y., SZALLASI, A. Transient receptor potential (TRP) channels: a clinical perspective. **British Journal of Pharmacology**, v.171, p.2474-2507, Mai. 2014.

KANG, S.M., et al. A synthetic peptide blocking TRPV1 activation inhibits UV-induced skin responses. **Journal of Dermatological Science**, v.88, p.126-133, Out. 2017.

KANN, L., et al. Youth Risk Behavior Surveillance—United States, 2017. **The Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) Surveillance Summaries**, v.67, p.1-114, 2018.

KAPLAN, D.H. Ontogeny and function of epidermal murine Langerhans cells. **Nature Immunology**, v.18, p.1068-1075, Set. 2017.

KARTHIKEYAN, R., et al. 7-Hydroxycoumarin prevents UVB-induced activation of NF- κ B and subsequent overexpression of matrix metalloproteinases and inflammatory markers in human dermal fibroblast cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, v.161, p.170-176, Ago. 2016.

KASHEM, S.W., HANIFFA, M., KAPLAN, D.H. Antigen-Presenting Cells in the Skin. **Annual Review of Immunology**, v.35, p.469-499, Fev. 2017.

KENDALL, R.T., FEGHALI-BOSTWICK, C.A. Fibroblasts in fibrosis: Novel roles and mediators. **Frontiers in Pharmacology**, v.5, 123, Mai. 2014.

KHALIL, M., et al. Functional Role of Transient Receptor Potential Channels in immune Cells and epithelia, **Frontiers in Immunology**, v.9, 174, Fev. 2018.

KIM, Y., et al. The anti-inflammatory effect of alloferon on UVB-induced skin inflammation through the down-regulation of pro-inflammatory cytokines. **Immunology Letters**, v.149, p.110-118, Jan. 2013.

KIM, M-S., et al. Acute exposure of human skin to ultraviolet or infrared radiation or heat stimuli increases mast cell numbers and tryptase expression in human skin *in vivo*. **British Journal of Dermatology**, v.160, p.393-402, 2009.

KIM, S-B., et al. Protective effect of ixerisoside A against UVB-induced pro-inflammatory cytokine production in human keratinocytes. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 35, p. 1411-1418, Mar. 2015.

KITASHIMA, D.Y., et al. Langerhans Cells Prevent Autoimmunity via Expansion of Keratinocyte Antigen-Specific Regulatory T Cells. **EBioMedicine**, v.27, p.293-303, Jan. 2018.

KLEBANOFF, S.J., et al. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. **Journal of Leukocyte Biology**, v.93, p.185-198, Fev. 2013.

KLICZNICK, M.M., et al. Taking the lead – how keratinocytes orchestrate skin T cell immunity. **Immunology Letters**, v.200, p.43-51, Ago. 2018.

KODJI, X., et al. Sensory nerves mediate spontaneous behaviors in addition to inflammation in a murine model of psoriasis. **The FASEB Journal**, v. 33, p.1578-1594, Fev. 2019.

KOLACZKOWSKA, E., KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Immunology**, v.13, p.159-175, 2013.

KREMER, J.L., et al. Citral prevents UVB-induced skin carcinogenesis in hairless mice. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v.198, 111565, Set. 2019.

KRZYSZCZYK, P., et al. The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes. **Frontiers in Physiology**, v.9, 419, Mai. 2018.

KULKA, M., et al. Neuropeptides activate human mast cell degranulation and chemokine production. **Immunology**, v.123, p.398-410, Mar. 2008.

KUMAR, S., et al. Nitric Oxide-Mediated Augmentation of Neutrophil Reactive Oxygen and Nitrogen Species Formation: Critical Use of Probes. **Cytometry Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology**, v.77, p.1038-1048, Nov. 2010.

KUMAR, K.P., NICHOLLS, A.J., WONG, C.H.Y. Partners in crime: neutrophils and monocytes/macrophages in inflammation and disease. **Cell and Tissue Research**, v.371, p.551-565, Mar. 2018.

KUMAR, J.P., MANDAL, B.B. Inhibitory role of silk cocoon extract against elastase, hyaluronidase and UV radiation-induced matrix metalloproteinase expression in human dermal fibroblasts and keratinocytes. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.18, p.1259-1274, Mai, 2019.

KUMAR, S., et al. Dendritic Cell-Mediated Th2 Immunity and Immune Disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v.20, 2159, Mai. 2019.

KUN, J., et al. Effect of surgical and chemical sensory denervation on non-neural expression of the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptors in the rat. **Journal of Molecular Neuroscience**, v.48, p. 795-803, Nov. 2012.

KUO, Y-H., et al. N-(4-bromophenethyl) Caffeamide Protects Skin from UVB-Induced Inflammation Through MAPK/IL-6/NF- κ B-Dependent Signaling in Human Skin Fibroblasts and Hairless Mouse Skin. **Molecules**, v.22, p. 1-14, Set. 2017.

KUROHANE, K., et al. Adjuvant Effect of an Alternative Plasticizer, Diisopropyl Adipate, on a Contact Hypersensitivity Mouse Model: Link with Sensory Ion Channel TRPA1 Activation. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.38, p.1054-1062, Mai. 2015.

KUSUMANINGRUM, N., et al. Gasdermin C is induced by ultraviolet light and contributes to MMP-1 expression via activation of ERK and JNK pathways. **Journal of Dermatological Science**, v.90, p.180-189, Mai. 2018.

LAMBETH, J.D. Nox enzymes and the biology of reactive oxygen. **Nature Reviews Immunology**, v.4, p.181-189, Mar. 2004.

LAN, C.C.E., et al. Irradiance-dependent UVB Photocarcinogenesis. **Scientific Reports**, v.6, p.1-11, Nov. 2016.

LAURSEN, W.J., et al Low-cost functional plasticity of TRPV1 supports heat tolerance in squirrels and camels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.113, p.11342–11347, Out. 2016.

LEBWOHL, M.G., TANGHETTI, E.A., GOLD, L.T. Fixed-Combination Halobetasol Propionate and Tazarotene in the Treatment of Psoriasis: Narrative Review of Mechanisms of Action and Therapeutic Benefit. **Dermatology and Therapy**, v.11, p.1157-1174, Jun. 2021.

LEE, Y.M., et al. A Novel Role for the TRPV1 Channel in UV-Induced Matrix Metalloproteinase (MMP)-1 Expression in HaCaT Cells. **Journal of Cellular Physiology**, v.219, p.766-775, Jun. 2009.

LEE, Y.M., et al. Inhibitory effects of TRPV1 blocker on UV-induced responses in the hairless mice. **Archives of Dermatological Research**, v.303, p.727-736, Dez. 2011.

LEE, Y.M., KANG, S.M., CHUNG, J.H. The role of TRPV1 channel in aged human skin. **Journal of Dermatological Science**, v.65, p.81-85, Fev. 2012.

LEE, B., et al. (2R/S,4R)-2-(2,4-Dihydroxyphenyl)thiazolidine-4-carboxylic acid prevents UV-induced wrinkle formation through inhibiting NF- κ B-mediated inflammation. **Journal of Dermatological Science**, v.79, p. 313–316, Set. 2015.

LEE, S., et al. Transglutaminase 2 mediates UV-induced skin inflammation by enhancing inflammatory cytokine production. **Cell Death and Disease**, v.8, p. 1-11, Out. 2017.

LEE, J-H., et al. A novel, topical, nonsteroidal, TRPV1 antagonist, PAC-14028 cream improves skin barrier function and exerts anti-inflammatory action through modulating epidermal differentiation markers and suppressing Th2 cytokines in atopic dermatitis. **Journal of Dermatological Science**, v.91, p.184-194, Ago. 2018.

LEE, S.E., LEE, S.H. Skin Barrier and Calcium. **Annals of Dermatology**, v.30, p.265-275, Jun. 2018.

LEE, Y.M., et al. Efficacy and safety of PAC-14028 cream – a novel, topical, nonsteroidal, selective TRPV1 antagonist in patients with mild-to-moderate atopic dermatitis: a phase IIb randomized trial. **British Journal of Dermatology**, v.180, p.1030-1038, Mai. 2019.

LEE, D-H., et al. Anti-inflammatory effects of natural flavonoid diosmetin in IL-4 and LPS-induced macrophage activation and atopic dermatitis model. **International Immunopharmacology**, v.89, 107046, Dez. 2020.

LEGAT, F.J., et al. Repeated subinflammatory ultraviolet B irradiation increases substance P and calcitonin gene-related peptide content and augments mustard oil-induced neurogenic inflammation in the skin of rats. **Neuroscience Letters**, v.329, p. 309-313, Set. 2002.

LEGAT, F.J., et al. The role of calcitonin gene-related peptide in cutaneous immunosuppression induced by repeated subinflammatory ultraviolet irradiation exposure. **Experimental Dermatology**, v.13, p.242-250, Abr. 2004.

LEGAT, F.J. The Antipruritic Effect of Phototherapy. **Frontiers in Medicine**, v.5, 333, Nov. 2018.

LI, N., et al. Astragalin Attenuates UVB Radiation-induced Actinic Keratosis Formation. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 1001-1008, 2018.

LI, X-Q., et al. Liquiritin suppresses UVB-induced skin injury through prevention of inflammation, oxidative stress and apoptosis through the TLR4/MyD88/NF- κ B and MAPK/caspase signaling pathways. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 42, p.1445-1459, Set. 2018.

LIAO, M., et al. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. **Nature**, v.504, p.107-112, Dez. 2013.

LIAO, W., et al. Intracellular Antioxidant Detoxifying Effects of Diosmetin on 2,2-Azobis(2-amidinopropane) Dihydrochloride (AAPH)-Induced Oxidative Stress through Inhibition of Reactive Oxygen Species Generation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.62, p.8648-8654, Ago. 2014.

LIM, K-M., PARK, Y-H. Development of PAC-14028, a Novel Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) Channel Antagonist as a New Drug for Refractory Skin Diseases. **Archives of Pharmacal Research**, v.35, p.393-396, Mar. 2012.

LITTLE, A.J., VESELY, M.D. Cutaneous Lupus Erythematosus: Current and Future Pathogenesis-Directed Therapies. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v.27, p.81-95, Mar. 2020.

LIU, B., et al. TRPA1 controls inflammation and pruritogen responses in allergic contact dermatitis. **The FASEB Journal**, v.27, p.3549-3563, Mai. 2013.

LIU, Y., et al. Effect of ultraviolet radiation on expression of transient receptor potential ankyrin 1 in HaCaT cells. **Chinese Journal of Dermatology**, v.12, p.710-714, 2017.

LIU, Q., et al. Diosmetin Alleviates Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury through Activating the Nrf2 Pathway and Inhibiting the NLRP3 Inflammasome. **Biomolecules & Therapeutics**, v.26, p.157-166, Mar. 2018.

LOPES, D.M., MCMAHON, S.B. Ultraviolet Radiation on the Skin: A Painful Experience? **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 22, p. 118–126, Fev. 2016.

- LOTTI, T., D'ERME, A.M., HERCOGOVÁ, J. The role of neuropeptides in the control of regional immunity. **Clinics in Dermatology**, v.32, p. 633-645, Set-Out. 2014.
- LOWY, D.B., MAKKER, P.G.S., MOALEM-TAYLOR, G. Cutaneous Neuroimmune Interactions in Peripheral Neuropathic Pain States. **Frontiers in Immunology**, v.12, 660203, Abr. 2021.
- LU, W., WU, S. Mechanism for Dynamic Regulation of iNOS Expression After UVB-Irradiation. **Molecular Carcinogenesis**, v.52, p.627-633, Ago. 2013.
- MA, W., QUIRION, R. Inflammatory mediators modulating the transient receptor potential vanilloid 1 receptor: therapeutic targets to treat inflammatory and neuropathic pain. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v.11, p.307-320, Mar. 2007.
- MACLEOD, A.S., et al. Skin-resident T cells sense ultraviolet radiation-induced injury and contribute to DNA repair. **Journal of Immunology**, v.192, p.5695-5702, Jun. 2014.
- MACPHERSON, L.J., et al. The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. **Current Biology**, v.15, p.929-934, 2005.
- MAGCWEBEBA, T., et al. Anti-Inflammatory Effects of *Aspalathus linearis* and *Cyclopia* spp. Extracts in a UVB/Keratinocyte (HaCaT) Model Utilising Interleukin-1 α Accumulation as Biomarker. **Molecules**, v.21, 1323, Out. 2016.
- MAGLIE, R., et al. The Role of TRPA1 in Skin Physiology and Pathology. **International Journal of Molecular Sciences**, v.22, 3065, Mar. 2021.
- MALEK, N., et al. The importance of TRPV1-sensitisation factors for the development of neuropathic pain. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v.65, p.1-10, Mar. 2015.
- MARANGONI, R.G., et al. Adiponectin is an endogenous anti-fibrotic mediator and therapeutic target. **Scientific Reports**, v.7, 4397, Jun. 2017.
- MARTINEZ, F.O., GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000Prime Reports**, v.6, 13, Mar. 2014.
- MARTINEZ, R.M., et al. Topical formulation containing naringenin: Efficacy against ultraviolet B irradiation-induced skin inflammation and oxidative stress in mice. **PLoS One**, v. 11, p. 1-21, Jan. 2016.
- MARTINEZ, R.M., et al. trans-Chalcone, a flavonoid precursor, inhibits UV-induced skin inflammation and oxidative stress in mice by targeting NADPH oxidase and cytokine production. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 16, p. 1162-1173, Jul. 2017.
- MARTINEZ, R.M., et al. The Lipoxin Receptor/FPR2 Agonist BML-111 Protects Mouse Skin against Ultraviolet B Radiation. **Molecules**, v.25, 2953, Jun. 2020.
- MASS, S.L., SOEHNELEIN, O., VIOLA, J.R. Organ-Specific Mechanisms of Transendothelial Neutrophil Migration in the Lung, Liver, Kidney, and Aorta. **Frontiers in Immunology**, v.9, 2739, Nov. 2018.

MATEJUK, A. Skin Immunity. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v.66, p.45-54, 2018.

MATERAZZI, S., et al. Cox-dependent fatty acid metabolites cause pain through activation of the irritant receptor TRPA1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.105, p.12045–12050, Ago. 2008.

MATSUI, T., AMAGAI, M. Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum. **International Immunology**, v.27, p.269-280, Jun. 2015.

MATSUI, K., MORI, A., IKEDA, R. Langerhans cell-like dendritic cells stimulated with an adjuvant direct the development of Th1 and Th2 cells *in vivo*. **Clinical and Experimental Immunology**, v.182, p.101-107, Out. 2015.

MATSUMURA, Y., ANANTHASWAMY, H.N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 195, p. 298-308, Mar. 2004.

MATTA, J.A., et al. General anesthetics activate a nociceptive ion channel to enhance pain and inflammation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.105, p.8784-8789, Jun. 2008.

MCNAMARA, C.R., et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.104, p.13525–13530, 2007.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v.454, p.428-435, Jul. 2008.

MEHTA, D., GRANSTEIN, R.D. Immunoregulatory Effects of Neuropeptides on Endothelial Cells: Relevance to Dermatological Disorders. **Dermatology**, v.235, p.175-186, Fev. 2019.

MEIRINHOS, J., et al. Analysis and quantification of flavonoidic compounds from portuguese olive (*Olea europaea* l.) leaf cultivars. **Natural Product Research**, v.19, p.189-195, Fev. 2005.

MELNIKOVA, V.O., et al. Fate of UVB-induced p53 mutations in SKH-hr1 mouse skin after discontinuation of irradiation: relationship to skin cancer development. **Oncogene**, v.24, p.7055-7063, Jul. 2005.

MERAD, M., GINHOUX, F., COLLIN, M. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin- expressing dendritic cells. **Nature Immunology**, v.8, p. 935-947, Dez. 2008.

METZEMAEKERS, M., GOUWY, M., PROOST, P. Neutrophil chemoattractant receptors in health and disease: double-edged swords. **Cellular & Molecular Immunology**, v.17, p.433-450, Abr. 2020.

MEYER, P.F., et al. Inquiry on the sun exposition in beach workers. **Revista Brasileira de Promoção a Saúde**, v. 25, p. 103-109, 2012.

MICHAEL, C.K.T. The Pivotal Role of Transient Receptor Potential (TRP) Ion Channels in the Pathogenesis of Sensitive Skin. **Research Journal of Nervous System**, v.1, p.1-7, Dez. 2017.

MIGUEL, D., et al. Mechanisms of action of topical corticosteroids in psoriasis. **International Journal of Endocrinology**, v.2012, 561018, 2012.

MIKAMI, N., et al. Calcitonin Gene-Related Peptide Is an Important Regulator of Cutaneous Immunity: Effect on Dendritic Cell and T Cell Functions. **The Journal of Immunology**, v.186, p.6886-6893, jun. 2011.

MINKE, B., WU, C.F., PAK, W.L. Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant. **Nature**, v.258, p. 84-87, Nov. 1975.

MINKE, B. The history of the *Drosophila* TRP channel: The birth of a new channel superfamily. **Journal of Neurogenetics**, v.24, p.216-233, Dez. 2010.

MILLS, C.D., et al. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. **The Journal of Immunology**, v.164, p.6166-6173, Jun. 2000.

MILLS, C.D. Anatomy of a discovery: M1 and M2 macrophages. **Frontiers in Immunology**, v.6, 212, Mai 2015.

MIRZOEVA, S., et al. Apigenin Inhibits UVB-Induced Skin Carcinogenesis: The Role of Thrombospondin-1 as an Anti-inflammatory Factor. **Neoplasia**, v.20, p. 930-942, Set. 2018.

MITTAL, M., et al. Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.20, p.1126-1167, Mar. 2014.

MITROULIS, I., et al. Leukocyte integrins: Role in leukocyte recruitment and as therapeutic targets in inflammatory disease. **Pharmacology & Therapeutics**, v.147, p.123-135, Mar. 2015.

MOISEENKOVA-BELL, V.Y., et al. Structure of TRPV1 channel revealed by electron cryomicroscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.105, p.7451-7455, Mai. 2008.

MONTELL, C., et al. A Unified Nomenclature for the Superfamily of TRP Cation Channels. **Molecular Cell**, v.9, p.229-231, Fev. 2002.

MONTI, M., et al. Human Plasmacytoid Dendritic Cells and Cutaneous Melanoma. **Cells**, v.9, 417, Fev. 2020.

MOORE, J., et al. Effects of Ultraviolet B Exposure on the Expression of Proliferating Cell Nuclear Antigen in Murine Skin. **Photochemistry and Photobiology**, v.80, p. 587-595, Nov-Dez. 2004.

MOPARTHI, L., et al. Human TRPA1 is a heat sensor displaying intrinsic U-shaped thermosensitivity. **Scientific Reports**, v.6, 28763, Jun. 2016.

MORAN, M.M., et al. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. **Nature Drug Discovery**, v.10, p.601-620, Ago. 2011.

MORAN, M.M., SZALLASI, A. Targeting nociceptive transient receptor potential channels to treat chronic pain: current state of the field. **British Journal of Pharmacology**, v.175, p.2185-2203, Jun. 2018.

MORI, Y., et al. Redox-sensitive transient receptor potential channels in oxygen sensing and adaptation. **Pflügers Archiv: European Journal of Physiology**, v.468, p.85-97, 2016.

MUKAIYAMA, M., USUI, T., NAGUMO, Y. Non-electrophilic TRPA1 agonists, menthol, carvacrol and clotrimazole, open epithelial tight junctions via TRPA1 activation. **Journal of Biochemistry**, v.168, p.407-415, Out. 2020.

MUKHOPADHYAY, I., et al. Expression of functional TRPA1 receptor on human lung fibroblast and epithelial cells. **Journal of Receptor and Signal Transduction Research**, v.31, p.350–358, 2011.

MULLER, W.A. Transendothelial Migration: Unifying Principles from the Endothelial Perspective. **Immunological Reviews**, v.273, p.61-75, Set. 2016.

MURATA, M., et al. Oral administration of bovine lactoferrin attenuates ultraviolet B-induced skin photodamage in hairless mice. **Journal of Dairy Science**, v.97, p. 651-658, Fev. 2014.

MUTHUSAMY, V., PIVA, T.J. The UV response of the skin: A review of the MAPK, NF- κ B and TNF- α signal transduction pathways. **Archives of Dermatological Research**, v.302, p. 5–17, Jan. 2010.

MUZAFFER, U., et al. Protective effect of *Juglans regia* L., against ultraviolet-B induced photoaging in human epidermal keratinocytes. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 111, p. 724-732, Mar. 2019.

NAHRENDORF, M., SWIRSKI, F.K. Abandoning M1/M2 for a Network Model of Macrophage Function. **Circulation Research**, v.119, p.414-417, Jul. 2016.

NAKAGAWA, N., SANO, H., IWAMOTO, I. Substance P Induces the Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 on Vascular Endothelial Cells and Enhances Neutrophil Transendothelial Migration. **Peptides**, v.16, p. 721-725, Jul. 1995.

NASSINI, R., et al. The TRPA1 Channel in Inflammatory and Neuropathic Pain and Migraine. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v.167, p.1-43, 2014.

NATARAJAN, V.T., et al. Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation. **Nature Chemical Biology**, v. 10, p.542-551, Jul. 2014.

NATSUAKI, Y., et al. 2014. Perivascular leukocyte clusters are essential for efficient activation of effector T cells in the skin. **Nature Immunology**, v.15, p.1064–1069, Nov. 2014.

NATTKEMPER, L.A., et al. The genetics of chronic itch: gene expression in the skin of atopic dermatitis and psoriasis patients with severe itch. **The Journal of Investigative Dermatology**, v.138, p.1311-1317, Jun. 2018.

NERSESYAN, Y., et al. Oxytocin modulates nociception as an agonist of pain-sensing TRPV1. **Cell Reports**, v.21, p.1681–1691, 2017.

NESTLE, F.O., et al. Skin immune sentinels in health and disease. **Nature Immunology**, v.9, p.679-691, Nov. 2009.

NETEA, M.G., et al. A guiding map for inflammation. **Nature Immunology**, v.18, p.826-831, Jul. 2017.

NGUYEN, A.V., SOULIKA, A.M. The Dynamics of the Skin's Immune System. **International Journal of Molecular Sciences**, v.20, 1811, Abr. 2019.

NILIUS, B., et al. Transient receptor potential cation channels in disease. **Physiological Reviews**, v.87, p.165–217, Jan. 2007.

NILIUS, B., OWSIANIK, G. The transient receptor potential family of ion channels. **Genome Biology**, v.12, 218, 2011.

NISSINEN, L., KÄHÄRI, V-M. Matrix metalloproteinases in inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1840, p.2571-2580, Ago. 2014.

NORÕES, M.M., et al. Role of TRPA1 receptors in skin inflammation induced by volatile chemical irritants in mice. **European journal of Pharmacology**, v.858, 172460, Set. 2019.

OAK, C., et al. Diosmetin suppresses human prostate cancer cell proliferation through the induction of apoptosis and cell cycle arrest. **International Journal of Oncology**, v.53, p.835-843, Ago. 2018.

ODOBASIC, D., KITCHING, A.R., HOLDSWORTH, S.R. Neutrophil-Mediated Regulation of Innate and Adaptive Immunity: The Role of Myeloperoxidase. **Journal of Immunology Research**, v.2016, 2349817, Jan. 2016.

OISHI, Y., MANABE, I., Macrophages in inflammation, repair and regeneration. **International Immunology**, v.30, p.511-528, Ago. 2018.

OKABE, T., et al. The release of leukotriene B4 from human skin in response to substance P: evidence for the functional heterogeneity of human skin mast cells among individuals. **Clinical and Experimental Immunology**, v.124, p.150-156, Abr. 2001.

OLIVEIRA, M.M.F. Radiação ultravioleta/índice ultravioleta e câncer de pele no Brasil: condições ambientais e vulnerabilidades sociais. **Revista Brasileira de Climatologia**, v.13, p.60-73, 2014.

OLIVEIRA, S. et al. Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. **Nature Immunology**, v.16, p.378-391, Mai. 2016.

ONO, R., et al. Suppressive effect of recombinant human thioredoxin on ultraviolet light-induced inflammation and apoptosis in murine skin. **The Journal of Dermatology**, v.39, p. 843-851, Oct. 2012.

ONO, S., KABASHIMA, K. Proposal of inducible skin-associated lymphoid tissue (iSALT). **Experimental Dermatology**, v.24, p.630-631, Abr. 2015.

OSAKI, T., NAKAGAWARA, A. Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. **Cancers**, v.3, p.994-1013, Mar. 2011.

OTSUKA, M., EGAWA, G., KABASHIMA, K. Uncovering the Mysteries of Langerhans Cells, inflammatory Dendritic epidermal Cells, and Monocyte-Derived Langerhans Cell-Like Cells in the epidermis. **Frontiers in Immunology**, v.9, 1768, Jul. 2018.

OYOSHI, M.K., et al. Eosinophil-derived leukotriene C4 signals via type 2 cysteinyl leukotriene receptor to promote skin fibrosis in a mouse model of atopic dermatitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.109, p.4992-4997, Mar. 2012.

PAL, H.C., et al. Fisetin inhibits UVB-induced cutaneous inflammation and activation of PI3K/AKT/NFκB signaling pathways in SKH-1 hairless mice. **Photochemistry and Photobiology**, v.91, p.225-234, Jan-Fev. 2015.

PARENTI, A., et al. What is the evidence for the role of TRP channels in inflammatory and immune cells? **British Journal of Pharmacology**, v.173, p.953-969, Mar. 2016.

PARK, Y-H., et al. Oral and topical pharmacokinetic studies of a novel TRPV1 antagonist, PAC-14028 in rats and minipigs using liquid chromatography/tandem mass spectrometric method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.61, p.8-14, Mar. 2012.

PARK, H.S., et al. Toll-like receptor 2 mediates a cutaneous reaction induced by repetitive ultraviolet B irradiation in C57BL mice *in vivo*. **Experimental Dermatology**, v. 23, p. 591-595, Ago. 2014.

PARK, J., LANGMEAD, C.J., RIDDY, D.M. New Advances in Targeting the Resolution of Inflammation: Implications for Specialized Pro-Resolving Mediator GPCR Drug Discovery. **ACS Pharmacology and Translational Science**, v.3, p.88-106, Jan. 2020.

PARK, S., et al. Diosmetin and Its Glycoside, Diosmin, Improve Atopic Dermatitis- Like Lesions in 2,4-Dinitrochlorobenzene-Induced Murine Models. **Biomolecules & Therapeutics**, v.28, p.542-548, Set. 2020.

PASPARAKIS, M., HAASE, I., NESTLE, F.O. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. **Nature Immunology**, v.14, p.289-301, Abr. 2014.

PATIL, M.J., JESKE, N.A., AKOPIAN, A.N. Transient receptor potential V1 regulates activation and modulation of transient receptor potential A1 by Ca²⁺. **Neuroscience**, v.171, p.1109–1119, 2010.

PATRA, V., et al. A Perspective on the Interplay of Ultraviolet-Radiation, Skin Microbiome and Skin Resident Memory TCR $\alpha\beta$ + Cells. **Frontiers in Medicine**, v.5, 166, Mai. 2018.

PECZE, L., et al. Human Keratinocytes Are Vanilloid Resistant. **PLoS One**, v.3, p. 1-10, 2008.

PECZE, L., et al. Resiniferatoxin mediated ablation of TRPV1+ neurons removes TRPA1 as well. **Canadian Journal of Neurological Sciences**, v.36, p.234-241, Mar. 2009.

PEGORARO N.S., et al. Nanoencapsulation of coenzyme Q10 and vitamin E acetate protects against UVB radiation-induced skin injury in mice. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.150, p.32-40, Fev. 2017.

PEGORARO N.S., et al. Oleic acid-containing semisolid dosage forms exhibit in vivo anti-inflammatory effect via glucocorticoid receptor in a UVB radiation-induced skin inflammation model. **Inflammopharmacology**, v.28, p.773-786, Jun. 2020.

PÉREZ-SÁNCHEZ, A., et al. Lemon balm extract (*Melissa officinalis*, L.) promotes melanogenesis and prevents UVB-induced oxidative stress and DNA damage in a skin cell model. **Journal of Dermatological Science**, v.84, p.169-177, Nov. 2016.

PÉREZ-FIGUEROA, E., et al. Neutrophils: Many Ways to Die. **Frontiers in Immunology**, v.12, 631821, Mar, 2021.

PERMATASARI, F., ZHOU, B., LUO, D. Epidermal barrier: Adverse and beneficial changes induced by ultraviolet B irradiation depending on the exposure dose and time (Review). **Experimental and Therapeutic Medicine**, v.6, p.287-292, Ago. 2013.

PETERS, E.M.J., et al. Neuropeptide Control Mechanisms in Cutaneous Biology: Physiological and Clinical Significance. **Journal of Investigative Dermatology**, v.126, p. 1937-1947, Set. 2006.

PETERS, E.M.J., et al. The neuroimmune connection interferes with tissue regeneration and chronic inflammatory disease in the skin. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v.1262, p.118-126, Jul. 2012.

PETERSEN, C.C., et al. Putative capacitative calcium entry channels: expression of *Drosophila* trp and evidence for the existence of vertebrate homologues. **Biochemical Journal**, v.311, p.41-44, Out. 1995.

PHAN, Q.M., et al. Single-cell transcriptomic analysis of small and large wounds reveals the distinct spatial organization of regenerative fibroblasts. **Experimental Dermatology**, v.30, p.92–101, Jan. 2021.

PHILIPPEOS, C., et al. Spatial and Single-Cell Transcriptional Profiling Identifies Functionally Distinct Human Dermal Fibroblast Subpopulations. **The Journal of Investigative Dermatology**, v.138, p.811–825, Abr. 2018.

PINHO-RIBEIRO, F.A., VERRI Jr., W.A., CHIU, I.M. Nociceptor Sensory Neuron-Immune Interactions in Pain and Inflammation. **Trends in Immunology**, v.38, p. 5-19, Jan. 2017.

POETKER, D.M., REH, D.D. A comprehensive review of the adverse effects of systemic corticosteroids. **Otolaryngologic Clinics of North America**, v.43, p.753–768, Ago. 2010.

PONNALAGU, D., SINGH, H. Insights Into the Role of Mitochondrial Ion Channels in Inflammatory Response, **Frontiers in Physiology**, v.11, 258, Abr. 2020.

POÓR, M., et al. Flavonoid diosmetin increases ATP levels in kidney cells and relieves ATP depleting effect of ochratoxin A. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.132, p.1-9, Mar. 2014.

PRASAD, R., SINGH, T., KATIYAR, S.K. Honokiol inhibits ultraviolet radiation-induced immunosuppression through inhibition of ultraviolet-induced inflammation and DNA hypermethylation in mouse skin. **Scientific reports**, v.7, p. 1-14, Mai. 2017.

PRICE, J.D., TARBELL, K.V. The Role of Dendritic Cell Subsets and Innate Immunity in the Pathogenesis of Type 1 Diabetes and Other Autoimmune Diseases. **Frontiers in Immunology**, v.6, 288, Jun. 2015.

PRESCOTT, S.L., et al. The skin microbiome: impact of modern environments on skin ecology, barrier integrity, and systemic immune programming. **World Allergy Organization Journal**, v.10, 29, Ago. 2017.

PROKSCH, E., BRANDNER, J.M., JENSEN, J.M. The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, v.17, p.1063-1072, Jul. 2008.

REIZIZ, B. Plasmacytoid Dendritic Cells: Development, Regulation, and Function. **Immunity**, v.50, p.37-50, Jan. 2019.

REN, X., et al. Naringin protects ultraviolet B-induced skin damage by regulating p38 MAPK signal pathway. **Journal of Dermatological Science**, v.82, p. 106-114, Mai. 2016.

RHODES, L.E., et al. Ultraviolet-B-Induced Erythema is Mediated by Nitric Oxide and Prostaglandin E₂ in Combination. **Journal of Investigative Dermatology**, v.117, p.880-885, Out. 2001.

RIJKEN, F., BRUIJNZEEL-KOOMEN, C.A. Photoaged skin: The role of neutrophils, preventive measures, and potential pharmacological targets. **Clinical Pharmacology Therapeutics**, v.89, p.120–124, Jan. 2011.

RIOL-BLANCO, L., et al. Nociceptive sensory neurons drive interleukin-23-mediated psoriasiform skin inflammation. **Nature**, v.510, p. 157-161, Jun. 2014.

ROOWI, S., CROZIER, A. Flavonoids in Tropical Citrus Species. **Journal of Agricultural of Food Chemistry**, v.59, p.12217-12225, Nov. 2011.

RODRÍGUEZ-LUNA, A., et al. Fucoxanthin-Containing Cream Prevents Epidermal Hyperplasia and UVB-Induced Skin Erythema in Mice. **Marine Drugs**, v.16, 378, Out. 2018.

ROSSATO, M.F., et al. Eriodictyol: a flavonoid antagonist of the TRPV1 receptor with antioxidant activity. **Biochemical Pharmacology**, v.81, p.544–551, Fev. 2011.

ROTH, S.H. Coming to Terms with Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Gastropathy. **Drugs**, v.72, p.873-879, Mai. 2012.

ROY, A., et al. Potential therapeutic targets for inflammation in toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated signaling pathways. **International Immunopharmacology**, v.40, p.79-89, Nov. 2016.

RUSSELL, D.G., HUANG, L., VANDERVEN, B.C. Immunometabolism at the interface between macrophages and pathogens. **Nature Immunology**, v.19, p.291-304, Jan. 2019.

RYSER, S., et al. UVB-induced skin inflammation and cutaneous tissue injury is dependent on the MHC class I-like protein, CD1d. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, p. 192–202, Jan. 2014.

SAITO, P., et al. The Lipid Mediator Resolvin D1 Reduces the Skin Inflammation and Oxidative Stress Induced by UV Irradiation in Hairless Mice. **Frontiers in Pharmacology**, v.9, 1242, Out. 2018.

SAMANTA, A., HUGHES, T.E.T, MOISEENKOVA-BELL, V.Y. Transient Receptor Potential (TRP) Channels. **Subcellular Biochemistry**, v.87, p.141-165, Jul. 2018.

SAMIVEL, R., et al. Inhibitory Effect of Ursolic Acid on Ultraviolet B Radiation- Induced Oxidative Stress and Proinflammatory Response- Mediated Senescence in Human Skin Dermal Fibroblasts. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2020, 1246510, Jun. 2020.

SÁNCHEZ-PÉREZ, J.F., et al. Relationship between ultraviolet index (UVI) and first-, second- and third-degree sunburn using the Probit methodology. **Scientific Reports**, v.9, 733, Jan. 2019.

SAWADA, Y., et al. Activation of transient receptor potential ankyrin 1 by hydrogen peroxide. **European Journal of Neuroscience**, v.27, p.1131-1142, Mar. 2008.

SCHARSCHMIDT, T.C., et al. A wave of regulatory T cells into neonatal skin mediates tolerance to commensal microbes. **Immunity**, v.43, p.1011-1021, Nov. 2015.

SCHINELLA, G.R., et al. Anti-inflammatory Effects of South American *Tanacetum vulgare*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.50, p.1069-1074, Fev. 1998.

SCHOLZEN, T., et al. Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems. **Experimental Dermatology**, v.7, p. 81-86, Abr-Jun. 1998.

SEITÉ, S., et al. Photodamage to human skin by suberythemal exposure to solar ultraviolet radiation can be attenuated by sunscreens: a review. **British Journal of Dermatology**, v. 163, p. 903-914, Nov. 2010.

SERHAN, C.N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. **Nature**, v.510, p.92-101, Jun. 2014.

SHERRINGTON, C.S. Experiments in examination of the peripheral distribution of the fibres of the posterior roots of some spinal nerves. **Proceedings of the Royal Society of London**, v.52, p.333-337, Jan. 1893.

SHOOK, B.A., et al. Myofibroblast proliferation and heterogeneity are supported by macrophages during skin repair. **Science**, v.362, eaar2971, Nov. 2018.

SICHIEN, D., et al. Development of conventional dendritic cells: from common bone marrow progenitors to multiple subsets in peripheral tissues. **Mucosal Immunology**, v.10, p.831-844, Fev. 2017.

SILBERBERG, I., BAER, R.L., ROSENTHAL, S.A. The role of langerhans cells in allergic contact hypersensitivity. a review of findings in man and guinea pigs. **The Journal of Investigative Dermatology**, v.66, p.210-217, Abr. 1976.

SILVA, C.R., et al. The involvement of TRPA1 channel activation in the inflammatory response evoked by topical application of cinnamaldehyde to mice. **Life Sciences**, v. 88, p. 1077–1087, Jun. 2011.

SILVESTRE-ROIG, C., et al. Neutrophil Diversity in Health and Disease. **Trends in Immunology**, v.40, p.565-583, Jul. 2019.

SIMPSON, B.S., et al. Polyandric acid A, a clerodane diterpenoid from the australian medicinal plant *Dodonaea polyandra*, attenuates pro-inflammatory cytokine secretion in vitro and *in vivo*. **Journal of Natural Products**, v. 77, p. 85–91, Jan. 2014.

SMART, D., et al. The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). **British Journal of Pharmacology**, v.129, p.227–230, Mai. 2000.

SOUSA-VALENTE, J., BRAIN, S.D. A historical perspective on the role of sensory nerves in neurogenic inflammation. **Seminars in Immunopathology**, v.40, p.229-236, Abr. 2018.

SOUTHALL, M.D., et al. Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes. **The Journal of Pharmacology and Experimental therapeutics**, v.304, p. 217-222, Jan. 2003.

SPAHN, V., STEIN, C., ZÖLLNER, C. Modulation of Transient Receptor Vanilloid 1 Activity by Transient Receptor Potential Ankyrin 1. **Molecular Pharmacology**, v.85, p.335-344, Fev. 2014.

STEINBERG, X., LESPAY-REBOLLEDO, C., BARUCHI, S. A structural view of ligand-dependent activation in term TRP channels. **Frontiers in Physiology**, v.5, 171, Mai. 2014.

STEINMAN, R.M., COHN, Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v.137, p.1142-1162, Mai. 1973.

STONE, R., et al. Advancements in Regenerative Strategies Through the Continuum of Burn Care. **Frontiers in Pharmacology**, v.9, 672, Jul. 2018.

STORY, G.M., et al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. **Cell**, v.112, p.819–829, Mar. 2003.

STREILEIN, J.W. Skin-associated lymphoid tissues (SALT): origins and functions. **The Journal of Investigative Dermatology**, v.80, p. (Suppl):12s-16s, Jun. 1983.

STRICKER, S. Untersuchungen über die Gefässwurzeln des Ischiadicus. **Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften in Wien**, v.3, p.173–185, 1876.

SUGIMOTO, M.A., et al. Mediators of the Resolution of the Inflammatory Response. **Trends in Immunology**, v.49, p.212-227, Mar. 2019.

SULCINER, M.L., et al. Resolvins suppress tumor growth and enhance cancer therapy. **The Journal of Experimental Medicine**, v.215, p.115-140, Jan. 2018.

SUMPTER, T.L., et al. Cutaneous immune responses mediated by dendritic cells and mast cells. **JCI Insight**, v.4, e123947, Jan. 2019.

SUN, J, RAMNATH, R.D., BHATIA, M. Neuropeptide substance P upregulates chemokine and chemokine receptor expression in primary mouse neutrophils. **American Journal Physiology. Cell Physiology**, v.293, p.C696–C704, Ago. 2007.

SUN, X., et al. Immune-profiling of ZIKV-infected patients identifies a distinct function of plasmacytoid dendritic cells for immune cross-regulation. **Nature Communications**, v.11, 2421, Mai. 2020.

SZALLASI, A., BLUMBERG, P.M. Resiniferatoxin, a phorbol-related diterpene, acts as an ultrapotent analog of capsaicin, the irritant constituent in red pepper. **Neuroscience**, v.30, p.515–520, 1989.

SZEBENI, A., JANCsó, G., WOLLEMAN, M. Capsaicin receptor binding. **Acta Physiologica Academiae Scientiarum Hungaricae**, v.51, 13, 1978.

TAKAGI, Y., et al. An accumulation of glucosylceramide in the stratum corneum due to attenuated activity of beta-glucocerebrosidase is associated with the early phase of UVB-induced alteration in cutaneous barrier function. **Archives of Dermatological Research**, v.297, p.18-25, Mai. 2005.

TAKAHARA, K., et al. Identification and expression of mouse Langerin (CD207) in dendritic cells. **International Immunology**, v.14, p. 433-444, Jan. 2002.

TAKAHASHI, N., et al. TRPA1 underlies a sensing mechanism for oxygen. **Nature Chemical Biology**, v.7, p.701–711, Ago. 2011.

TAKAHASHI, N., et al. TRPA1 underlies a sensing mechanism for oxygen. **Nature Chemical Biology**, v.7, p.701–711, 2012.

TALAGAS, M., et al. Keratinocytes communicate with sensory neurons via synaptic-like contacts. **Annals of Neurology**, v.88, p.1205-1219, Dez. 2020.

TALAVERA, K., et al. Nicotine activates the chemosensory cation channel TRPA1. **Nature Neuroscience**, v.12, p.1293–1299, Out. 2009.

TALAVERA, K., et al. Mammalian transient receptor potential *trpa1* channels: from structure to disease. **Physiological Reviews**, v.100, p.725-803, Abr. 2020.

TAMOUTOUNOUR, S., et al. Origins and Functional Specialization of Macrophages and of Conventional and Monocyte-Derived Dendritic Cells in Mouse Skin. **Immunity**, v.39, p.925-938, Nov. 2013.

TANG, S-C., et al. Topical application of glycolic acid suppresses the UVB induced IL-6, IL-8, MCP-1 and COX-2 inflammation by modulating NF-kB signaling pathway in keratinocytes and mice skin. **Journal of Dermatological Science**, v.86, p.238-248, Jun. 2017.

TANG, S., et al. Extracellular calcium elicits feed forward regulation of the Toll-like receptor-triggered innate immune response. **Cellular & Molecular Immunology**, v.14, p.190-191, 2017.

TANG, S-C., et al. Glycolic acid attenuates UVB-induced aquaporin-3, matrix metalloproteinase-9 expression, and collagen degradation in keratinocytes and mouse skin. **Biochemical Journal**, v.476, p.1387-1400, Mai, 2019.

TAVERNER, T., PRINCE, J. Acute Neuropathic Pain Assessment in Burn Injured Patients. **Journal of Wound Ostomy & Continence Nursing**, v.43, p. 51-55, Jan/Fev. 2016.

TAYLOR-CLARK, T.E., et al. Nitrooleic acid, an endogenous product of nitrative stress, activates nociceptive sensory nerves via the direct activation of TRPA1. **Molecular Pharmacology**, v.75, p.820–829, Abr. 2009.

TAYLOR-CLARK, T.E., UNDEM, B.J. Ozone activates airway nerves via the selective stimulation of TRPA1 ion channels. **The Journal of Physiology**, v.588, p.423–433, Fev. 2010.

TESFAYE, D.Y., et al. Targeting Conventional Dendritic Cells to Fine-Tune Antibody Responses. **Frontiers in Immunology**, v.10, 1529, Jul. 2019.

THIESEN, L.C., et al. Photochemoprotective effects against UVA and UVB irradiation and photosafety assessment of *Litchi chinensis* leaves extract. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v.167, p. 200-207, Jan. 2017.

TIRARAVESIT, N., et al. *Artocarpus altilis* heartwood extracts protects skin against UVB *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 175, p. 153-162, Dez. 2015.

TOKURA, Y., et al. Pathophysiology of Skin Resident Memory T Cells. **Frontiers in Immunology**, v.11, 618897, Fev. 2021.

TOMINAGA, M., et al. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron**, v.21, p.531–543, Set. 1998.

TÓTH, B.I., et al. TRP channels in the skin. **British Journal of Pharmacology**, v.171, p.2568-2581, Mai. 2017.

TREVISAN, G., et al. A novel, potent, oral active and safe antinociceptive pyrazole targeting kappa opioid receptors. **Neuropharmacology**, v.73, p.261-273, Out. 2013.

TREVISANI, M., et al. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.104, p.13519-13524, Ago. 2007.

TRIPP, C.S., et al. Epidermal COX-2 Induction Following Ultraviolet Irradiation: Suggested Mechanism for the Role of COX-2 Inhibition in Photoprotection. **The Journal of Investigative Dermatology**, v.121, p.853-861, Out. 2003.

UNZUETA, A., VARGAS, H.E. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced hepatotoxicity. **Clinics in Liver Diseases**, v.17, p.643-656, Nov. 2013.

URASAKI, M. B. M., et al. Exposure and sun protection practices of university students. **Nursing Brazilian Journal**, v.69, p.114-21, 2016.

VAGO, J.P., et al. Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis. **Journal of Leukocyte Biology**, v.92, p.249-258, Ago. 2012.

VAN FURTH, R., COHN, Z.A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, v.128, p.415-435, Set. 1968.

VANDEWAUW, I., et al. A TRP channel trio mediates acute noxious heat sensing. **Nature**, v.29, p.662-666, Mar. 2018.

VESTWEBER, D. How leukocytes cross the vascular endothelium. **Nature Immunology**, v.15, p.692-704, Nov. 2015.

VIGNALI, D.A.A., COLLISON, L.W., WORKMAN, C.J. How regulatory T cells work. **Nature immunology**, v.8, p.523-532, Jul. 2008.

VRENKEN, K.S., et al. Beyond ion-conduction: Channel-dependent and -independent roles of TRP channels during development and tissue homeostasis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1863, p.1436-1446, 2016.

WANG, Q., et al. Fra-1 protooncogene regulates IL-6 expression in macrophages and promotes the generation of M2d macrophages. **Cell Research**, v.20, p.701-712, Abr. 2010.

WANG, L., et al. Protective Effect of Sulfated Polysaccharides from Celluclast-Assisted Extract of *Hizikia fusiforme* Against Ultraviolet B-Induced Skin Damage by Regulating NF- κ B, AP-1, and MAPKs Signaling Pathways In Vitro in Human Dermal Fibroblasts. **Marine Drugs**, v.16, 239, Jul. 2018.

WATANABE, S., et al. The role of macrophages in the resolution of inflammation. **The Journal of Clinical Investigation**, v.129, p.2619:2628, Jul. 2019.

WEBER, E.W., MULLER, W.A. Roles of transient receptor potential channels in regulation of vascular and epithelial barriers. **Tissue Barriers**, v.5, e1331722, Abr. 2017.

WETTSCHURECK, N., STRILIC, B., OFFERMANN, S. Passing the vascular barrier: endothelial signaling processes controlling extravasation. **Physiological Reviews**, v.99, p.1467-1525, Mai. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Intersun: The Global UV Project: A Guide and Compendium**, 2003.

Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/42814>>. Acesso em: 03 jun. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Burns**, 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/burns>>. Acesso em: 15 mai. 2021.

WILGUS, T.A., ROY, S., MCDANIEL, J.C. Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. **Advances in Wound Care**, v.2, p.379-388, Set. 2013.

WONG, E., et al. Langerhans Cells Orchestrate the Protective Antiviral Innate Immune Response in the Lymph Node. **Cell Reports**, v.29, p.3047-3059, Dez. 2019.

WORDS, T., HAMMERSCHMIDT, S.I., FÖSTER, R. Dendritic cell migration in health and disease. **Nature Immunology**, v.17, p.30-48, Nov. 2016.

WU, X., et al. *Mafb* lineage tracing to distinguish macrophages from other immune lineages reveals dual identity of Langerhans cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v.213, p.2553-2565, Nov. 2016.

WU, P-Y., et al. 1,2-Bis[(3-methoxyphenyl)methyl]ethane-1,2-Dicarboxylic Acid Reduces UVB-Induced Photodamage *In Vitro* and *In Vivo*. **Antioxidants**, v.8, p.1-19, 2018.

WULLAERT, A., BONNET, M.C., PASPARAKIS, M. NF- κ B in the regulation of epithelial homeostasis and inflammation. **Cell Research**, v.21, p.146-158, Jan. 2011.

XIAO, X., et al. Rebounding triad (severe itching, dryness and burning) after facial corticosteroid discontinuation defines a specific class of corticosteroid-dependent dermatitis. **The Journal of Dermatology**, v.42, p.697-702, Jul. 2015.

XU, H., BLAIR, N.T., CLAPHAM, D.E. Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism. **The Journal of Neuroscience**, v.25, p.8924-8937, Set. 2005.

XU, Z., et al. Microglia-mediated chronic psoriatic itch induced by imiquimod. **Molecular Pain**, v.16, p.1-4, Dez. 2020.

XUE, J., et al. Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation. **Immunity**, v.40, p.274-288, Fev. 2014.

YAMAZAKI, S., et al. Ultraviolet B-Induced Maturation of CD11b-Type Langerin-Dendritic Cells Controls the Expansion of Foxp3+ Regulatory T Cells in the Skin. **The Journal of Immunology**, v.200, p.119-129, Jan. 2018.

YANG, Y.S., et al. Increased Expression of Three Types of Transient Receptor Potential Channels (TRPA1, TRPV4 and TRPV3) in Burn Scars with Post- burn Pruritus. **Acta Dermato-Venereologica**, v.95, p.20-24, Jan. 2015.

YANG, Y., et al. Diosmetin exerts anti-oxidative, anti-inflammatory and anti- apoptotic effects to protect against endotoxin-induced acute hepatic failure in mice. **Oncotarget**, v.8, p.30723-30733, Fev. 2017.

YAO, C., NARUMIYA, S. Prostaglandin-cytokine crosstalk in chronic inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v.176, p.337-354, Fev. 2019.

YAP, J.M.G., et al. An inflammatory stimulus sensitizes TRPA1 channel to increase cytokine release in human lung fibroblast. **Cytokine**, v.129, 155027, Mai. 2020.

YASUI, H., et al. Real-time chemiluminescent imaging and detection of reactive oxygen species generated in the UVB-exposed human skin equivalent model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 347, p. 83-88, Ago. 2006.

YIN, S., et al. Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) Mediates Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Inflammatory Responses in Primary Human Osteoarthritic Fibroblast-Like Synoviocytes. **Inflammation**, v.41, p.700-709, Abr. 2018.

YIN, S., et al. Potential skin protective effects after UVB irradiation afforded by an antioxidant peptide from *Odorrana andersonii*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.120, p.109535, Set. 2019.

YOO, J.A., et al. Blue Light Irradiation Induces Human Keratinocyte Cell Damage via Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) Regulation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2020, 8871745, Dez. 2020.

YU, W., et al. Diosmetin ameliorates the severity of cerulein-induced acute pancreatitis in mice by inhibiting the activation of the nuclear factor- κ B. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v.7, p.2133-2142, Abr. 2014.

ZARAGOZÁ, C., et al. Potential Therapeutic Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Effects of Dihydroflavones, Flavones, and Flavonols. **Molecules**, v.25, 1017, Fev. 2020.

ZHANG, J-A., et al. The Protective Effect of Baicalin against UVB Irradiation Induced Photoaging: An *In Vitro* and *In Vivo* Study. **PLoS One**, v.9, e99703, Jun. 2014.

ZHANG, B., et al. Hydrogen ameliorates oxidative stress via PI3K-Akt signaling pathway in UVB-induced HaCaT cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v.41, p.3653-3661, Jun. 2018.

ZHAO, R., et al. Protective effects of diosmetin extracted from *Galium verum* L. on the thymus of U14-bearing mice. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.89, p.665-673, Set. 2011.

ZHENG, J. Molecular Mechanism of TRP Channels. **Comprehensive Physiology**, v.3, p.221-242, Jan. 2013.

ZHENG, Q-Y., et al. C5a/C5aR1 Pathway Is Critical for the Pathogenesis of Psoriasis. **Frontiers in Immunology**, v.10, 1866, Ago. 2019.

ZHOU, Y., et al. TRPV1 mediates inflammation and hyperplasia in imiquimod (IMQ)-induced psoriasiform dermatitis (PsD) in mice. **Journal of Dermatological Science**, v.92, p.264-271, Dez. 2018.

ZHOU, Y., et al. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) positively regulates imiquimod-induced, psoriasiform dermal inflammation in mice. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.23, p.4819-4828, Jul. 2019.

ZWICK, R.K., et al. Anatomical, physiological and functional diversity of adipose tissue. **Cell Metabolism**, v.27, p.68-83, Jan. 2018.

ANEXO A



Comissão de Ética no Uso de Animais

da

Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do envolvimento dos canais TRPA1 e TRPV1 em um modelo de inflamação de pele induzida por radiação UVB em camundongos", protocolada sob o CEUA nº 7999090818 (ID 002144), sob a responsabilidade de **Sara Marchesan de Oliveira e equipe; Camila Camponogara Dalla Pozza; Nathâli Schopf Pegoraro** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 13/09/2018.

We certify that the proposal "Evaluation of TRPA1 and TRPV1 channels involvement in a skin inflammation model induced by UVB radiation in mice", utilizing 212 Heterogenics mice (212 males), protocol number CEUA 7999090818 (ID 002144), under the responsibility of **Sara Marchesan de Oliveira and team; Camila Camponogara Dalla Pozza; Nathâli Schopf Pegoraro** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 09/13/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [11/2018](#) a [03/2021](#)

Área: [Bioquímica E Biologia Molecular](#)

Origem: [Biotério Central UFSM](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [4 a 5 semanas](#)

N: [212](#)

Linhagem: [Swiss](#)

Peso: [25 a 30 g](#)

Local do experimento: Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia - Prédio 18

Santa Maria, 30 de abril de 2021

Profa. Dra. Patrícia Severo do Nascimento
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria



Comissão de Ética no Uso de Animais

da

Universidade Federal de Santa Maria

Santa Maria, 03 de dezembro de 2019
CEUA N 7999090818

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Sara Marchesan De Oliveira
Área: Bioquímica E Biologia Molecular

Título da proposta: "Avaliação do envolvimento dos canais TRPA1 e TRPV1 em um modelo de inflamação de pele induzida por radiação UVB em camundongos".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UFSM (ID 001914)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 11/outubro/2019) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "No projeto aprovado previamente, consta o protocolo experimental de análise imunohistoquímica do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), a fim de avaliar a capacidade proliferativa das células epidérmicas (queratinócitos), a partir do modelo de inflamação de pele induzida pela exposição repetida de radiação UVB. Entretanto, como estamos avaliando a participação do canal TRPA1 neste modelo, a partir de parâmetros inflamatórios, bem como proliferativos, seria de grande interesse e valia para posterior publicação científica, a análise da imunorreatividade para o canal de TRPA1 na pele da orelha de camundongos expostos repetidamente à radiação UVB, bem como o efeito do antagonista do canal TRPA1 (HC-030031) e dexametasona (controle positivo) sobre este parâmetro. Entretanto, vale ressaltar que não terá a necessidade da solicitação de novos animais, uma vez que as mesmas orelhas dos animais usadas para a análise imunohistoquímica do PCNA poderão ser aproveitadas para obtenção de novos cortes histológicos para avaliação da imunorreatividade ao canal TRPA1. "

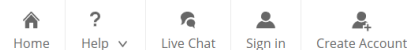
Comentário da CEUA: "Aprovado.".

Profa. Dra. Patrícia Severo do Nascimento
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

ANEXO B

Artigo Científico 1



Neuronal and non-neuronal transient receptor potential ankyrin 1 mediates UVB radiation-induced skin inflammation in mice

Author: Camila Camponogara, Evelyne S. Brum, Natháli S. Pegoraro, Indiara Brusco, Fernanda G. Rocha, Margareth M. Brandenburg, Daniela A. Cabrini, Eunice André, Gabriela Trevisan, Sara Marchesan Oliveira

Publication: Life Sciences

Publisher: Elsevier

Date: 1 December 2020

© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

Journal Author Rights

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

BACK

CLOSE WINDOW

© 2021 Copyright - All Rights Reserved | Copyright Clearance Center, Inc. | Privacy statement | Terms and Conditions
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

Artigo Científico 2



Diosmetin, a novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist, alleviates the UVB radiation-induced skin inflammation in mice

Author: Camila Camponogara et al

Publication: InflammoPharmacology

Publisher: Springer Nature

Date: Mar 22, 2021

Copyright © 2021, The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG

Order Completed

Thank you for your order.

This Agreement between Sara de Oliveira ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

Your confirmation email will contain your order number for future reference.

License Number 5143730763731

License date Sep 07, 2021

[Printable Details](#)

Licensed Content

Licensed Content Publisher Springer Nature
Licensed Content Publication InflammoPharmacology
Licensed Content Title Diosmetin, a novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist, alleviates the UVB radiation-induced skin inflammation in mice
Licensed Content Author Camila Camponogara et al
Licensed Content Date Mar 22, 2021

Order Details

Type of Use Thesis/Dissertation
Requestor type academic/university or research institute
Format electronic
Portion full article/chapter
Will you be translating? no
Circulation/distribution 50000 or greater
Author of this Springer Nature content yes

About Your Work

Title Envolvimento do Receptor de Potencial Transitário Anquirina 1 e efeito farmacológico da Diosmetina na queimadura de pele induzida pela radiação UVB em camundongos
Institution name Universidade Federal de Santa Maria
Expected presentation date Oct 2021

Additional Data