

Avaliação *in vitro* da eficácia anti-inflamatória, protetora da barreira cutânea e redutora da hipersensibilidade cutânea de quatro sabonetes líquidos disponíveis no Brasil

In vitro evaluation of four commercially available liquid soaps (in Brazil) for their anti-inflammatory and protective skin barrier qualities, as well as their impact on the reduction of cutaneous hypersensitivity

DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/scd1984-8773.2015722>

RESUMO

Introdução: A pele pode apresentar disfunções que levam a alterações histológicas e lesões elementares, muitas delas decorrentes de mecanismos imunológicos e/ou alteração da barreira epidérmica.

Objetivo: O objetivo deste estudo é avaliar se alguns produtos cosméticos, em apresentação sabonete líquido, encontrados no mercado brasileiro, apresentam eficácia anti-inflamatória e protetora de barreira cutânea *in vitro*.

Métodos: Trata-se de estudo *in vitro*, no qual quatro sabonetes comerciais foram avaliados em culturas celulares de queratinócitos humanos para determinação das atividades anti-inflamatória, restauradora de barreira epidérmica e redutora da hipersensibilidade cutânea. As concentrações de queratina 10 e 14, lorícrina, IL-12, IFN- γ e TRPV-1 foram dosadas nos sobrenadantes das culturas celulares de queratinócitos humanos por ensaio Elisa sanduíche.

Resultados: As quatro substâncias-teste promoveram reduções significativas na síntese de IFN- γ e IL-12. Somente a substância-teste C desencadeou aumento significativo na síntese de queratina 10. Todas as substâncias-teste demonstraram reduções significativas na síntese de queratina 14, aumento significativo na síntese de lorícrina e reduções significativas na síntese de TRPV-1.

Conclusões: Alguns produtos cosméticos em sabonete podem apresentar resultados *in vitro* no tocante às atividades anti-inflamatória, restauradora de barreira epidérmica e redutora da hipersensibilidade cutânea.

Palavras-chave: anti-inflamatórios/efeitos adversos; dermatite atópica; sabonetes

ABSTRACT

Introduction: The skin may present dysfunctions that result in histological alterations and elementary lesions, many of them caused by immunologic mechanisms and/or alterations in the epidermal barrier.

Objective: The present study was aimed at verifying *in vitro* whether some cosmetic products marketed in Brazil in the form of liquid soaps, have anti-inflammatory and protective efficacy in the skin barrier.

Methods: An *in vitro* study was carried out with four commercial soaps, which were evaluated in a cell culture of human keratinocytes for the determination of their anti-inflammatory and epidermal barrier restorative effects, as well as their capacity to reduce cutaneous hypersensitivity. Concentrations of keratin 10 and 14, lorícrin, IL-12, IFN- and TRPV-1 were measured in the cell culture supernatants of human keratinocyte through the sandwich ELISA assay.

Results: The four test substances led to significant reductions in the synthesis of IFN- and IL-12. Only the test substance C triggered a significant increase in the synthesis of keratin 10. All test substances showed significant reductions in the synthesis of keratin 14 and TRPV-1, and a significant increase in the synthesis of lorícrin.

Conclusions: Some cosmetic products in the form of soap can have *in vitro* results regarding their anti-inflammatory, epidermal barrier restoration and skin hypersensitivity reduction effects.

Keywords: anti-inflammatory agents/adverse effects; dermatitis, atopic; soaps

Artigo Original

Autores:

Adilson Costa¹
Samara Eberlin²
Stefano Piatto Clerici³
Beatrice Martinez Zugaib Abdalla⁴

¹ Ex-diretor clínico da Kolderma Instituto de Pesquisa Clínica Eireli – Campinas (SP), Brasil.

² Gerente técnica, Laboratório de Segurança e Eficácia Pré-Clínica, Kolderma Instituto de Pesquisa Clínica Eireli – Campinas (SP), Brasil.

³ Pesquisador, Laboratório de Segurança e Eficácia Pré-Clínica, Kolderma Instituto de Pesquisa Clínica Eireli – Campinas (SP), Brasil.

⁴ Estudante de medicina da Fundação Faculdade de Medicina do ABC – Santo André (SP), Brasil.

Correspondência para:

Adilson Costa
Alameda Franca, 760 ap. 21, Jd. Paulista,
01422-000 - São Paulo - SP
E-mail: adilson_costa@hotmail.com

Data de recebimento: 01/04/2015

Data de aprovação: 07/05/2015

*Trabalho realizado na Kolderma Instituto de Pesquisa Clínica Eireli e no Serviço de Dermatologia da Pontifícia Universidade Católica de Campinas – Campinas (SP), Brasil.

Conflito de interesse: Estudo foi patrocinado por Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda, São Paulo (SP), Brasil.

Suporte financeiro: Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda, São Paulo (SP), Brasil.

INTRODUÇÃO

A pele como qualquer órgão, pode apresentar degenerações, alterações metabólicas, malformações, disfunções e inflamações, que levam às alterações histológicas e consequentemente às lesões elementares.¹

Dependendo da localização anatômica e das influências ambientais, a pele mostra excepcional diversidade funcional e estrutural, uma vez que é continuamente exposta a agressões externas como radiação solar, estímulos mecânicos, mudanças climáticas e/ou danos químicos e biológicos.² A manutenção da integridade estrutural da pele é, portanto, crítica e deve poder contar com mecanismos rápidos de restauração da barreira epidérmica quando afetada.³⁻⁵

A hidratação e a integridade do stratum corneum (SC) são determinantes para a aparência da pele, metabolismo, propriedades mecânicas e função da barreira cutânea.⁶ Durante a diferenciação epidérmica, diversas proteínas estão envolvidas na formação do envelope córneo, entre elas, a loricrina, involucrina, filagrina e queratinas.⁷⁻⁹

A variação dos genes do envelope córneo resulta na patogênese de três principais desordens cutâneas: ictiose vulgar, psoríase e dermatite atópica (DA).¹⁰⁻¹¹ DA é inflamação crônica caracterizada por prurido e cujos componentes hereditário, ambiental e imunológico desempenham papel-chave.¹²

A DA flutua entre duas fases: a aguda, com predomínio de resposta tipo Th2 e produção de IgE, e a crônica, com resposta tipo Th1 acentuada, destacando-se a produção de interferon- γ (IFN- γ) e interleucina-12 (IL-12).¹¹

A queratina é uma proteína resistente e impermeável responsável pela proteção da pele.¹³ As queratinas 5 e 14 são expressas em queratinócitos basais, e as queratinas 1 e 10 participam na diferenciação de queratinócitos suprabasais.¹⁴ As mutações em genes de queratina podem resultar em doenças humanas caracterizadas por uma alteração na homeostase epidérmica, incluindo uma função de barreira prejudicada.¹⁴ A ruptura da barreira permeável da epiderme, tanto aguda quanto crônica, resulta em alterações na síntese de proteínas estruturais em queratinócitos relacionando-se com aumento de proliferação suprabasal e diferenciação celular, na tentativa de reparo da barreira cutânea.¹⁴

Associada à integridade da barreira, a produção local de mediadores inflamatórios também é ativada em consequência da liberação de citocinas, histamina e eicosanoides.¹⁵ Esses, por sua vez, aumentam a sensibilidade de nociceptores, tais como o TRPV-1 (receptor vaniloide de canal transitório V1), um canal de cálcio não seletivo vastamente expresso no tecido cutâneo, incluindo queratinócitos e fibras nervosas sensoriais periféricas.¹⁶ O TRPV-1 tem sua sensibilidade aumentada nas lesões de DA, o que se traduz em hiperalgesia e produção adicional de mediadores da inflamação.¹⁷⁻¹⁸

A disponibilização de produtos cosméticos que minimizem a ocorrência de efeitos colaterais indesejados, como xerose e hipersensibilidade cutâneas, podem ser um diferencial importante para garantir a adesão ao tratamento e sucesso terapêutico. O objetivo deste estudo é avaliar se alguns produtos cosméticos, em apresentação sabonete líquido, encontrados no mercado bra-

sileiro, detêm eficácia anti-inflamatória e protetora de barreira cutânea *in vitro*.

MÉTODOS

Trata-se de estudo *in vitro*, no qual quatro sabonetes líquidos comerciais foram avaliados: substância-teste A (Derma-cyd Infantil, Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda, São Paulo, SP, Brasil, Lote 246782); substância-teste B (Sabonete de Glicerina Granado Bebê, Casa Granado Laboratórios, Farmácias e Drogarias S.A., Belém, PA, Brasil, Lote R1446); substância-teste C (Huggies Turma da Mônica Recém-Nascido, Kimberly-Clark Brasil Indústria e Comércio de Produtos de Higiene Ltda, Mogi das Cruzes, SP, Brasil, Lote Lkg2354); e substância-teste D (Johnson's Baby Sabonete Líquido Da Cabeça aos Pés, Johnson & Johnson Industrial Ltda, São José dos Campos, SP, Brasil, Lote 3013b09).

Para tanto, culturas de fibroblastos humanos (Human Foreskin Fibroblasts-1, "HFF-1"; ATCC SCRC-1041, Banco de Células do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro/RJ, Brasil, No Catálogo 0275) foram semeados em garrafas de 75cm³ (Nunc, Roskilde, Denmark), cultivados e expandidos em incubadora a 37°C em presença de 5% de CO₂, utilizando meio de cultura específico para a determinação da viabilidade celular através do método do XTT.

A viabilidade celular foi determinada por método colorimétrico que utiliza o corante XTT (2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxyanilide inner salt), que é convertido em formazan laranja solúvel em água pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial nas células viáveis (Xenometrix AG, Switzerland). Os fibroblastos foram semeados e incubados com as substâncias-teste em oito concentrações utilizando diluição geométrica decimal.¹³ Após 48 horas de incubação as substâncias-teste foram removidas e o meio de cultura foi substituído. Em seguida, o corante XTT foi adicionado à cultura, e a placa incubada por mais três horas. A absorbância (densidade óptica - DO) de cada poço foi determinada a 480nm em monocromador Multiskan GO (Thermo Scientific, Finland). A porcentagem de viabilidade celular foi calculada conforme equação: % Viabilidade = (DOST / DOCN) x 100, na qual DOST é a densidade óptica da substância-teste e DOCN é a densidade óptica do controle negativo.

Queratinócitos humanos HaCat, Banco de Células do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro/RJ, Brasil, No Catálogo 0341) foram semeados e cultivados da mesma forma que os fibroblastos humanos HFF-1. Ao atingir confluência, as células foram semeadas em placas para posterior incubação com a substância-teste e quantificação dos mediadores propostos.

As culturas de queratinócitos foram incubadas com três concentrações não citotóxicas das substâncias-teste determinadas pelo método do XTT. As células foram mantidas em contato com as substâncias-teste por 48 horas. Após esse período, o sobrenadante da cultura celular foi coletado para quantificação dos mediadores relacionados à atividade protetora de barreira cutânea. Para avaliação da atividade anti-inflamatória e redutora da hipersensibilidade cutânea, o estresse inflamatório foi mime-

tizado através da adição de interleucina-1 alfa (IL-1 α , 10ng/mL) às culturas de queratinócitos, concomitantemente ao tratamento com a substância-teste, durante 48 horas.

Utilizando-se kits comercialmente disponíveis para Elisa sanduíche, avaliou-se a concentração dos seguintes mediadores nos sobrenadantes obtidos das culturas celulares de queratinócitos humanos: queratina 10 (USCN Life Science Inc., Wuhan, Hubei, China); queratina 14 (USCN Life Science Inc., Wuhan, Hubei, China); loricrina (USCN Life Science Inc., Wuhan, Hubei, China); interleucina-12 (IL-12; BD Biosciences, San Diego, CA, USA); interferon- γ (IFN- γ ; BD Biosciences, San Diego, CA, USA); e receptor vanilóide de canal transitório V-1 (TRPV-1; USCN Life Science Inc., Wuhan, Hubei, China). A leitura da absorbância foi realizada em monocromador Multiskan GO (Thermo Scientific, Finland).

Na avaliação estatística para os mediadores queratina 10, queratina 14, loricrina, IL-12, IFN- γ e TRPV-1 utilizamos o teste one-way Anova (GraphPad Prism 4 Software Inc. San Diego, CA, USA), que permite mensurar a variação dos resultados, comparando os dados das substâncias-teste, evidenciando as diferenças entre elas. Como o teste-F foi significativo, aplicamos o teste não paramétrico Tukey. Foi considerado o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

O gráfico 1 representa a curva concentração-viabilidade celular das substâncias-teste. Como se pode observar, as subs-

tâncias-teste A, C e D apresentaram concentrações não citotóxicas a partir da diluição de 0,316mg/mL. A substância-teste B apresentou concentração não citotóxica a partir da diluição de 0,100mg/mL.

Do ponto de vista metodológico, a incubação das culturas de queratinócitos humanos com a citocina pró-inflamatória interleucina-1 alfa (IL-1 α) promoveu aumento de 2,7 vezes e 1,7 vez na produção de IFN- γ e IL-12, respectivamente. Os gráficos 2 e 3 representam o efeito das substâncias-teste na síntese de IFN- γ e IL-12 em cultura de queratinócitos humanos, a fim de se avaliar a atividade anti-inflamatória de cada substância-teste. Todas as substâncias-teste avaliadas foram capazes de reduzir significativamente a síntese de ambas as citocinas inflamatórias.

Em relação ao IFN- γ , no gráfico 2, as substâncias-teste promoveram diminuições significativas em todas as concentrações avaliadas. As substâncias-teste A, C e D demonstraram, na concentração de 0,100mg/mL, uma resposta anti-inflamatória discretamente mais acentuada (p -valor<0,05) em comparação a igual concentração da substância B.

A resposta obtida na síntese da citocina IL-12 foi semelhante à do IFN- γ . No gráfico 3 pode-se observar que a substância-teste A, nas concentrações de 0,100mg/mL e 0,0316mg/mL, foi capaz de reduzir a produção de IL-12 para níveis significativamente inferiores (p -valor<0,05) aos observados com a substância-teste D na concentração de 0,100mg/mL.

Com relação à atividade protetora da barreira cutânea, o gráfico 4 representa os efeitos das substâncias-teste na síntese

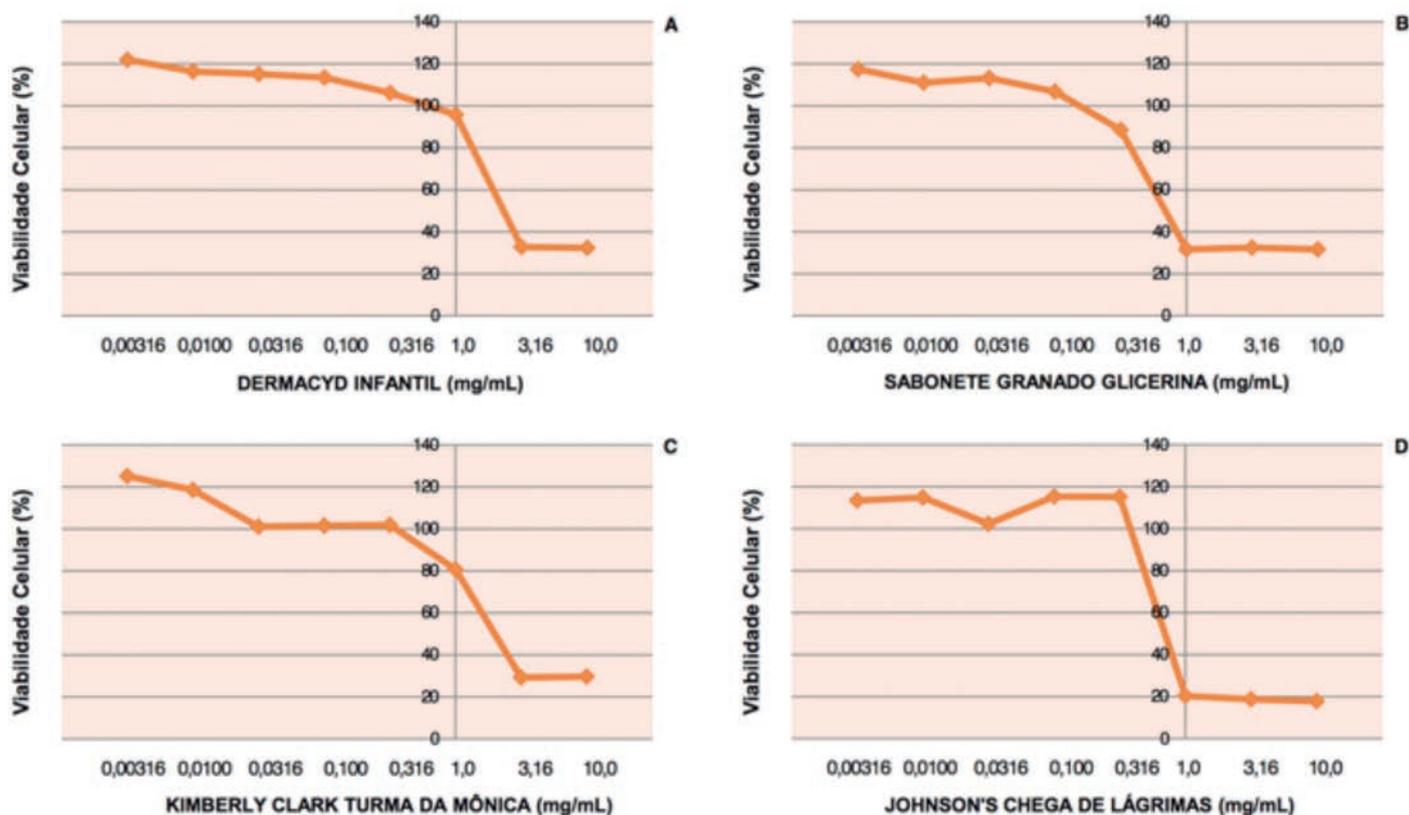


GRÁFICO 1: Avaliação da viabilidade celular das substâncias-teste, em cultura de fibroblastos humanos, após 48 horas de incubação pelo método do XTT

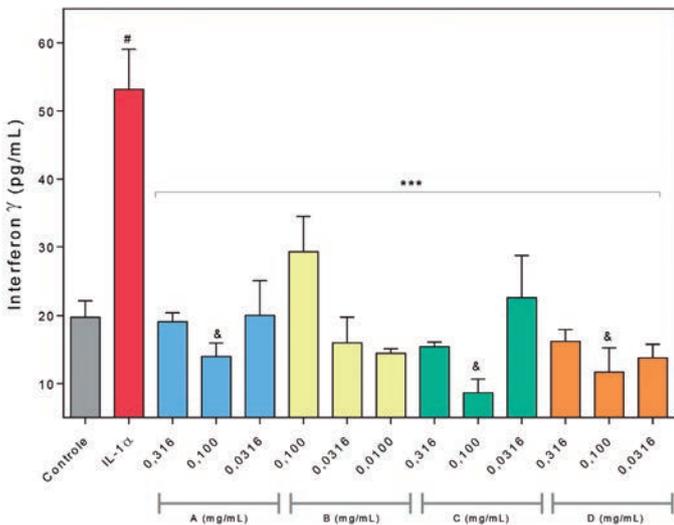


GRÁFICO 2: Efeito das substâncias-teste A,B,C e D sobre a produção de interferon gama (IFN- γ) em cultura de queratinócitos humanos. Os dados representam a média \pm desvio-padrão de três replicatas (Anova, Tukey). # $p < 0,001$ em relação ao grupo-controle; *** $p < 0,001$ em relação ao grupo IL-1 α ; & $p < 0,05$ em relação à substância B 0,100mg/mL

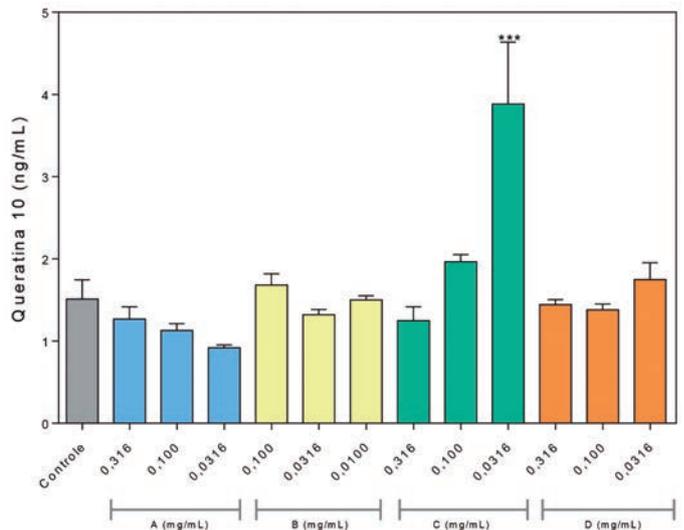


GRÁFICO 4: Efeito das substâncias-teste A,B,C e D sobre a produção de queratina 10 em cultura de queratinócitos humanos. Os dados representam a média \pm desvio-padrão de três replicatas (Anova, Tukey). *** $p < 0,001$ em relação ao grupo-controle

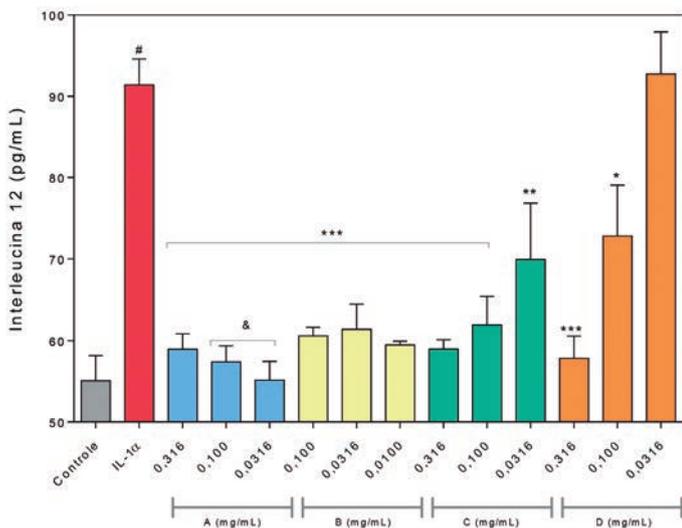


GRÁFICO 3: Efeito das substâncias-teste A,B,C e D sobre a produção de interleucina-12 (IL-12) em cultura de queratinócitos humanos. Os dados representam a média \pm desvio-padrão de três replicatas (Anova, Tukey). # $p < 0,001$ em relação ao grupo-controle; * $p < 0,05$ em relação ao grupo IL-1 α ; ** $p < 0,01$ em relação ao grupo IL-1 α ; *** $p < 0,001$ em relação ao grupo IL-1 α ; & $p < 0,05$ em relação à substância D 0,100mg/mL

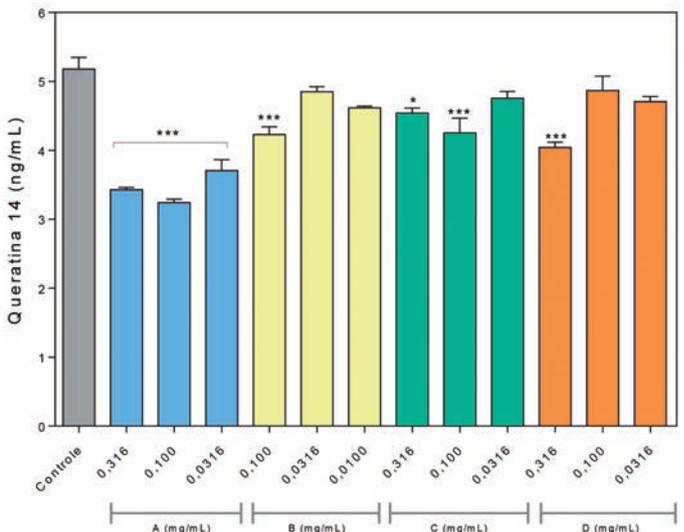


GRÁFICO 5: Efeito das substâncias-teste A,B,C e D sobre a produção de queratina 14 em cultura de queratinócitos humanos. Os dados representam a média \pm desvio-padrão de três replicatas (Anova, Tukey). * $p < 0,05$ em relação ao grupo-controle; *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle

de queratina 10 em cultura de queratinócitos humanos. Como se pode observar, apenas a substância C, na concentração de 0,0316mg/mL produziu aumento significativo na síntese de queratina 10 ($p < 0,001$) quando comparado ao controle.

A resposta observada para a queratina 14 (Gráfico 5) foi contrária àquela observada com a queratina 10. Todas as substân-

cias-teste, em uma ou mais concentrações avaliadas, promoveram redução significativa na síntese de queratina 14 em relação ao grupo-controle.

O gráfico 6 representa os efeitos das substâncias-teste na síntese de loricrina, em cultura de queratinócitos humanos. As substâncias-teste A, B e C, em uma ou mais concentrações ava-

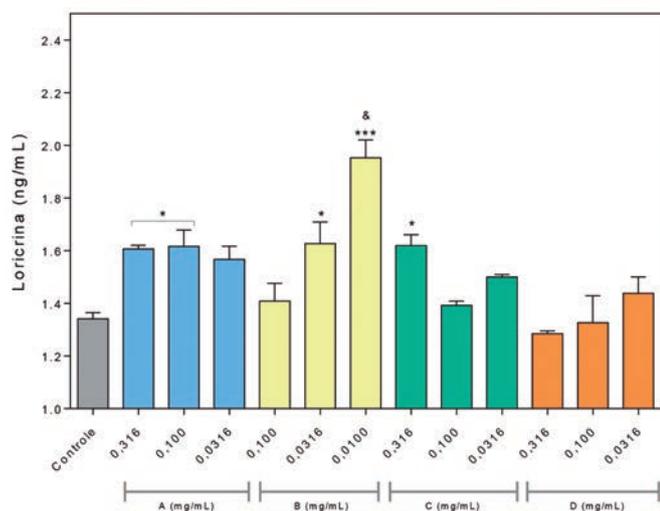


GRÁFICO 6: Efeito das substâncias-teste A,B,C e D sobre a produção de loricrina em cultura de queratinócitos humanos. Os dados representam a média \pm desvio-padrão de três replicatas (Anova, Tukey). * $p < 0,05$ em relação ao grupo-controle; *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle; & $p < 0,01$ em relação aos demais grupos

liadas, promoveram aumentos significativos na síntese de loricrina. O maior aumento observado foi obtido com a substância-teste B na concentração de 0,0100mg/mL (p -valor $<0,01$), em relação aos demais grupos avaliados.

Com relação à atividade da hipersensibilidade cutânea, o gráfico 7 representa o efeito das substâncias-teste na síntese do receptor TRPV-1, em cultura de queratinócitos humanos. A adição de IL-1 α às culturas celulares promoveu aumento significativo de 79,7% na síntese do receptor TRPV-1. Em contrapartida, todas as substâncias-teste reduziram a produção desse receptor, quando comparadas ao grupo estimulado com IL-1 α .

DISCUSSÃO

A função primária da epiderme é a de proteção.² A função de barreira é exercida por um estrato córneo semipermeável composto por lamelas lipídicas.²

A regulação da síntese de barreira lipídica tem sido estudada numa variedade de modelos. Alterações genéticas no metabolismo lipídico ou nos componentes proteicos do stratum corneum produzem descamação ou pele ictiosiforme com estrutura e função da barreira lipídica anormal.²

O conceito de higienização da pele tem início nos primórdios da história da humanidade e está relacionado à remoção das impurezas.¹⁴ Atualmente, o ato de limpar a pele está relacionado à aparência e à saúde da pele.¹⁴

Sabemos que a utilização apenas de água não é suficiente para a higiene da pele; logo, para remover partículas mais finas é necessário o uso de emulsificantes, que reduzem a tensão superficial da pele e removem sujeira, sebo, micro-organismos e células da camada córnea.¹⁵ Um sabonete ideal deve ter essas

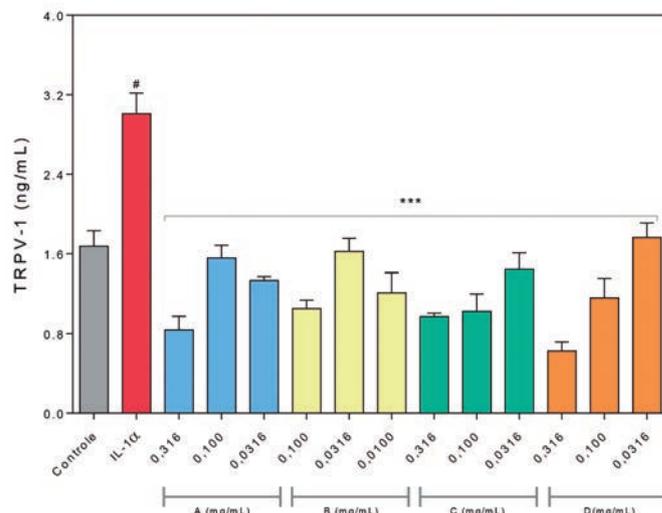


GRÁFICO 7: Efeito das substâncias-teste A,B,C e D sobre a produção de TRPV-1 em cultura de queratinócitos humanos. Os dados representam a média \pm desvio-padrão de três replicatas (Anova, Tukey) # $p < 0,001$ em relação ao grupo controle; *** $p < 0,001$ em relação ao grupo IL-1 α .

características sem lesar ou irritar a pele; ao contrário, deve tentar manter a superfície da pele úmida,16 provendo um bom equilíbrio.¹⁵

Este estudo in vitro comparou quatro sabonetes no tocante a suas atividades anti-inflamatória, protetora de barreira e ação redutora de hipersensibilidade cutânea. De modo geral, todas as substâncias-teste, do ponto de vista laboratorial, pré-clínico, tiveram resultados satisfatórios e muito semelhantes, o que pode ser útil para a indicação clínica em pacientes com dermatoses que comprometem a barreira cutânea.

Doenças de caráter puramente inflamatório, crônico, como é o caso da psoríase e da dermatite atópica, mostram diminuição da função de barreira.¹⁷ Já não é de hoje que se sabe que sabonetes e produtos que contenham surfactantes desempenham papel importante na alteração da barreira cutânea, desencadeando surtos de DA.¹⁸ Por tal motivo, a indicação de produtos comerciais que tenham efeito reduzido no desencadeamento de tais crises clínicas é mandatória na prática clínica dermatológica; logo, é desejável o conhecimento de quais são os que podem ser úteis nessa indicação.

A DA demonstra tipicamente um limiar de irritabilidade da barreira cutânea diminuído;¹⁹ portanto, sabonetes menos irritantes e que demonstrem a capacidade de manter uma boa hidratação do stratum corneum representam um benefício para a pele xerótica atópica e influenciam no resultado do tratamento, progressão e melhoria da gestão global da doença.¹⁹

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos é possível inferir que as quatro substâncias-teste promoveram reduções significativas

na síntese de IFN- γ (substâncias-teste A, C e D demonstraram reduções acentuadas, em relação à B) e IL-12 (substância-teste A foi capaz de reduzir a produção de IL-12 para níveis significativamente inferiores aos observados com a substância-teste D na concentração de 0,100mg/mL). A substância-teste C desencadeou aumento significativo na síntese de queratina 10, não observado com as demais substâncias-teste, embora todas demons-

trem reduções significativas na síntese de queratina 14. Todas as substâncias-teste promoveram aumentos significativos na síntese de loricrina e reduções significativas na síntese de TRPV-1. Com base nesses achados, concluímos que todas as substâncias-teste apresentam atividades anti-inflamatória, redutora da hipersensibilidade e restauradora de barreira epidérmica. ●

REFERÊNCIAS

1. Sampaio AP, Rivitti EA. *Dermatologia*. 2 ed. São Paulo: Artes Médicas; 2001. p. 39-40.
2. Elias P, Feingold K, Fluhr J. The skin as an organ of protection. In: Friedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, editors. *Dermatology in General Medicine*. New York: McGraw-Hill; 2003. p. 07-118.
3. Martin P. Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997;276(5309):75-81.
4. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008;453(7193):314-21.
5. Feingold KR. Thematic review series: skin lipids. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis. *J Lipid Res*. 2007;48(12):2531-46.
6. Madison KC. Barrier function of: “la raison d’être” of the epidermis. *J Invest Dermatol*. 2003;121(2):231-41.
7. Hoffjan S, Stemmler S. On the role of the epidermal differentiation complex in ichthyosis vulgaris, atopic dermatitis and psoriasis. *Br J Dermatol*. 2007;157(3):441-9.
8. Kalinin A, Marekov LN, Steinert PM. Assembly of the epidermal cornified cell envelope. *J Cell Sci*. 2001;114(Pt 17):3069-70.
9. Ishida-Yamamoto A, Iizuka H. Structural organization of cornified cell envelopes and alterations in inherited skin disorders. *Exp Dermatol*. 1998;7(1):1-10.
10. Smith FJ, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Sandilands A, Campbell LE, Zhao Y, et al. Loss of function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nat Genet*. 2006;38(3):337-42.
11. O’Driscoll J, Muston GC, McGrath JA, Lam HM, Ashworth J, Christiano AM. A recurrent mutation in the loricrin gene underlies the ichthyotic variant of Vohwinkel syndrome. *Clin Exp Dermatol*. 2002;27(3):243-6.
12. Varothai S, Nitayavardhana S, Kulthanan K. Moisturizers for patients with atopic dermatitis. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2013;31(2):91-8.
13. Chen J, Cheng X, Merched-Sauvage M, Caulin C, Roop DR, Koch PJ. An unexpected role for keratin 10 end domains in susceptibility to skin cancer. *J Cell Sci*. 2006;199(Pt 24):5067-76.
14. Ekanayake-Mudiyanselage S, Aschauer H, Schmook FP, Jensen JM, Meingassner JG, Proksch E. Expression of epidermal keratins and the cornified envelope protein involucrin is influenced by permeability barrier disruption. *J Invest Dermatol*. 1998;111(3):517-23.
15. Luger TA. Neuromediators – a crucial component of the skin immune system. *J Dermatol Sci* 2002;30(2):87-93.
16. Riol-Blanco L, Ordovas-Montanes J, Perro M, Naval E, Thiriout A, Alvarez D, et al. Nociceptive Sensory Neurons Drive Interleukin-23 Mediated Psoriasisiform Skin Inflammation. *Nature*. 2014;510(7503):157-161.
17. Imamachi N, Park GH, Lee H, Anderson DJ, Simon MI, Basbaum AI, et al. TRPV1-expressing primary afferents generate behavioral responses to pruritogens via multiple mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(27):11330-5.
18. Sadofsky LR, Ramachandran R, Crow C, Cowen M, Compton SJ, Morice AH. Inflammatory stimuli up-regulate transient receptor potential vanilloid-1 expression in human bronchial fibroblasts. *Exp Lung Res*. 2012;38(2):75-81.
19. ECVAM-Dbalm. 3T3 Neutral Red Uptake (NRU) Phototoxicity Assay. DB-ALM Protocol nº 78. [atualizado 2008; acesso 16 de fevereiro de 2015]. Disponível em: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/public_view_doc2.cfm?id=736F27E9E9F7A9D869FB48087878D2497180BB0BC-12CB10496CDA74B54630A05A3291B895581F634