



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

**ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E RESPOSTA INFLAMATÓRIA DAS LESÕES
COM DERMATITE ATÓPICA EM CAMUNDONGOS INDUZIDAS POR
CALCIPOTRIOL E TRATADAS COM E-CADERINA RECOMBINANTE**

LAURA ALVES RIBEIRO

Uberlândia

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

**ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E RESPOSTA INFLAMATÓRIA DAS LESÕES
COM DERMATITE ATÓPICA EM CAMUNDONGOS INDUZIDAS POR
CALCIPOTRIOL E TRATADAS COM E-CADERINA RECOMBINANTE**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

LAURA ALVES RIBEIRO

Orientador: Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi

Co-orientador: Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior

Uberlândia

Julho-2019

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

R484
2019 Ribeiro, Laura Alves, 1995-
Análise Histopatológica e resposta inflamatória das lesões com
Dermatite Atópica em camundongos induzidas por calcipotriol e
tratadas com e-caderina recombinante [recurso eletrônico] / Laura
Alves Ribeiro. - 2019.

Orientador: Ernesto Akio Taketomi.
Coorientador: Jair Pereira da Cunha Júnior.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.2214>
Inclui bibliografia.

1. Imunologia. I. Akio Taketomi, Ernesto , 1963-, (Orient.). II.
Pereira da Cunha Júnior, Jair , 1974-, (Coorient.). III. Universidade
Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Laura Alves Ribeiro

“Análise histopatológica e resposta inflamatória das lesões com dermatite atópica em camundongos induzidas por calcipotriol e tratadas com e-caderina recombinante”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 25 de julho de 2019.

Priscila Ferreira de Sousa Moreira
Profa. Dra. Priscila Ferreira de Sousa Moreira – IFTM

Danielle Reis Napolitano
Dra. Danielle Reis Napolitano – ICBIM/UFU

Ernesto Akio Taketomi

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi (orientador) – ICBIM/UFU

Dedico este trabalho ao meu esposo Elton Oliveira Silva Filho, aos meus pais Andréa e Donizeti, ao meu irmão Gabriel e familiares que sempre me incentivaram a crescer e seguir o sonho da carreira acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, que me ajudou e me deu forças nas dificuldades e nos momentos difíceis da minha jornada, e é por ele que estou vencendo mais uma etapa.

Agradeço à minha família que sempre me incentivou e apoiou, aos meus pais Donizeti e Andréa que ambos dedicaram sua vida por mim, ao meu irmão Gabriel pelo carinho e ajuda. Ao meu esposo Elton que sempre esteve do meu lado torcendo pelas minhas conquistas e que tanto amo.

Agradeço todos meus familiares que torceram por mim em várias etapas de minha vida.

Agradeço aos meus colegas de pesquisa, que me proporcionaram momentos de alegrias e compartilharam seus aprendizados, Alessandro, Hellen, Karine e Vinícius, os quais fizeram parte da vida acadêmica tornando-a mais divertida.

Quero agradecer aos técnicos do Laboratório de Histologia, Ester e Fabrício que tanto me ajudaram nas técnicas histológicas deste trabalho, com muita paciência e dedicação.

Agradeço imensamente à Prof^a. Dr^a. Neide Maria Silva por ter dedicado seu tempo ao auxiliar com muita sabedoria e paciência o aprendizado em histopatologia clínica.

Agradeço imensamente ao meu co-orientador Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior, por me compreender e me ajudar nos

momentos conturbados de minhas pesquisas e o meu orientador Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi que me recebeu com satisfação no Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica, e permitiu meu caminhar dentro da área de alergia.

As agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo incentivo e suporte financeiro, meu muito obrigado.

*“ Que diremos, pois, a estas coisas? Se Deus é
por nós quem será contra nós”*

Romanos 8:31

Lista de Abreviaturas e Siglas

APC	Célula apresentadora de antígeno
CIP	Inibição da proliferação por contato
CPT	Calcipotriol
CLA	<i>Cutaneous lymphocyte antigen</i>
DA	Dermatite atópica
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
FLG	Proteína Filagrina
GATA 3	<i>GATA binding protein 3</i>
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-9	Interleucina 9
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
IL-25	Interleucina 25
IL-31	Interleucina 31
IL-33	Interleucina 33
ILCs	Células linfoides inatas
IFN- γ	Interferon-gama
Kda	Kilodaltons
MHC II	Moléculas de classe II do complexo de histocompatibilidade principal
mrEcad	E-caderina recombinante de camundongo

OVA	Ovalbumina
PBS	Salina tamponada com fosfatos
PBS T	Salina tamponada com fosfatos acrescido de <i>Tween</i> a 0,05%
PV	Pênfigo vulgar
sIgE	IgE sérica
tIgE	IgE tecidual
Th	Células T helper
TLRs	Receptores semelhantes ao Toll
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
Treg	Células T regulatórias
TSLP	<i>Linfopoiatina estromal tímica</i>
TWEL	<i>Transepidermal water loss</i>

Lista de Figuras

- Figura 1.** Mecanismo Imunológico da Dermatite atópica 17
- Figura 2.** Desenho experimental do protocolo de indução de dermatite atópica em camundongos..... 28
- Figura 3.** Desenho experimental do protocolo de tratamento tópico com e-caderina recombinante de camundongo 29
- Figura 4.** Análise clínica da DA em orelha induzida com 4 pmoles de calcipotriol. Lesão em orelha direita (A); espessura da orelha medida nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 em diferentes grupos (B). A análise estatística se refere a espessura da orelha direita do grupo com 4 pmoles de calcipotriol no dia 28 em comparação aos demais grupos e a diferença entre os dias 0, 7, 14, 21 em comparação ao dia 28. As diferenças inter-grupos e intragrupos foram analisadas por meio do teste ANOVA two-way com o pós-teste de Dunnett. Os valores de p foram considerados significativos quando $p < 0,05$ (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$)..... 34
- Figura 5.** Níveis séricos e teciduais de anticorpo IgE total e citocina IL-5 tecidual em camundongos com lesões semelhantes à dermatite atópica (DA) induzida por calcipotriol em duas concentrações diferentes com ou sem OVA e em controles. Níveis de IgE sérica total (A); IgE total (B) e IL-5 (C) em sobrenadante de homogenato de tecido de orelha obtidos nos grupos de 1 pmol de calcipotriol, 4 pmol de calcipotriol, 1 pmol + OVA, 4 pmol + OVA, normal (não induzido) e etanol (somente veículo) são mostrados. As diferenças entre os grupos foram analisadas por meio do teste One-way ANOVA com pós-teste de Tukey e Kruskal-Wallis com o pós-teste de Dunn. Os valores de p foram considerados significativos quando $p < 0,05$ (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$)..... 35
- Figura 6.** Análise histopatológica da orelha direita com lesões semelhantes à DA induzidas por diferentes concentrações de calcipotriol com ou sem OVA (ovalbumina) e orelha esquerda como grupo controle aplicado apenas etanol. (A) os mastócitos corados com azul de toluidina são indicados por setas pretas e a espessura da epiderme corada com H & E é mostrada por setas amarelas em cortes histológicos (ambos os painéis com amplificação de 100x) de lesões cutâneas de orelha tipo AD dos diferentes grupos. Os eosinófilos são mostrados apenas no grupo com 4 pmoles de calcipotriol com aumento de 400x. (B) Número de mastócitos nos diferentes grupos estudados. As diferenças entre os grupos foram analisadas por meio do teste ANOVA com pós-teste de Dunnett. Os valores de p foram considerados significativos quando $p < 0,05$ (**** $p < 0,0001$)..... 36
- Figura 7.** Imagens de orelhas com lesões tipo DA induzidas por calcipotriol no 36º. dia. Lesões tratadas com apenas o veículo da pomada (A) ou tratadas com e-caderina recombinante de camundongo na concentração de 0,5 µg/ml (B), 1 µg/ml (C) ou 2 µg/ml (D). Em (E) e (F) são ilustradas orelhas como controles negativos, orelha que recebeu apenas etanol (Fig. 7E) e orelha normal (Fig. 7F), respectivamente. 37
- Figura 8.** Espessura da orelha medida em milímetros com paquímetro digital nos dias 1, 7, 14, 21, 35 e 36 em diferentes grupos (A) e espessura da epiderme em micrômetros medida pelo programa Image J no 36º. dia nos grupos tratados com diferentes concentrações de e-caderina e controles (B) As diferenças entre os grupos foram analisadas por meio do teste ANOVA com pós-teste de Dunnett. Os valores de p foram considerados significativos quando $p < 0,05$ (**** $p < 0,0001$)..... 38

Figura 9. Níveis de IgE sérica total; IgE total, TSLP e IL-10 tecidual em camundongos com lesões semelhantes à DA em orelhas induzidas por calcipotriol no 36º. dia e tratadas com diferentes concentrações de e-caderina e em grupos controles. São mostrados em **(A)** níveis séricos totais de IgE; **(B)** níveis de IgE total tecidual (tIgE); **(C)** níveis teciduais de TSLP; **(D)** níveis teciduais de IL-10. As diferenças entre os grupos foram analisadas por meio do teste ANOVA com pós-teste de Dunnett. Os valores de p foram considerados significativos quando $p < 0,05$ (** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$). ns = não significante. 40

Figura 10. Análise histopatológica das lesões semelhantes à DA em orelhas tratadas ou não com e-caderina recombinante de camundongo em diferentes concentrações. **(A)** Espessura da epiderme é mostrada por setas amarelas nos painéis da direita coradas com Hematoxilina e Eosina com aumento de 40x, e mastócitos são indicados por setas pretas nos dois painéis à esquerda com aumento de 400x e 40x, corados com azul de toluidina; **(B)** Número de mastócitos em lesões de DA induzidas por calcipotriol e controle negativo (somente veículo, sem DA) e tratadas ou não com e-caderina na concentração de 0,5 µg/ml, 1 µg/ml ou 2 µg/ml. As diferenças entre os grupos foram analisadas por meio do teste ANOVA com pós-teste de Dunnett e os valores de p foram considerados significativos quando $p < 0,05$ (* $p < 0,05$ *** $p < 0,001$)..... 42

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Doenças Alérgicas.....	13
1.3 Características clínicas e histológicas da Dermatite Atópica	18
1.4 Modelo Experimental de Dermatite Atópica	20
1.5 Tratamento tópico para Dermatite Atópica	21
1.5.1 Corticoesteroides, inibidores de calcineurina e anticorpos monoclonais.....	21
1.5.2 Moléculas de adesão como estratégia terapêutica.....	22
2. HIPÓTESES.....	25
3. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivos Geral	26
3.2 Objetivos Específicos	26
4. METODOLOGIA	27
4.1 Local dos experimentos e ética.....	27
4.2 Modelo Experimental.....	27
4.3 Indução de Dermatite Atópica em camundongos.....	27
4.4 Tratamento tópico em lesões de dermatite atópica	28
4.5 Coleta das amostras	30
4.6 Exame histopatológico	30
4.7 Dosagem dos níveis de IgE total no homogenato de tecido e soro	31
4.8 Dosagem dos níveis de IL-5, IL-10 e linfopoetina estromal tímica (TSLP) no homogenato de tecido	32
4.9 Análise Estatística	33
5. RESULTADOS.....	33
5.1 Indução de lesões semelhantes à DA por calcipotriol	33
.....	36
5.3 Efeito do tratamento tópico com a e-caderina recombinante	37
5.4 Parâmetros imunológicos das lesões semelhantes à DA tratadas com e-caderina recombinante tópica.....	39
5.5 Análise histopatológica das lesões tipo DA após tratamento tópico com e-caderina recombinante	40
6 DISCUSSÃO	43
7 CONCLUSÃO	49

RESUMO

A dermatite atópica (DA) é uma doença crônica e multifatorial caracterizada pela presença de infiltrado inflamatório, hiperplasia epidérmica e disfunção na barreira epitelial. A susceptibilidade da barreira epitelial permite a entrada de alérgenos que ativam células do perfil Th2 e aumentam os níveis de IgE na fase aguda. O objetivo deste estudo foi induzir lesões tipo DA na orelha de camundongos BALB/c por calcipotriol (CPT) e tratar com e-caderina recombinante de camundongo (rmE-cad). As lesões tipo DA foram induzidas pela aplicação tópica (orelha) de CPT em um volume de 20 µl durante 28 dias e foram realizadas com quatro grupos diferentes, com quatro animais cada para padronização: Grupo 1: 1 pmol de calcipotriol, Grupo 2: 4 pmoles de CPT, Grupo 3: 1 pmol de CPT + Ovalbumina (OVA) e Grupo 4: 4 pmoles de calcipotriol + OVA. A concentração ótima de CPT para indução da DA neste estudo foi de 4 pmoles (Grupo 2), mostrando lesões semelhantes à DA aguda com aumento significativo nos níveis séricos de IgE total, IgE total e IL-5 no homogenato de orelha em comparação com outros grupos (Grupos 1 e 3). Dessa forma, foi escolhido o Grupo 2 para ser tratado com 0,5 µg/ml, 1 µg/ml ou 2 µg/ml de rmE-cad. A aplicação tópica de 2 µg/ml de e-caderina demonstrou evidente melhora clínica bem como diminuição significativa nos níveis séricos de IgE total e IgE, IL-5 e de TSLP no homogenato de orelha com aumento nos níveis de citocina IL-10 tecidual em comparação com outros grupos tratados. Em conclusão, este estudo demonstrou que a concentração de CPT a 4 pmoles/20µl induziu a DA experimental em murinos e a dose ótima de e-caderina para o tratamento foi de 2 µg/ml, melhorando os parâmetros clínicos e imunológicos, diminuindo a inflamação local e contribuindo no aumento da citocina reguladora IL-10.

Palavras-chave: Dermatite atópica, calcipotriol, e-caderina, IgE, IL-5, TSLP.

ABSTRACT

Atopic dermatitis (AD) is a chronic and multifactorial disease characterized by the presence of inflammatory infiltrates, epidermal hyperplasia and dysfunction in the epithelial barrier. The susceptibility of the epithelial barrier allows the entry of allergens that activate Th2 profile cells and increase the levels of IgE in the acute phase. This study aimed to induce AD-like lesions at the ear of BALB/c mice by calcipotriol (CPT) and treat them recombinant mouse e-cadherin (rmE-cad). AD-like lesions were induced by topical (ear) application of CPT in a volume of 20 μ l during 28 days and it was performed by using four different groups, with four animals each, for standardization: Group 1: 1 pmol of CPT, Group 2: 4 pmols of CPT, Group 3: 1 pmol of CPT + Ovalbumin (OVA), and Group 4: 4 pmols of CPT + OVA. The optimal concentration of CPT for induction of AD in this study was 4 pmols (Group 2), leading to acute AD-like lesions with a significant increase in the total serum IgE, total tissue IgE and tissue IL-5 levels in comparison with other groups (Groups 1 and 3). Thus, the Group 2 was chosen for treatment with 0.5 μ g/ml, 1 μ g/ml or 2 μ g/ml of rmE-cad. Topical application of 2 μ g/ml of e-cadherin demonstrated evident clinical improvement as well as a significant decrease in the total serum IgE and total tissue IgE, tissue IL-5 and tissue TSLP levels, with an increase in the levels of the tissue IL-10 cytokine in comparison with other treated groups. In conclusion, this study demonstrated that the best concentration of CPT for induction of experimental murine AD was 4 pmols/20 μ l and the optimal dosis of e-cadherin for treatment was 2 μ g/ml, improving both clinical and immunological parameters, by decreasing tissue inflammatory factors as well as by increasing IL-10 regulatory cytokine.

Keywords: atopic dermatitis, calcipotriol, e-cadherin, IgE, IL-5, TSLP.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças Alérgicas

As doenças alérgicas são manifestações mediadas principalmente pela produção de anticorpos IgE específicos causadas por diferentes alérgenos ambientais, tais como ácaros da poeira domiciliar, fungos, pêlos, epitélios de cães e gatos, poléns de árvores e gramíneas, veneno de himenópteros, insetos sugadores, substâncias químicas, dentre outros (GLOBAL ATLAS OF ALLERGY, 2014). O termo alergia é dado por reações de hipersensibilidade e atopia é designado para doenças mediadas por anticorpos da classe IgE como rinite, asma e dermatite atópica (KAY, 2002). Pacientes atópicos que manifestam reações alérgicas em resposta à alérgenos ambientais apresentam altas titulações séricas de anticorpos IgE, já a classe de anticorpos IgG alérgenos-específicos podem ser detectados no soro de pacientes atópicos e não atópicos, sendo as principais subclasses IgG1 e IgG4 (FLICKER; VALENTA, 2003; KEMENY et al., 1989). Tem-se demonstrado o aumento da prevalência das doenças alérgicas por décadas principalmente em crianças e adolescentes com sintomas de rinite alérgica, asma e dermatite atópica no Brasil em comparação a outros países da América Latina (DAHER et al., 2009).

Fatores genéticos e ambientais, em particular a exposição alergênica, são cruciais no desenvolvimento de doenças alérgicas mediadas por anticorpos IgE e a ocorrência da exacerbação dos sintomas alérgicos frequentemente estão associados à dificuldade na execução de uma profilaxia efetiva para garantir as medidas preventivas de exposição alergênica, o que torna um grande desafio aos pesquisadores para a busca de novas estratégias terapêuticas, e para tanto, sendo de suma importância o conhecimento profundo da imunopatogenia bem como da fisiopatologia destas doenças (FERNANDES et al., 2017).

Assim, durante a fase inicial da sensibilização alergênica, peptídeos derivados de alérgenos são apresentados através das células apresentadoras de antígeno (APCs) no contexto das moléculas MHC de classe II e reconhecidos pelos receptores das células T CD4⁺ (TCR) *naive*, o qual corresponde ao 1º. sinal da fase cognitiva da resposta imune. Na sequência, ocorre o 2º. sinal por meio da participação das moléculas coestimulatórias que se ligam entre as APCs e células T formando, por analogia, uma “sinapse” imunológica e como 3º. sinal desta fase cognitiva da resposta há produção da citocina IL-4, que será responsável pela ativação do STAT-6 e, subsequentemente, estimulará a expressão do fator de transcrição

GATA-3 em células T CD4+, capacitando estas células a produzirem um perfil de citocinas constituído por IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13, caracterizando esta subpopulação funcional como células Th2. As citocinas IL-4 e IL-13 serão responsáveis por estimularem células B ocasionando a mudança na síntese de classe de anticorpo para IgE, que se ligarão nos receptores Fcε presentes em células alvos como basófilos no sangue e mastócitos em tecidos. Após o contato subsequente com os mesmos alérgenos, os anticorpos IgE ligam-se cruzadamente com os epítomos de alérgenos, desencadeando a ativação das células alvos e consequente liberação de grânulos contendo mediadores vasoativos pré-formados como histamina, cininas, fatores quimiotáticos para eosinófilos, fatores quimiotáticos para neutrófilos, entre outros. A histamina causará vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar, que serão responsáveis pela produção da hiperemia e edema ou hipersecreção, respectivamente, e em brônquios e bronquíolos a histamina ocasionará contração da musculatura lisa e produção de muco. Em adição, para agravar o processo inflamatório alérgico, a citocina IL-5 atrai e ativa eosinófilos, característica marcante em doenças alérgicas clássicas. A sintomatologia irá depender do(s) órgão(s) afetado(s), podendo ocorrer anafilaxia, asma, conjuntivite alérgica, dermatite atópica, rinite alérgica, urticária, etc. (KALLINICH et al., 2007; BIEDERMANN et al., 2015; TAKETOMI et al., 2017).

1.2 Dermatite Atópica e mecanismos imunológicos

A dermatite atópica (DA) ou eczema atópico é uma doença inflamatória associada com prurido crônico, na qual uma substância alérgica ou irritativa induz uma resposta imunológica, afetando o maior órgão do corpo humano: a pele. Os sinais e sintomas relacionados são lesões eczematosas, prurido e vermelhidão, sendo a DA considerada uma doença multifatorial envolvendo predisposição genética, fatores ambientais, poluentes, exposição alergênica, dentre outros fatores (RUZICKA et al., 2017). A incidência da DA é observada principalmente em crianças e adolescentes, mas devido ao seu caráter crônico, o quadro clínico pode persistir na fase adulta, sendo a qualidade de vida destes indivíduos muito prejudicada em vários aspectos como o social, econômico e familiar, acarretando um verdadeiro colapso psicológico em muitos pacientes (ABUABARA et al., 2018). Em adição, os resultados terapêuticos da DA na maioria das vezes não são satisfatórios, e os sintomas e as lesões de pele afetam enormemente a qualidade de vida destes pacientes, com isso vários

estudos têm como objetivo amenizar um dos sintomas mais inconvenientes da doença: o prurido intenso, que causa exacerbação das lesões, distúrbios do sono e desconforto social (SILVERBERG, 2019).

Devido à forte presença da predisposição genética em pacientes com DA, frequentemente se observa a marcha atópica, onde a DA na infância se torna o gatilho na evolução para outras doenças como a asma e a rinite alérgica em crianças em idade escolar e na adolescência, uma vez que há evidente tendência a produzir excessivamente os anticorpos IgE dirigidos especificamente a antígenos alimentares e ambientais, principalmente aos aeroalérgenos (AMARAL; MARCH; SANT'ANNA, 2012).

O fator genético também é um causador intrínseco para a manifestação da DA, pois mutações no gene que codificam a proteína da filagrina (FLG), uma proteína de 37 kDa que contribui para estrutura e função do estrato córneo e inibe a perda de água transepidermica (TEWL – transepidermal water loss), causam mudanças na função da barreira epitelial ou composição lipídica. Dessa forma, as alterações nos genes dessa proteína permite a penetração de microrganismos facilitando a captura de alérgenos pelas APCs (células apresentadoras de antígeno) e posterior apresentação de alérgenos às células T CD4+ para desenvolverem em células do perfil Th2 produtoras de citocinas IL-4 e IL-13, os quais são cruciais na fase de sensibilização atópica sistêmica desencadeando a ativação de células B produtoras de anticorpos da classe IgE (BRUNNER; LEUNG; GUTTMAN-YASSKY, 2018; BIAGIONI et al., 2019).

A deficiência de filagrina é considerada uma característica de suma importância para dar início ao processo patogênico primário da DA, pois causa a perda da hidratação da pele, aumento do pH epidérmico que tem como consequência o aumento da atividade de serina-proteases, as quais ocasionam lesões em células da epiderme, com isso iniciam a produção de citocinas como TSLP, IL-25 e IL33, provocando reações inflamatórias locais. Também, a falta desta proteína altera a flora microbiana cutânea permitindo a entrada de patógenos na superfície da pele, dentre eles *Staphylococcus aureus* e a *Candida albicans* (TAKETOMI et al., 2017; CEPELAK, I;DODIG, S;PAVIC, 2019).

A dermatite atópica pode ser caracterizada de acordo com o perfil de células envolvidas no processo inflamatório como o perfil de células Th17 com pouca participação de células Th2/Th22 na DA asiática, chamada de dermatite intrínseca, que afeta cerca de 20% dos pacientes os quais expressam níveis de IgE séricos normais, e a DA extrínseca que é

comumente identificada em afro-americanos apresentando evidente perfil Th2/Th22 em relação às células de perfil Th1, definida pela presença de IgE sérica alta (RENERT-YUVAL; GUTTMAN-YASSKY, 2019; JIN; YOON, 2018).

As classificações da DA pode ser explicada de duas formas distintas em relação à etiopatogenia da doença, uma forma extrínseca está associada com a sensibilização alérgica por meio da produção de anticorpos IgE que é acompanhado de um processo inflamatório com predomínio de eosinófilos através da produção de IL-5 e também células T de memória que expressam o receptor *homing* denominado de CLA (*Cutaneous lymphocyte antigen*), cujos receptores medeiam a localização/migração destas células na pele, exercendo um papel importante para ocasionar as manifestações cutâneas (Figura 1). O desenvolvimento predominante de uma resposta de células Th2 é a produção de citocinas IL-4 e IL-10, que inibem o desenvolvimento de células Th1 e mantêm a ativação de células Th2 que usualmente é observada nas lesões de DA (LEUNG, 1995). A outra forma chamada intrínseca da DA observa-se baixa produção de citocinas IL-4 e IL-13, não havendo produção de anticorpos IgE clinicamente relevantes, sendo a doença também de caráter crônico (LEUNG et al., 2004).

A Dermatite Atópica é desencadeada por substâncias antigênicas e irritantes que antes se observava o predomínio de células do perfil Th2 ou Th1 dependendo da fase da doença, sendo a resposta de perfil Th2 a que contribui com o aumento e diferenciação clonal das células caracterizando as lesões agudas, e a resposta de perfil Th1 que se caracteriza pela a produção de IFN- γ , o qual induz apoptose no epitélio originando as lesões eczematosas de curso crônico. Atualmente, relacionam-se que os perfis representados pelas células Th2 e Th22 estão fortemente relacionados com a fase aguda da doença, com o desenvolvimento posterior de células do perfil Th1 e Th17 tardiamente representando a fase crônica (RENERT-YUVAL; GUTTMAN-YASSKY, 2019).

As células Treg antígeno-específicas são capazes de diminuir as respostas Th1 e Th2 por meio da liberação de citocinas imunoregulatórias IL-10 e TGF- β quando da interação com alérgenos específicos. O equilíbrio entre a célula Th2 e Treg é essencial para suprimir as reações alérgicas exercendo a função reguladora nos linfócitos B, por meio das citocinas IL-10 e TGF- β que são responsáveis pela mudança de isotipo, para a síntese de anticorpos IgG4 e IgA, respectivamente, e conseqüentemente, suprimindo a síntese de IgE no endotélio capilar, tecidos e células epiteliais, diminuindo as atividades pró-inflamatórias (LARCHÉ; AKDIS; VALENTA, 2006).

A DA se inicia com uma fase aguda que é marcada pela ativação de uma resposta de perfil Th2, Th17 e Th22, e há uma transição para a fase crônica que é observada com a ativação de células do perfil Th1. As interleucinas IL-4 e IL-13 estimulam os queratinócitos a produzirem o TSLP (*Thymic stromal lymphopoietin*), que em conjunto trabalham para regular positivamente impulsionando a polarização de células Th2, com isto os sintomas da DA aparecem devido a inibição de proteínas como filagrina, loricrina e redução dos ácidos graxos livres e ceramidas que são de extrema importância para a integridade tecidual, que provoca a pele seca. Figura 1 (GUTTMAN-YASSKY; KRUEGER; LEBWOHL, 2018). O desenvolvimento das respostas inflamatórias responsáveis pela formação das lesões típicas de DA é mediada pela resposta Th2, promovendo a incapacidade dos queratinócitos de sintetizar peptídeos essenciais para regulação de respostas imunes inatas contra microorganismos patogênicos, potencializando assim a entrada destes patógenos externos nas lesões (ONG et al., 2002; NOMURA et al., 2003). Além das atividades pró-inflamatórias, na epiderme, os queratinócitos são capazes também de reconhecer antígenos na presença da citocina IL-33, desencadeando respostas imunes precoces de células Th2, além da resposta Th1 que é observada tardiamente na doença (CHOI et al., 2017).

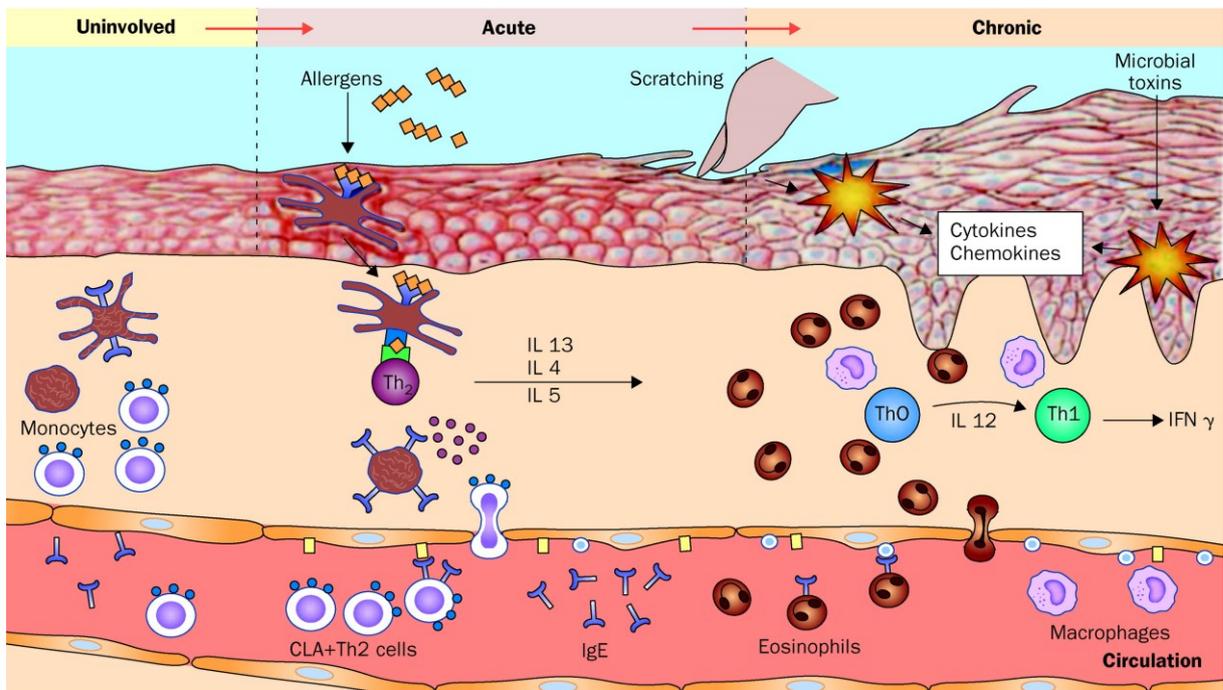


Figura 1. Mecanismo Imunológico da Dermatite atópica

Fonte: (LEUNG, BIEBER, 2003)

Mais recentemente, têm-se descrito que as células linfóides inatas do tipo 2 (ILCs 2) também estão presentes nas lesões cutâneas da DA e possuem a capacidade de produzir a citocina IL-5 que é responsável pelo recrutamento de eosinófilos e caracteristicamente está envolvida nas respostas contra parasitos helmínticos e alergias respiratórias, que tem como função exacerbar a inflamação dos tecidos (ROEDIGER et al., 2013).

Além das ILC2, as Th2 secretam citocinas IL-4 e IL-13 que participam do *downregulation* dos genes da diferenciação epidérmica, o qual influencia diretamente na *secura* da pele. A IL-31 é a principal citocina mediadora do prurido cutâneo; a IL-5 ativa granulócitos, tais como eosinófilos, basófilos e mastócitos, os quais estão envolvidos na liberação de vários mediadores que desencadeiam a inflamação, edema e acúmulo de células imunológicas na pele (EYERICH; EYERICH, 2018).

1.3 Características clínicas e histológicas da Dermatite Atópica

A pele não lesionada de um paciente com DA comparado ao um indivíduo normal é extremamente seca (*xerose*) desde que uma das camadas da epiderme afetadas na DA é o estrato córneo, essencial para manter a integridade da pele, participa da hidratação, permeabilidade de substâncias exógenas e também das junções intercelulares que são responsáveis pela integridade funcional dos queratinócitos. A disfunção destas barreiras pode estar relacionada com as respostas imunes inflamatórias que degradam as proteínas da camada epitelial, favorecendo o aumento da perda de água transepidérmica (TWEL) (DE BENEDETTO et al., 2011a). Já na pele lesionada observa-se o estado inflamatório agudo com eczemas, apresentando pápulas eritematosas pruriginosas com presença de escoriações e exsudato seroso (EICHENFIELD et al., 2014). Dessa forma, a ocorrência de alterações na barreira epitelial dos pacientes com DA permite a entrada de alérgenos, microrganismos, antígenos e irritantes na derme, contribuindo tipicamente para o desenvolvimento de uma resposta imune de perfil Th2, causando a inflamação comumente observada nas lesões iniciais na pele (WALLACH, 2017). Além disso, a *secura* da pele está relacionada com a perda de lipídios através do estrato córneo, além dos defeitos no gene de proteínas de diferenciação epidérmica, como a filagrina (FLG) descritas anteriormente.

A expressão de proteases e antiproteases no organismo é uma causa favorável ao aparecimento dos sinais e sintomas, os quais tem como característica a descamação e escoriações da pele afetada (DE BENEDETTO et al., 2011b; O'REGAN et al., 2008).

Tomados em conjunto, devidos a estas alterações, o paciente com DA apresenta prurido intenso, uma característica de grande relevância clínica, uma vez que é a causa da exacerbação das lesões da DA, sendo um dos sintomas mais desagradáveis provocado pelo ato repentino de coçar a pele, muitas vezes é bastante desconfortável em vários pacientes que mesmo com o uso de anti-histamínicos não há controle satisfatório do prurido (HASHIMOTO et al., 2004). Em adição, a IL-31 é uma das citocinas responsáveis pelo desencadeamento do prurido, produzida por células de perfil Th2 sendo altamente expressa em lesões com DA, esta citocina promove alongamento das fibras nervosas sensoriais da epiderme. As citocinas IL-4 e IL-13 participam no processo de amplificar o sinal nas lesões e induzir a produção de IL-31 associada com a histamina liberada de mastócitos ativados, causando assim o prurido crônico constantemente observado na doença (FURUE, M; ULZIL, D; VU, Y, H; TSUJI, G; KIDO-NAKAHARA, M; NAKAHARA, 2019).

Na histopatologia da fase aguda da DA, observa-se a derme lesionada apresentando infiltrado celular com a expressão das moléculas de adesão localizadas no endotélio vascular, ativando no local o início dos processos de ligação, ativação e adesão das células inflamatórias que invadem o tecido com respostas quimiotáticas em direção à lesão ou infecção, permitindo o início da inflamação local e recrutamento de células de perfil Th2 (LEUNG et al., 2004).

Os mecanismos da DA se assemelham muito com a psoríase, incluindo distúrbios clínicos com infiltração de células na derme, expressão excessiva de citocinas pró-inflamatórias e alterações nas barreiras da epiderme. Porém no paciente com psoríase a epiderme é bastante espessa, capilares sanguíneos se estendem até a superfície da pele com o acúmulo de granulócitos neutrofílicos formando microabscessos, que aparecem principalmente em articulações de joelhos e cotovelos causando desconforto para os indivíduos (SABAT et al., 2019).

As lesões presentes na DA são em sua maioria desencadeadas por agentes externos que atravessam a barreira epidérmica causada por alterações genéticas principalmente em proteínas que compõem a barreira epitelial (GUTTMAN-YASSKY; KRUEGER; LEBWOHL, 2018).

Há várias citocinas que atuam em conjunto com estas células epiteliais, como o aumento da expressão de IL-16 na superfície de células T CD4 que é observada nas lesões cutâneas precoces (LABERGE et al., 2005). Já nas lesões crônicas nota-se predominância da expressão da citocina GM-CSF e IL-5 na epiderme que permite a sobrevivência de eosinófilos, macrófagos e LCs (células de Langerhans) (ONO et al., 2003).

1.4 Modelo Experimental de Dermatite Atópica

A indução da dermatite atópica em modelos experimentais tem sido utilizada em pesquisas para tratamento da DA, com a finalidade de buscar tratamentos específicos baseados na etiologia da doença, como os fatores genéticos e disfunção na barreira epidérmica. Uns dos tratamentos mais atuais utilizados e pesquisados são as imunoterapias que amenizam os sintomas de prurido, xerose e rachaduras na pele (LI et al., 2006).

A ovalbumina (OVA) tem sido utilizada para sensibilização tópica alérgica em camundongos participando do rompimento da barreira epidérmica no início da inflamação local. Em estudos anteriores, a sensibilização epicutânea e cutânea com OVA após a ruptura da barreira epitelial com álcool 70%, induz IgE específica e respostas imediatas (HAN; ROAN; ZIEGLER, 2017; SALOCA et al., 1994). A OVA também foi utilizada em conjunto com o calcipotriol e enterotoxina B (estafilocócica) para criação de um modelo experimental rápido de DA, cujos resultados mostraram que realmente essa tríade causou lesões inflamatórias e aumentou citocinas de perfil Th2 em camundongos (TAN et al., 2017).

Soumelis et al (2002) demonstraram que o TSLP produzido por queratinócitos epidérmicos de pacientes com DA, é similar a citocina que afeta os queratinócitos em camundongos, provocando a doença. Isto explica que o TSLP consegue atuar como uma citocina iniciadora de eventos imunológicos fenotípicos que se assemelham à DA, mas outros mecanismos podem estar envolvidos na patogênese da doença como as sinalizações de vitamina D3 e ácido retinoico.

A vitamina D é obtida através da conversão cutânea de 7-desidrocholesterol em pré-vitamina D3, sendo absorvida pela exposição à radiação ultravioleta na pele ou da ingestão de alimentos e/ou suplementos pelo intestino. Sua função é atuar como um hormônio para o metabolismo de cálcio, e participar da formação de uma camada cornificada e síntese de uma barreira lipídica (BIKLE, 2011). Alguns estudos relatam que a suplementação de vitamina D

em excesso durante a infância e gestação pode desencadear a dermatite atópica e asma tardiamente na adolescência (MESQUITA; IGREJA; COSTA, 2013). O calcipotriol pode ser utilizado como uma terapia para tratamento da DA, mas há estudos relatando que sua aplicação como monoterapia utilizando 50µg duas vezes por dia pode causar irritação perilesional na pele (SEGAERT et al., 2017).

Aplicação tópica de calcipotriol em camundongos oferece um modelo semelhante a DA em humanos, induzindo altos níveis de TSLP e infiltração de células ILCs do grupo 2 com citocinas IL-5 e IL-13 envolvidas nas lesões (MARTEL et al., 2017).

1.5 Tratamento tópico para Dermatite Atópica

1.5.1 Corticoesteroides, inibidores de calcineurina e anticorpos monoclonais

O uso contínuo de corticoesteroides tópicos está associado à riscos para o paciente, pois causa atrofia da epiderme, irritação e lesões exacerbadas na pele, aumentando a perda de água transepidermica, afinamento da pele e disfunção da barreira epitelial (SEGAERT et al., 2017). Dependendo da área corpórea aplicada, o organismo absorve estes medicamentos e podem provocar alterações hormonais aumentando níveis de glicose no sangue, pressão arterial e densidade óssea, estes efeitos adversos afetam crianças com DA (WON et al., 2004).

Os inibidores tópicos de calcineurina como tacrolimus e pimecrolimus podem inibir a ativação de células T que dependem da calcineurina que é uma proteína localizada no citoplasma de várias células dendríticas e depois de ativada, reduz interleucinas inflamatórias como IL-5, IL-10 e IL-13. Essa ativação é dependente de cálcio e inclui ainda as proteínas calmodulina e imunofilinas (LIMA, 2007; SIMON et al., 2005). São considerados agentes imunossupressores tópicos e na maioria das vezes a indicação é para pacientes com DA grave (CURY MARTINS et al., 2015).

Os anticorpos monoclonais direcionados contra determinadas citocinas-chave envolvidas na DA têm proporcionado alívio dos sintomas da DA moderada a grave. Neste contexto, Dupilumab é um anticorpo monoclonal humanizado direcionado contra o receptor alfa da IL-4, sendo capaz de bloquear a ação das citocinas IL-4 e IL-13, uma vez que estas duas citocinas utilizam este mesmo receptor (HAJAR; GONTIJO; HANIFIN, 2018). O bloqueio destas citocinas melhoram a inflamação local, restaura a barreira epidérmica

umentando as proteínas do epitélio, mas os efeitos adversos são existentes em alguns pacientes apresentando reações no local da injeção, nasofaringite, conjuntivite e infecção respiratórias (SIMPSON et al., 2016). O nemolizumab é outro imunobiológico que é responsável por bloquear o receptor da IL-31, amenizando sintomas de prurido excessivo e distúrbios do sono ocasionados pela DA (HAJAR; GONTIJO; HANIFIN, 2018).

A maioria dos pacientes utilizam os tratamentos anteriores concomitante à emolientes e hidratantes locais, pois estes amenizam as lesões visíveis na pele e auxiliam a manter a hidratação da barreira epidérmica (JOHNSON et al., 2019).

1.5.2 Moléculas de adesão como estratégia terapêutica

As interações entre moléculas de adesão são primordiais na manutenção da barreira epidérmica permitindo comunicações com a membrana plasmática. Os componentes participantes destas interações são as junções intercelulares com proteínas de membranas integrais: ocludinas, claudinas e desmossomos que permite a adesão célula a célula através das caderinas (NAKAI et al., 2012; FERNANDES et al., 2017).

Existem várias moléculas na família das caderinas que participam do processo de adesão das células epiteliais, sendo uma delas a e-caderina epitelial, que são glicoproteínas localizadas nas junções de adesão intercelular, permitindo adesão célula-célula e rápido crescimento tecidual (FERNANDES et al., 2017; TUNGGAL et al., 2005; TINKLE et al., 2008). A e-caderina de camundongo, também conhecida como uvomurulina, compartilha cerca de 92% da identidade de aminoácidos com o rato e 81% com a e-caderina humana (BUSSEMAKERS et al., 1993). Há importantes proteínas responsáveis por reconstituir e manter os componentes lipídicos naturais na pele, como a filagrina, em que a sua deficiência em alguns indivíduos leva a redução da molécula de adesão e-caderina (NAKAI et al., 2012).

A e-caderina é considerada uma proteína transmembrânica que confere adesão através de interações dependentes de Ca^{++} e está associada com movimentos celulares, alterações fisiológicas e processos patológicos epiteliais ou cancerígenos. Além disso, possui mecanismo proteolítico que é importante para a regulação e expressão da superfície celular. Observa-se que pacientes com dermatite atópica possuem deficiências em relação à produção de proteínas de adesão celular, levando a um quadro eczematoso (MARETZKY et al., 2008).

Proteína e-caderina participa da interação de células adjacentes da camada basal do epitélio sendo um componente importante da zônula aderente, pois regula o fenótipo epitelial

e é também considerada o centro da sinalização intracelular por regular o crescimento e migração das células epiteliais (KOURTIDIS et al., 2017).

Visto que e-caderina participa destes processos de adesão das junções celulares e desmossomos, observa-se defeitos em sua função que afeta queratinócitos epidérmicos na doença autoimune do pênfigo vulgar (PV) em que os pacientes apresentam xerofthalmia (olho seco) que prejudica as glândulas meibomianas responsáveis por realizar a manutenção da saúde ocular. Neste contexto as e-caderinas são fundamentais para coesão e produção de lipídios permitindo a diferenciação e proliferação dos meibócitos, permitindo a hidratação ocular. A disfunção fisiológica dessa molécula no pênfigo afeta as células epidérmicas através de autoanticorpos que se tornam patogênicos modulando a via de sinalização e alterando os processos morfológicos das células (RÖTZER V, MELEGA F, GARREIS F, PAULSEN F, 2019).

As caderinas desmossomais na membrana se ligam às e-caderinas, β -cateninas e outras moléculas das junções aderentes para formação de *clusters* de desmossomos. No pênfigo vulgar, os autoanticorpos clivam e desfazem esses *clusters*, provocando a formação de bolhas na epiderme do paciente (SPINDLER; WASCHKE, 2018).

Em outro contexto, a e-caderina pode sofrer mutações, principalmente em relação à uma molécula chamada CIP (inibição da proliferação por contato) que emite sinais inibitórios para as células epiteliais atingirem sua confluência e possuir um limite de proliferação. A ausência dessa molécula, devido a mutações, aumenta a proliferação das células epiteliais de forma desordenada, podendo acarretar metástases de tumores epiteliais. A baixa expressão da e-caderina também pode afetar a adesão entre as células, desestabilizando-as e ocasionando um fenótipo mesenquimal, permitindo a invasão e aumento de células tumorais (MENDONSA; NA; GUMBINER, 2018).

Neste cenário carcinogênico, a re-expressão da e-caderina em grande quantidade pode acarretar a metástase das células tumorais em vários órgãos e tecidos, pois este processo depende inteiramente da adesão das células tumorais com células saudáveis para estabilização do agregado tumoral (MENDONSA; NA; GUMBINER, 2018). É importante notar que estes efeitos adversos da e-caderina estão relacionados com cânceres já pré-estabelecidos, uma vez que em nenhum estudo foi descrito estes efeitos em células saudáveis.

De acordo com os estudos *in vitro* realizados com a e-caderina, foram observados os benefícios da mesma em relação a adesão das células epiteliais e a conexão com moléculas

das junções aderentes, além de proporcionar estabilização dos queratinócitos epidérmicos que permitem a manutenção da barreira epitelial. Em pacientes com DA observa-se desarranjo das células epiteliais e a perda da expressão de e-caderina na epiderme (CHAO; SHEPARD; WELLS, 2010).

Como a e-caderina é uma proteína importante que participa nos processos de junção intercelular, interpretou-se que poderia ser um alvo terapêutico para ser utilizado numa estratégia de tratamento imunobiológico para ser demonstrada a sua eficácia clínica no tratamento da DA. Assim, a e-caderina em aplicação tópica foi utilizada neste presente trabalho, com o intuito de verificar os efeitos benéficos anti-inflamatórios importantes na recuperação das lesões tipo DA induzida por calcipotriol em camundongos por meio da observação clínica, histopatológica e dos parâmetros imunológicos, que possam justificar a diminuição da atividade inflamatória alérgica local, corroborando no futuro em breve no alcance da melhoria da qualidade de vida dos pacientes portadores de DA.

2. HIPÓTESES

Em relação à análise clínica, histopatológica e respostas inflamatórias celulares das lesões induzidas por calcipotriol com ou sem ovalbumina e tratadas com e-caderina recombinante de camundongo, podemos observar as seguintes hipóteses:

- H0:** O calcipotriol induzirá lesões compatíveis com a Dermatite Atópica em camundongos e o uso concomitante de ovalbumina terá efeito sinérgico. Após a aplicação tópica de e-caderina não haverá melhora clínica das lesões e nem interferência na produção de IgE sérica bem como nos níveis de citocinas inflamatórias *in situ* (teciduais).
- **H1:** O calcipotriol induzirá lesões compatíveis com a Dermatite Atópica em camundongos e o uso concomitante de ovalbumina terá efeito sinérgico. Após a aplicação tópica de e-caderina haverá melhora clínica das lesões, diminuição dos níveis de IgE sérica e dos níveis de citocinas inflamatórias teciduais.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Geral

Realizar análise histopatológica e da resposta inflamatória *in vivo* e *in vitro* das lesões com dermatite atópica em camundongos induzidas por calcipotriol com ou sem ovalbumina e tratadas com e-caderina recombinante murina.

3.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer protocolo de um modelo experimental de dermatite atópica induzida por calcipotriol com ou sem ovalbumina;
- Observar a indução clínica da DA e suas respectivas análises histopatológicas do modelo experimental com aplicação tópica do calcipotriol com ou sem ovalbumina;
- Observar o nível sérico de IgE total e tecidual de imunoglobulina E (IgE) e IL-5 nas lesões induzidas por calcipotriol com ou sem ovalbumina, em camundongos tratados ou não com e-caderina;
- Analisar os parâmetros clínicos, imunológicos e histopatológicos das lesões tipo DA induzidas por calcipotriol em camundongos com ou sem tratamento com e-caderina.

4. METODOLOGIA

4.1 Local dos experimentos e ética

O estudo foi realizado na Rede de Biotérios de roedores (REBIR) e no Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica da Universidade Federal de Uberlândia (LALIC/UFU), obedecendo às normas para manuseio de animais do Colégio Brasileiro de Experimentação Ambiental (COBEA). O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da UFU sob o protocolo no. 013/17.

4.2 Modelo Experimental

Foram utilizados um total de 45 camundongos BALB/c, fêmeas, com peso de 20g e idade aproximada de 8-10 semanas, adquiridos na Rede de Biotérios e roedores da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR-UFU). Os camundongos foram alimentados com dieta padrão do biotério e água filtrada autoclavada sobre livre demanda (*ad libitum*) e colocados em caixas esterilizadas nas estantes com sistema de injeção e exaustão de ar, com 12 horas de ciclo dia e noite.

4.3 Indução de Dermatite Atópica em camundongos

O composto utilizado para a indução da dermatite atópica foi o calcipotriol (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, E.U.A) com ou sem ovalbumina (Sigma, St Louis, MO, E.U.A.) para sensibilização alérgica. O protocolo do desenho experimental é mostrado na figura 2A e 2B.

Foi utilizado para a indução um total de 20 camundongos BALB/c, aleatoriamente divididos em cinco grupos com 4 animais em cada caixa: 1 pmol de calcipotriol, 4 pmoles de calcipotriol, 1 pmol de calcipotriol e 20 µg de ovalbumina, 4 pmoles de calcipotriol e 20 µg de OVA e o grupo normal sem indução por calcipotriol ou sensibilização alérgica por OVA.

Foi aplicado com uma micropipeta de volume 5-20 µl, um volume total de 20 µl de calcipotriol diluído em etanol P.A. nas orelhas direitas dos camundongos contendo uma massa por sítio de aplicação de 1 pmol no Grupo 1 e 4 pmoles no Grupo 2, também foi

aplicado o mesmo volume do veículo (etanol P.A) na orelha esquerda de cada animal. Esse protocolo teve a duração de 28 dias consecutivos, sendo as aplicações realizadas durante o mesmo horário pela manhã, intervalo de 24 horas entre cada aplicação. Nos grupos com ovalbumina (OVA), foi realizada uma sensibilização alérgênica no primeiro dia através de injeção intraperitoneal de 100 μg de OVA dissolvida em solução salina tamponada com fosfato (PBS) esterilizada, em seguida foi feita a sensibilização cutânea com 20 μg de OVA nos dias 7, 14, 21 e 28 na direita orelha, nos demais dias foram aplicados 20 μl de calcipotriol uma vez ao dia, contendo na massa por sítio de aplicação 1 pmol para o grupo 3 ou 4 pmoles para o grupo 4. Nos dias 1, 7, 14, 21 e 28 a espessura da orelha (mm) foi medida usando um paquímetro digital (Mitutoyo, Kawasaki, Japão). Este protocolo de sensibilização também teve a duração de 28 dias consecutivos.

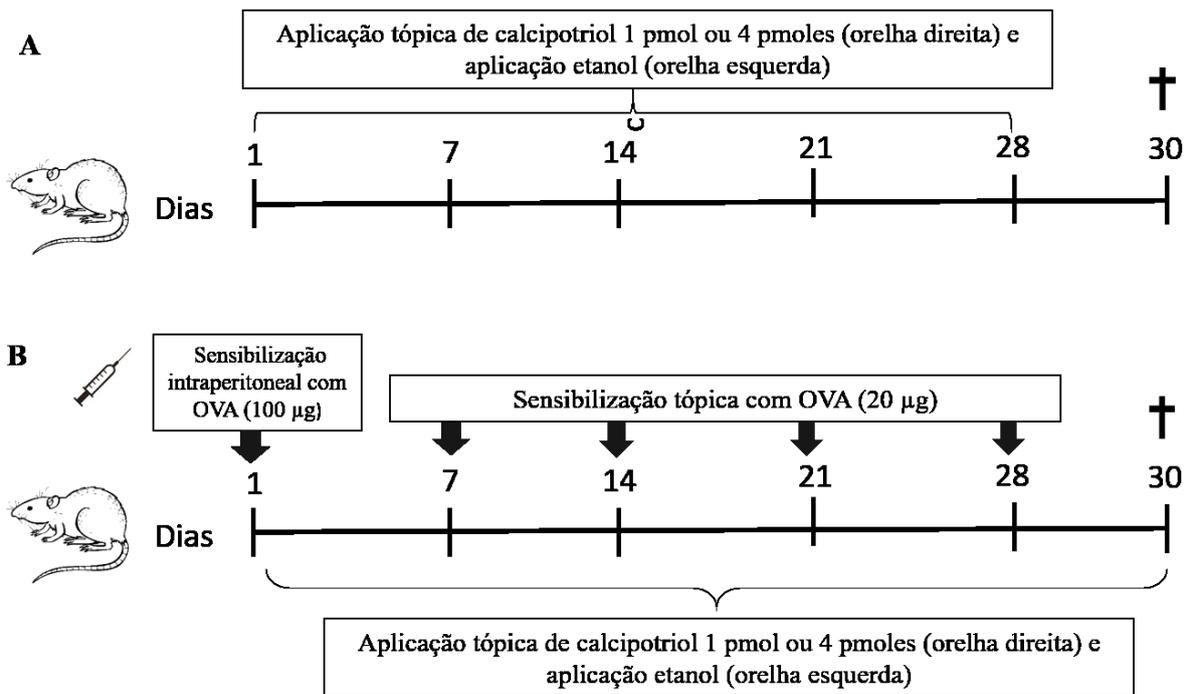


Figura 2. Desenho experimental do protocolo de indução de dermatite atópica em camundongos.

4.4 Tratamento tópico em lesões de dermatite atópica

No protocolo para tratamento da DA, foram utilizadas três concentrações diferentes de e-caderina recombinante de camundongo (RD Systems). Primeiramente para obtenção da

solução mãe da e-caderina, a mesma foi reconstituída em 250 µg/ml de água de injeção, de acordo com as instruções do fabricante e em sequência foram feitas alíquotas de 100 µl da solução. Cada alíquota contendo a concentração da e-caderina foram utilizadas para formulação da pomada, com base oleosa contendo conservante e antioxidante de butil-hidroxitolueno (BHT), um emoliente que consiste em lanolina solúvel em água e vaselina sólida que é um emoliente umectante.

Foi utilizado para o protocolo de tratamento um total de 25 camundongos que foram divididos aleatoriamente em cinco grupos: o grupo negativo (controle) sem lesão de DA, o grupo positivo induzido com a concentração estabelecida de 4 pmoles de calcipotriol, grupo tratado com 0,5 µg/ml, 1 µg/ml ou 2 µg/ml de e-caderina recombinante de camundongo. As concentrações de e-caderina foram definidas de acordo estudos realizados *in vitro* com a medição de sua atividade em uma cultura de células de câncer de mama humano (MCF-7) para observação da capacidade de imobilização da proteína de suportar a adesão entre estas células, estabelecendo a dose efetiva de 0,25-1 µg/ml (CHAO; SHEPARD; WELLS, 2010)

Os grupos tratados foram induzidos na orelha direita com o protocolo de 4 pmoles de calcipotriol e a partir do 21º dia iniciou-se uma vez ao dia, à tarde, o tratamento com uma pincelada da pomada nas diferentes concentrações de e-caderina, uma vez ao dia durante 14 dias consecutivos, de acordo com o protocolo de tratamento de um estudo que utilizou tacrolimus (CURY MARTINS et al., 2015). O calcipotriol foi aplicado continuamente todas as manhãs até o dia 35. Foi aplicado a base da pomada utilizada como veículo, no grupo controle positivo que havia lesões de DA induzidas com 4 pmoles de calcipotriol, com a finalidade de se certificar que a base da pomada não contendo e-caderina, contribuiria ou não no tratamento das lesões (Figura 3).

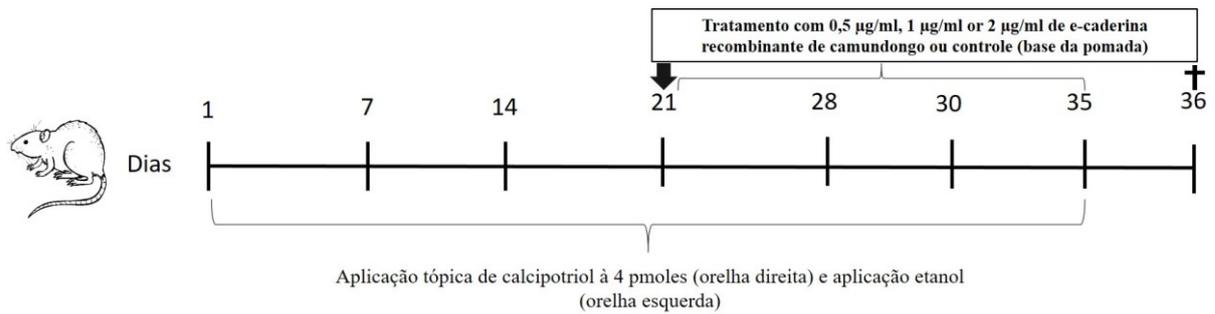


Figura 3. Desenho experimental do protocolo de tratamento tópico com e-caderina recombinante de camundongo.

4.5 Coleta das amostras

Todos os camundongos do grupo com lesões semelhantes à AD induzidas por calcipotriol foram eutanasiados no dia 30 e os grupos tratados com e-caderina no dia 36. Em sequência, foi realizada a coleta das amostras de sangue e orelhas para análises histopatológicas. As amostras de sangue foram coletadas do plexo orbital através de uma cânula com heparina, e depois foram colocadas em tubos eppendorf submetidos à uma centrifugação a $1700 \times g$ à $23 \text{ }^\circ\text{C}$ para obtenção dos soros que logo foram armazenados a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ até a análise posterior. As orelhas direita e esquerda foram coletadas e divididas de forma transversal (ápice até a base da orelha) em duas partes iguais: a primeira parte das orelhas foi processada em homogeneizador rotativo para homogeneização dos tecidos, que logo foram submetidas à uma centrifugação a $17000 \times g$ à $4 \text{ }^\circ\text{C}$, e o sobrenadante foi coletado e imediatamente armazenado a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ para posterior análise. A segunda parte das orelhas foi fixada em formaldeído a 4% por 24 horas para o processamento histológico.

4.6 Exame histopatológico

Para a retirada da orelha dos camundongos, o corpo do animal foi estirado uma bancada exclusiva da sala cirúrgica do biotério, após antissepsia com álcool 70%. Os cortes foram realizados com tesoura apropriada e pinça anatômica para manusear os tecidos, e logo em seguida, foram fixados em parafina para confecção de blocos histológicos, os quais foram cortados no micrótomo (Leica) em finas camadas com $5 \text{ }\mu\text{m}$ de espessura. Estes cortes foram

“pescados” com lâmina de microscopia identificada com os nomes dos grupos e depois colocadas em uma estufa à 37 °C para secagem durante 24 horas.

Etapas do processamento para análise histopatológica dos tecidos (MONTANARI, 2016):

- Fixação com formalina 10% em tecidos previamente cortados, com a finalidade de se manter a integridade dos tecidos após a morte sem alterações em sua estrutura.
- Desidratação do tecido através de álcool etílico 70% para a retirada total de água das células e permitir a infiltração da parafina no tecido.
- Clarificação por xilol, ajuda na completa eliminação da água, álcool e gorduras contidas ou retidas no tecido.
- Impregnação por meio da parafina, onde há eliminação do xilol e penetração da parafina.
- Inclusão dos blocos de parafina
- Microtomia para obtenção dos cortes histológicos de aproximadamente 5 µm transparentes e visíveis no microscópio óptico.
- Os cortes foram corados com Hematoxilina (Harris) e Eosina-Phloxine (H & E) ou azul de toluidina.
- Leitura histopatológica em microscópio óptico de luz (Leica, Solms, Alemanha). As imagens foram gravadas para análise posterior.

4.7 Dosagem dos níveis de IgE total no homogenato de tecido e soro

Os níveis de IgE total no soro e no homogenato de tecido de orelha foram quantificados utilizando o kit ELISA para detecção de IgE total de camundongo (Bethyl Laboratories, EUA). A placa de 96 poços foi sensibilizada com anticorpo de afinidade anti-IgE de camundongo purificado (1: 100) diluído em tampão de carbonato- bicarbonato pH 9,6 a incubação foi de 1 hora à temperatura ambiente (RT). Para o bloqueio de ligações inespecíficas o tampão utilizado foi com 50 mM Tris, 0,14 M NaCl e 1% de BSA pH 8,0. Foi adicionado em cada poço 100 µl da solução de bloqueio durante 30 minutos à temperatura ambiente, a placa foi lavada 5 vezes. Em seguida foram colocadas as amostras puras de soro, sobrenadante do homogenato da orelha ou a curva padrão diluída, ambas no volume de 50 µl/ poço com o diluente 50 mM Tris, 0,14 M NaCl e 1% de BSA e PBS Tween20 0,05%, a placa

foi incubada a temperatura ambiente por 1 hora. Logo após a lavagem da placa com as amostras, foi adicionado na mesma o anticorpo de detecção anti-IgE de camundongo marcado com HRP (1: 75.000) diluído em tampão Tris 50 mM, NaCl 0,14 M, 1 % BSA e 0,05% de Tween 20 durante 1 hora à temperatura ambiente. A reação foi revelada pela adição de TMB (TetraMetilBenzidina) e a absorbância foi lida em um espectrofotômetro a 450 nm. Entre os intervalos de incubação a placa foi lavada 5 vezes com PBS Tween 0,05%.

A análise dos resultados das amostras de soro e homogenato de orelha dos camundongos foi expressa de acordo com a curva padrão controle feita em duplicata obtida com a IgE total. O limite de detecção deste ensaio foi de 3,9 ng/ml.

4.8 Dosagem dos níveis de IL-5, IL-10 e linfopoetina estromal tímica (TSLP) no homogenato de tecido

Os níveis de citocina IL-5 e IL-10 no sobrenadante de homogenato do tecido da orelha foram medidos usando, respectivamente, kit IL-5 ELISA de camundongo (BD OptEIA™) e kit IL-10 de camundongo (BD OptEIA™), de acordo com as instruções do fabricante. A placa de 96 poços de alta afinidade foi sensibilizada com anticorpo de captura de anti-IL-5 ou anti-IL-10, ambos de camundongo com diluição de 1: 250 e incubada *overnight* a 4 °C. O bloqueio foi realizado com solução salina tamponada com fosfato (PBS 1X) e soro bovino fetal (FBS) a 10%, pH 7, e 100 µl foi adicionado aos poços da placa por 30 min à temperatura ambiente. Entre os intervalos de incubação anteriores, a placa foi lavada 3 vezes com PBS tween 0,05%. As amostras do sobrenadante de orelha foi adicionada (50 µl/poço) puras juntamente com a curva padrão diluída com PBS e 10% de FBS, ambos foram incubados em temperatura ambiente por 2 horas. Após a lavagem da placa (5 vezes com PBS tween 0,05%), o anticorpo de detecção utilizado anti-IL-5 biotilado de camundongo ou anti-IL-10 biotilado de camundongo, diluídos a 1:250, foram adicionados 50 µl/poço, respectivamente para IL-5 ou IL-10, durante 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, ambas placas foram incubadas com o conjugado estreptavidina-peroxidase (diluição 1:250; 50µl/poço) por 30 minutos à temperatura ambiente. Após a lavagens das placas por 7 vezes, os ensaios foram desenvolvidos adicionando TMB e logo a leitura da reação foi realizada a 450 nm e após 30 minutos a 570 nm para correlação.

Os níveis de TSLP nos sobrenadantes de homogenato de tecido da orelha foram medidos utilizando o kit TSLP ELISA de camundongo (Invitrogen-Thermo Fischer Scientific), de acordo com os protocolos do fabricante. Primeiramente, a placa com 96 poços foi sensibilizada com anticorpo de captura anti-TSLP de camundongo (diluição 1:250; 100 µl por poço) e incubada *overnight* a 4 °C. Após esta etapa, a placa foi lavada 3 vezes com PBS Tween 0,05%. Na fase de bloqueio foi utilizado o diluente ELISA SPOT (1x) por 1 hora à temperatura ambiente (100 µl/poço). Após a lavagem da placa (5 vezes), as amostras do homogenato de orelha foram adicionadas puras (50 µl/poço) em conjunto com as amostras da curva padrão que foi diluída em ELISA SPOT (1x) e em seguida incubadas por 2 horas a 4 °C. Após este período, a placa foi lavada 5 vezes e o anticorpo de detecção anti-TSLP biotinilado de camundongo foi adicionado em uma diluição de 1:250 (50µl/poço) durante 1 hora à temperatura ambiente. Após novas lavagens (5 vezes), os poços foram incubados com avidina–HRP por 30 minutos em uma diluição de 1:250, e logo o ensaio foi revelado pela adição de TMB por 15 minutos à temperatura ambiente e após a adição da solução de parada (H₃PO₄ - 1M), a leitura da reação foi feita em espectrofotômetro a 450 nm e após 30 minutos a 570 nm para correlação.

A análise dos resultados das citocinas IL-5, IL-10 e TSLP presentes nas amostras do sobrenadante de homogenato da orelha foi expressa de acordo com a curva padrão feita em duplicata obtida, respectivamente com a IL-5, IL-10 e TSLP. O limite de detecção para estas três citocinas foi 16,6 pg/ml.

4.9 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism versão 6.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). Os seguintes testes foram utilizados: Two way ANOVA seguido de pós-teste de Dunnett; One way ANOVA com pós-teste de Tukey e Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Todos os resultados foram considerados significativos a um nível de significância de $p < 0,05$. Os valores de p encontrados foram: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

5. RESULTADOS

5.1 Indução de lesões semelhantes à DA por calcipotriol

Após o período de indução com aplicação tópica local de 20 μ l contendo 4 pmoles de calcipotriol (Grupo 2) durante 28 dias consecutivos, observou-se que essa concentração foi capaz de induzir lesões na orelha dos camundongos compatíveis com lesões semelhantes à DA, apresentando sinais como hiperemia, pele escamosa e edematosa (Fig. 4A). Como mostrado na figura 4B, a espessura da orelha direita no 28º dia do Grupo 2 (0,32 mm) foi significativamente maior que a orelha esquerda deste mesmo grupo (0,16 mm) que recebeu apenas o veículo (etanol), também em relação a orelha normal sem qualquer aplicação (0,16 mm), a orelha direita do grupo com 1 pmol de calcipotriol (0,24 mm) e a orelha direita do grupo com 1 pmol de calcipotriol + OVA (0,23 mm) ($p < 0,0001$). A espessura da orelha direita do grupo com 1 pmol de calcipotriol (0,32 mm) não foi significativamente diferente em relação ao grupo com 4 pmoles de calcipotriol + OVA (0,30 mm; n.s).

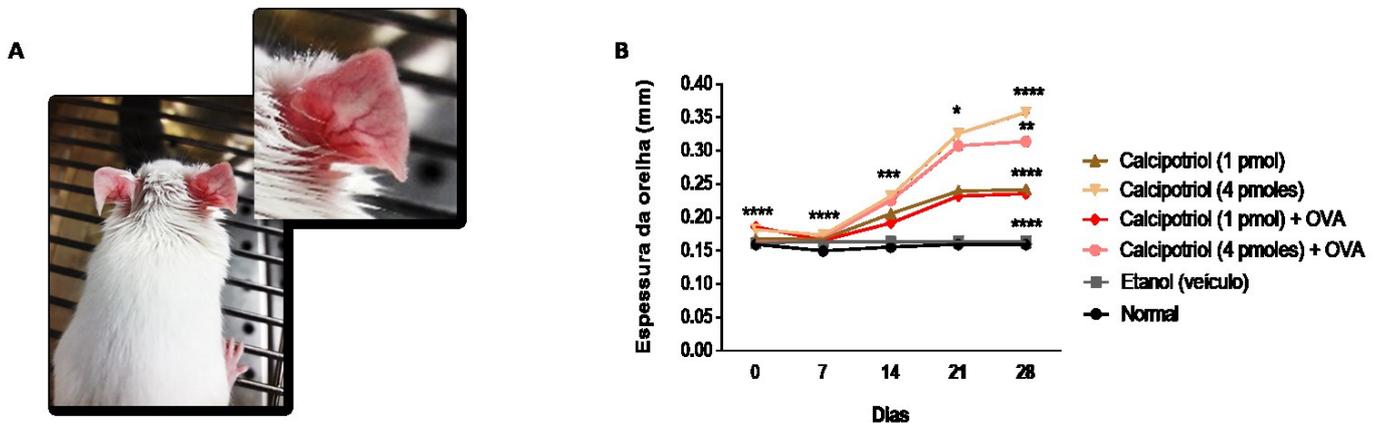


Figura 4. Análise clínica da DA em orelha induzida com 4 pmoles de calcipotriol. Lesão em orelha direita (A); espessura da orelha medida nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 em diferentes grupos (B). A análise estatística se refere a espessura da orelha direita do grupo com 4 pmoles de calcipotriol no dia 28 em comparação aos demais grupos e a diferença entre os dias 0, 7, 14, 21 em comparação ao dia 28. As diferenças inter-grupos e intragrupos foram analisadas por meio do teste ANOVA two-way com o pós-teste de Dunnett. Os valores de p foram considerados significativos quando $p < 0,05$ (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$).

Além disso, o grupo com 4 pmoles de calcipotriol também apresentou níveis séricos de IgE total (32,3 ng/ml), IgE total no sobrenadante do homogenato de orelha (13,6 ng/ml) e a citocina inflamatória IL-5 (48,3 pg/ml) significativamente maiores do que o grupo com 1

pmol de calcipotriol que apresentou níveis séricos de IgE total de 26 ng/ml ($p < 0,05$), IgE total de 4 ng/ml no homogenato de orelha ($p < 0,01$), 32,4 pg/ml de IL-5 ($p < 0,001$). Como esperado, os resultados do grupo com 4 pmoles em relação a estes parâmetros apresentaram maior significância quando comparados com o grupo normal sem indução de DA ($p < 0,0001$). Estes resultados do grupo com 4 pmoles de calcipotriol em relação ao grupo com 1 pmol de calcipotriol + OVA e grupo de 4 pmol de calcipotriol + OVA não apresentaram diferenças significativas (Figura 5A, 5B, 5C).

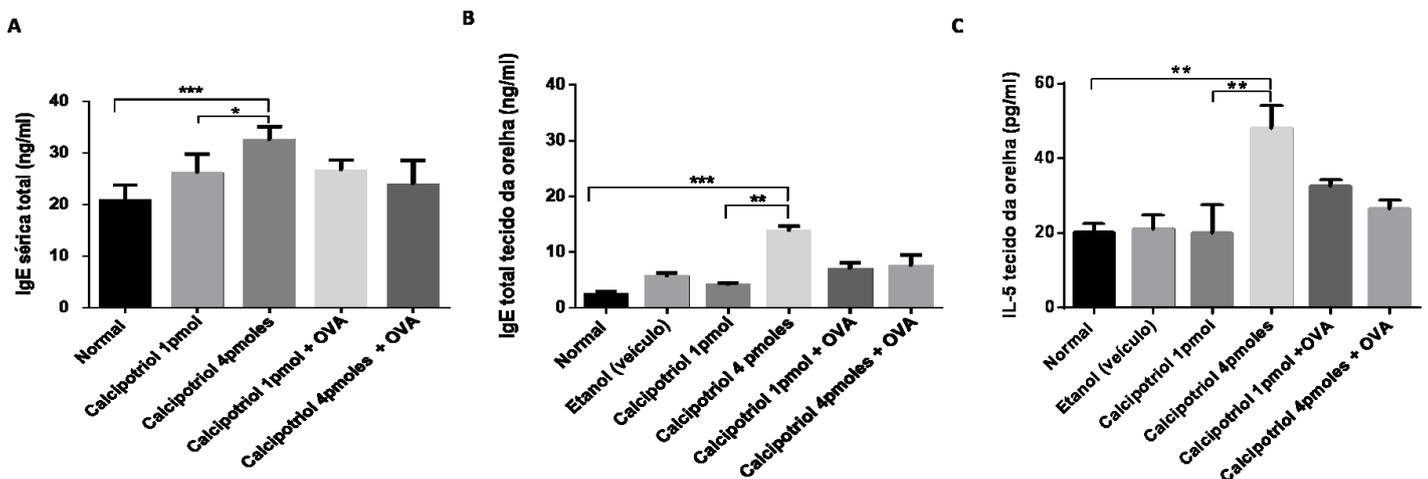
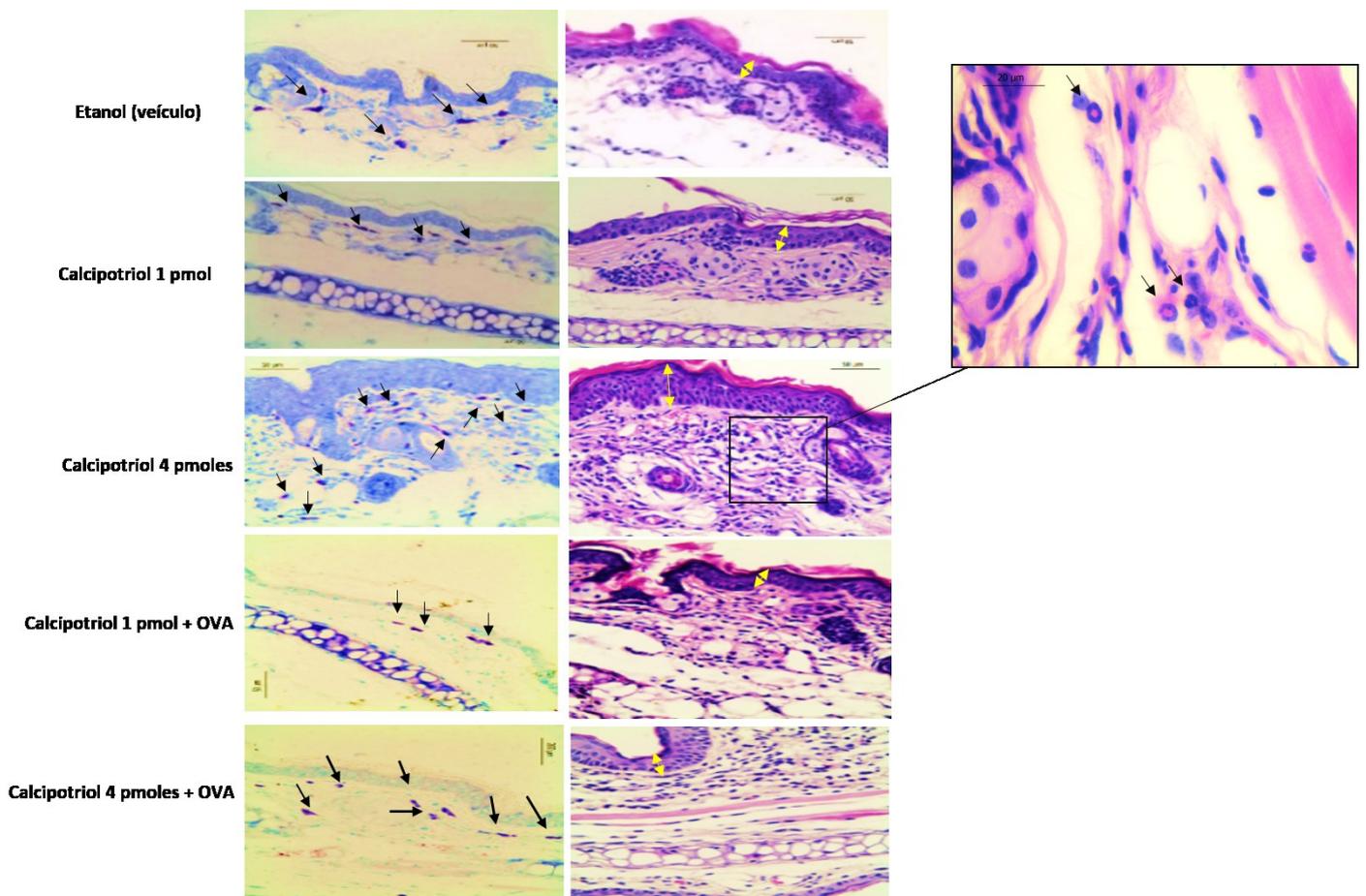


Figura 5. Níveis séricos e teciduais de anticorpo IgE total e citocina IL-5 tecidual em camundongos com lesões semelhantes à dermatite atópica (DA) induzida por calcipotriol em duas concentrações diferentes com ou sem OVA e em controles. Níveis de IgE sérica total (A); IgE total (B) e IL-5 (C) em sobrenadante de homogenato de tecido de orelha obtidos nos grupos de 1 pmol de calcipotriol, 4 pmol de calcipotriol, 1 pmol + OVA, 4 pmol + OVA, normal (não induzido) e etanol (somente veículo) são mostrados. As diferenças entre os grupos foram analisadas por meio do teste One-way ANOVA com pós-teste de Tukey e Kruskal-Wallis com o pós-teste de Dunn. Os valores de p foram considerados significativos quando $p < 0,05$ (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

5.2 Análise histopatológica das lesões semelhantes à DA induzidas por calcipotriol

Para confirmar esses dados, os cortes histopatológicos das orelhas direitas do grupo com 4 pmoles de calcipotriol corados com azul de toluidina apresentaram infiltração de mastócitos (setas pretas) em lesões de pele semelhantes à DA (Fig. 6A, painel lado esquerdo) e os cortes histopatológicos corados com Hematoxilina & Eosina mostraram uma hiperplasia epidérmica exacerbada e um grande infiltrado de células inflamatórias em comparação com outros grupos (Fig. 6A, painel lado direito). Além disso, notou-se um espessamento da

camada epidérmica (setas amarelas delimitando a camada) na seção histológica das lesões semelhantes à DA no grupo 4 pmoles de calcipotriol (Fig. 6A, painel lado direito 3º quadro) quando comparado a outros grupos, que evidencia uma camada estreita da epiderme. Como mostrado na figura 6B, houve uma maior diferença significativa no número de mastócitos por $0,025 \text{ mm}^2$ no de 4 pmoles (19-24 células) em relação aos outros grupos: 1 pmol (10-13 células), 1 pmol + OVA (8-12 células), 4 pmoles + OVA (15-17 células) e normal apenas com veículo etanol (9-12 células) ($p < 0,0001$).



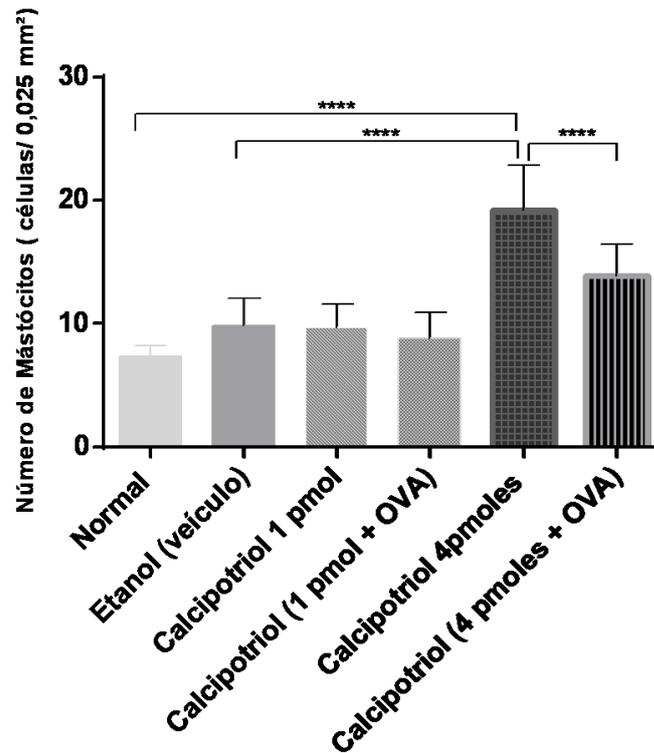


Figura 6. Análise histopatológica da orelha direita com lesões semelhantes à DA induzidas por diferentes concentrações de calcipotriol com ou sem OVA (ovalbumina) e orelha esquerda como grupo controle aplicado apenas etanol. **(A)** os mastócitos corados com azul de toluidina são indicados por setas pretas e a espessura da epiderme corada com H & E é mostrada por setas amarelas em cortes histológicos (ambos os painéis com amplificação de 100x) de lesões cutâneas de orelha tipo AD dos diferentes grupos. Os eosinófilos são mostrados apenas no grupo com 4 pmoles de calcipotriol com aumento de 400x. **(B)** Número de mastócitos nos diferentes grupos estudados. As diferenças entre os grupos foram analisadas por meio do teste ANOVA com pós-teste de Dunnett. Os valores de p foram considerados significativos quando $p < 0,05$ (**** $p < 0,0001$).

5.3 Efeito do tratamento tópico com a e-caderina recombinante

Na figura 7 é ilustrada lesão tipo DA induzida pela aplicação tópica de 4 pmoles/dia de calcipotriol no 36º. dia, cujas lesões foram tratadas somente com o veículo da pomada sem o componente ativo (Fig. 7A) ou tratadas com e-caderina recombinante de camundongo na concentração de 0,5 µg/ml (Fig. 7B), 1 µg/ml (Fig. 7C) ou 2 µg/ml (Fig. 7D). Como controles negativos, são ilustradas as orelhas que receberam apenas etanol (Fig. 7E) e a orelha normal (Fig. 7 F). Pode-se observar que as lesões da orelha tratada com e-caderina a 2 µg/ml (Fig. 7D) tiveram uma importante redução da inflamação local, hidratação visível e diminuição do edema das lesões em relação ao grupo tratado apenas com o veículo da pomada (Fig. 7A) ou

que receberam tratamentos com e-caderina em menores concentrações (Fig. 7B; Fig. 7C), assemelhando-se com a orelha que recebeu apenas o veículo (Fig. 7E).

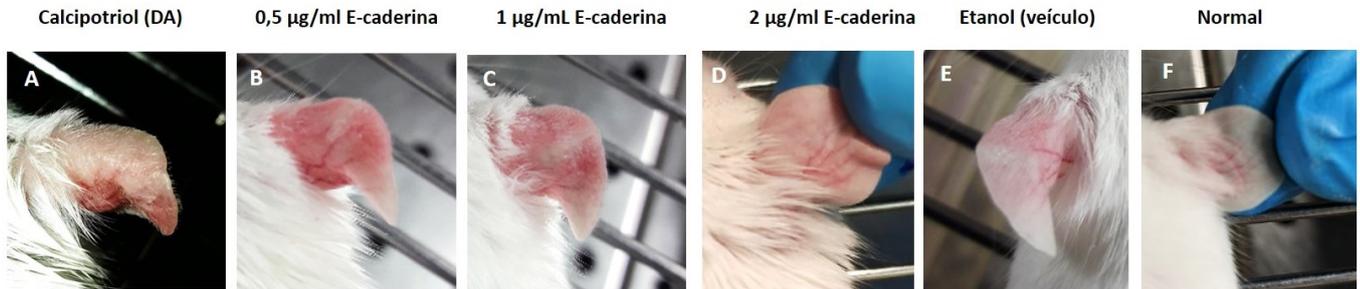


Figura 7. Imagens de orelhas com lesões tipo DA induzidas por calcipotriol no 36º. dia. Lesões tratadas com apenas o veículo da pomada (A) ou tratadas com e-caderina recombinante de camundongo na concentração de 0,5 µg/ml (B), 1 µg/ml (C) ou 2 µg/ml (D). Em (E) e (F) são ilustradas orelhas como controles negativos, orelha que recebeu apenas etanol (Fig. 7E) e orelha normal (Fig. 7F), respectivamente.

A espessura da orelha (mm) foi medida ao longo do estudo, uma vez por semana, nos grupos tratados com e-caderina (a partir do 21º. dia) e nos grupos controles, conforme ilustrada na Figura 8A. Podemos verificar que houve uma diminuição significativa na espessura da orelha no 36º. dia no grupo com lesões semelhantes à DA tratadas com 2 µg/ml de e-caderina (0,18 mm) em comparação com outros grupos que usaram 0,5 µg/ml (0,23 mm; $p < 0,05$), 1 µg/ml (0,24 mm; $p < 0,05$) de e-caderina ou ao grupo controle positivo que recebeu apenas a base do veículo (0,36 mm; $p < 0,0001$). A espessura (µm) da epiderme das orelhas foram medidas no 36º. dia nos grupos tratados com diferentes concentrações de e-caderina e em controles, como mostrado na Fig. 8B. Verificamos que a espessura da epiderme no grupo tratado com 2 µg/ml de e-caderina (19 µm) foi significativamente menor em comparação com o grupo que recebeu 0,5 µg/ml (39 µm; $p < 0,05$) de e-caderina, e principalmente em relação ao grupo controle positivo tratado sem o componente ativo (80,8 µm; $p < 0,0001$), mas sem diferença estatística em relação ao grupo que recebeu 1 µg/ml de e-caderina (24,8 µm; ns).

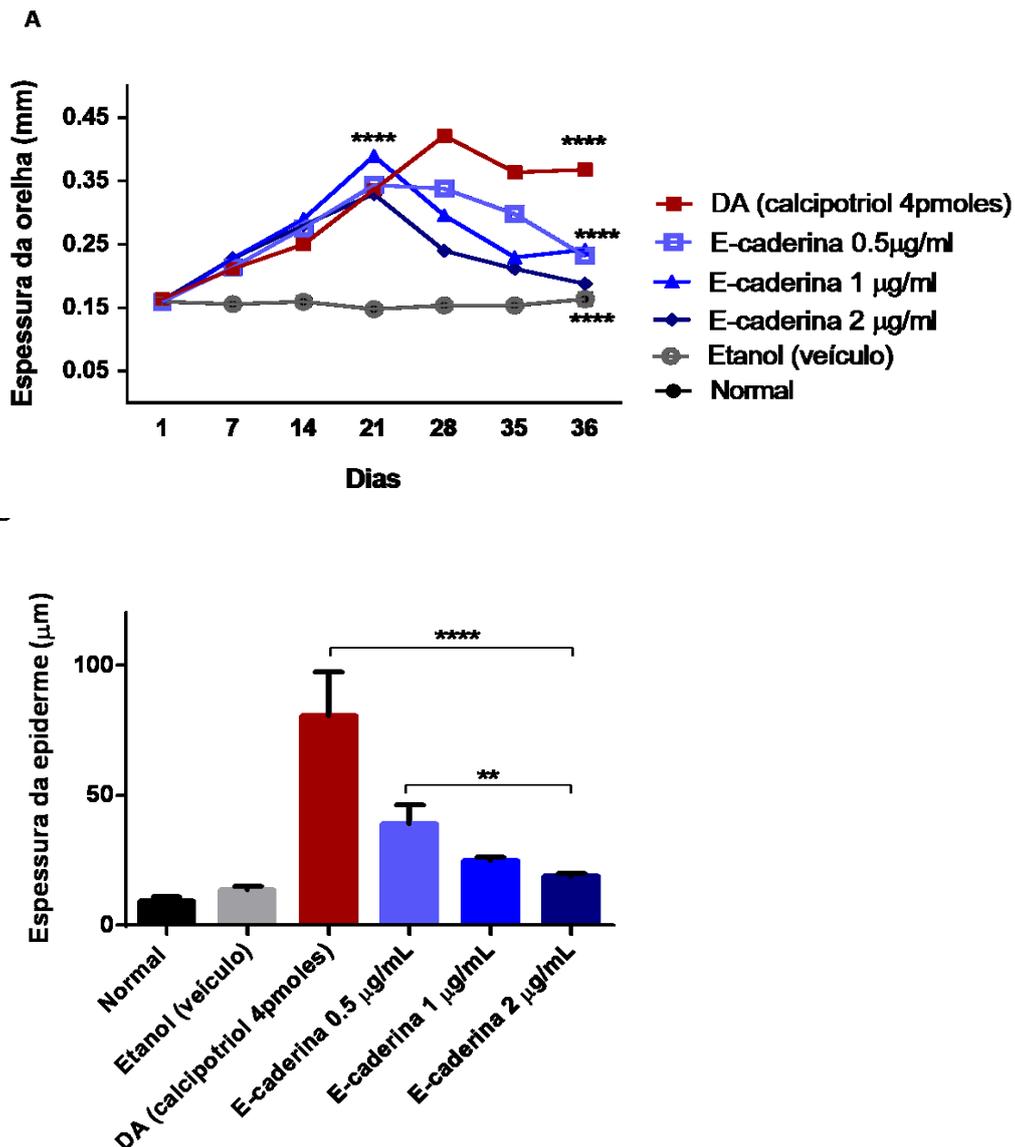


Figura 8. Espessura da orelha medida em milímetros com paquímetro digital nos dias 1, 7, 14, 21, 35 e 36 em diferentes grupos (A) e espessura da epiderme em micrômetros medida pelo programa *Image J* no 36º. dia nos grupos tratados com diferentes concentrações de e-caderina e controles (B) As diferenças entre os grupos foram analisadas por meio do teste ANOVA com pós-teste de Dunnett. Os valores de p foram considerados significativos quando $<0,05$ (**** $p < 0,0001$).

5.4 Parâmetros imunológicos das lesões semelhantes à DA tratadas com e-caderina recombinante tópica

Os níveis de IgE total no soro (sIgE) e IgE total (tIgE), TSLP (tTSLP) e IL-10 (tIL-10) no sobrenadante de homogenato de tecido de orelha são mostrados na Figura 9. Os níveis de sIgE (Fig. 9A) e tIgE (Fig. 9B) foram significativamente menores no grupo que recebeu 2

$\mu\text{g/ml}$ de e-caderina (sIgE: 11 ng/ml; tIgE: 8,8 ng / ml) em comparação com o grupo controle com lesões de DA que não receberam tratamento (sIgE: 16,6 ng/ml, $p < 0,001$; tIgE: 12,8 ng/ml, $p < 0,001$), mas sem diferença estatística em relação ao grupo que recebeu 0,5 $\mu\text{g/ml}$, exceto sIgE (14,5 ng/ml, $p < 0,05$). Não houveram diferenças significativas nos níveis de sIgE e tIgE entre os grupos que foram tratados com 1 $\mu\text{g/ml}$ ou 2 $\mu\text{g/ml}$ de e-caderina.

O nível de tTSLP (linfopoiatina estromal tímica tecidual) no sobrenadante de homogenato de tecido de orelha com DA (Fig. 9C) reduziu significativamente no grupo tratado com 2 $\mu\text{g/ml}$ de e-caderina (59,5 pg/ml) quando comparado com o grupo que recebeu 1 $\mu\text{g/ml}$ (137,3 pg/ml; $p < 0,01$) de e-caderina, ou grupo com as lesões de DA tratadas sem o componente ativo (183,6 pg / ml; $p < 0,0001$). Surpreendentemente, esses níveis de tTSLP não foram significativamente diferentes entre o grupo com DA que recebeu 2 $\mu\text{g/ml}$ de e-caderina e o grupo com DA que recebeu 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de e-caderina (109,6 pg/ml; n.s.). Por outro lado, os níveis de tIL-10 (Fig. 9D) no grupo tratado com 2 $\mu\text{g/ml}$ de e-caderina (124,5 pg/ml) não foram significativamente diferentes quando comparados com o grupo controle positivo (127,6 pg/ml; ns) ou o grupo tratado com 1 $\mu\text{g/ml}$ de e-caderina (102,8 pg/ml; ns), mas houve um aumento significativo em comparação ao grupo tratado com 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de e-caderina (77,9 pg/ml, $p < 0,01$) ou grupo normal sem lesão de DA (44,4 pg/ml, $p < 0,001$).

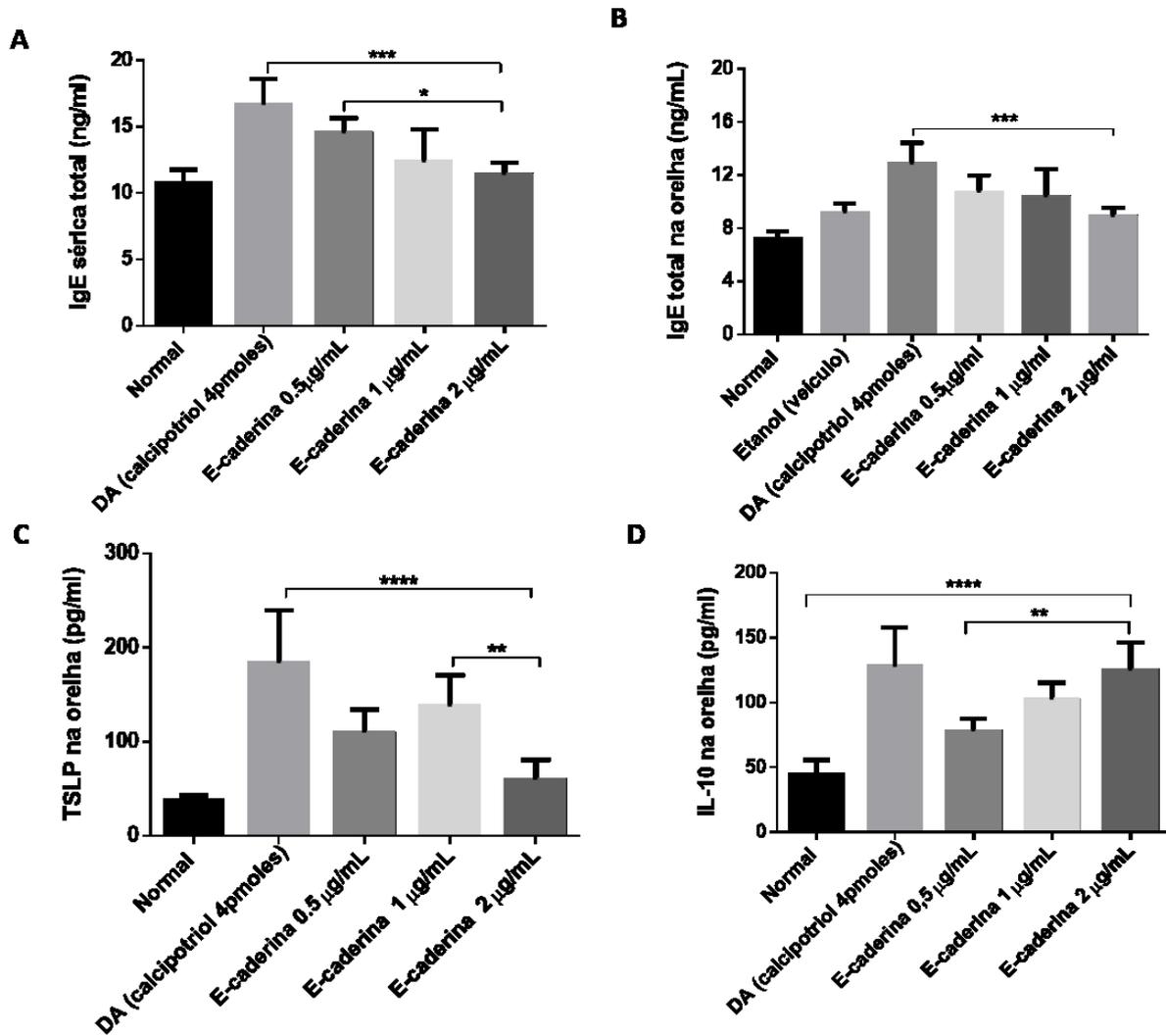


Figura 9. Níveis de IgE sérica total; IgE total, TSLP e IL-10 tecidual em camundongos com lesões semelhantes à DA em orelhas induzidas por calcipotriol no 36º. dia e tratadas com diferentes concentrações de e-cadherina e em grupos controles. São mostrados em (A) níveis séricos totais de IgE; (B) níveis de IgE total tecidual (tIgE); (C) níveis teciduais de TSLP; (D) níveis teciduais de IL-10. As diferenças entre os grupos foram analisadas por meio do teste ANOVA com pós-teste de Dunnett. Os valores de p foram considerados significativos quando $p < 0,05$ (** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$). ns = não significante.

5.5 Análise histopatológica das lesões tipo DA após tratamento tópico com e-cadherina recombinante

Os cortes histopatológicos de orelhas com DA ou controle negativo tratadas ou não com diferentes concentrações de e-cadherina foram corados com Hematoxilina & Eosina (Figuras. 10A, painel direito) ou azul de toluidina (Figuras. 10A, painel esquerdo aumento de 400x). O grupo tratado com 2 µg/ml mostrou redução na espessura da epiderme (Fig. 10A,

painel direito da linha 4 delimitada por setas amarelas) e no número de células inflamatórias locais, especialmente no número de mastócitos (Fig. 10A, no painel esquerdo da linha 4 com setas pretas) em comparação com os grupos que receberam os tratamentos de 0,5 µg/ml (Fig. 10A nos painéis da linha 2) ou 1 µg/ml (Fig. 10A, nos painéis da 3ª linha) de e-caderina, e principalmente em relação ao grupo com lesões de DA sem tratamento ativo (Fig. 10A, nos painéis da linha 1). Cortes histológicos da orelha do grupo normal (somente veículo, sem DA) sem tratamento com e-caderina são mostrados na Figura 10A, nos painéis da linha 5. Além disso, na Fig. 10B é mostrado o número de mastócitos por área de 0,025 mm² em lesões semelhantes à DA no dia 36 após receber tratamento com 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml de e-caderina ou sem tratamento ativo no grupo com lesões de DA e controle negativo (somente veículo) sem DA. O número de mastócitos/0,025 mm² no grupo tratado com 2 µg/ml de e-caderina foi significativamente menor que o grupo com lesões de DA sem tratamento ativo ($p < 0,01$), tratado com 0,5 µg/ml ($p < 0,05$) ou 1 µg/ml ($p < 0,05$) de e-caderina. Por outro lado, o número de mastócitos/0,025 mm² no grupo tratado com 2 µg/ml não foi significativamente diferente em comparação com a orelha normal (somente veículo) sem indução da DA.

O número de mastócitos/0,025 mm² no grupo tratado com 2 µg/ml de e-caderina foi significativamente menor que o grupo com lesões de DA sem tratamento ativo ($p < 0,01$), tratado com 0,5 µg/ml ($p < 0,05$) ou 1 µg/ml ($p < 0,05$) de e-caderina. Por outro lado, o número de mastócitos/0,025 mm² no grupo tratado com 2 µg/ml não foi significativamente diferente em comparação com a orelha normal (somente veículo) sem indução da DA.

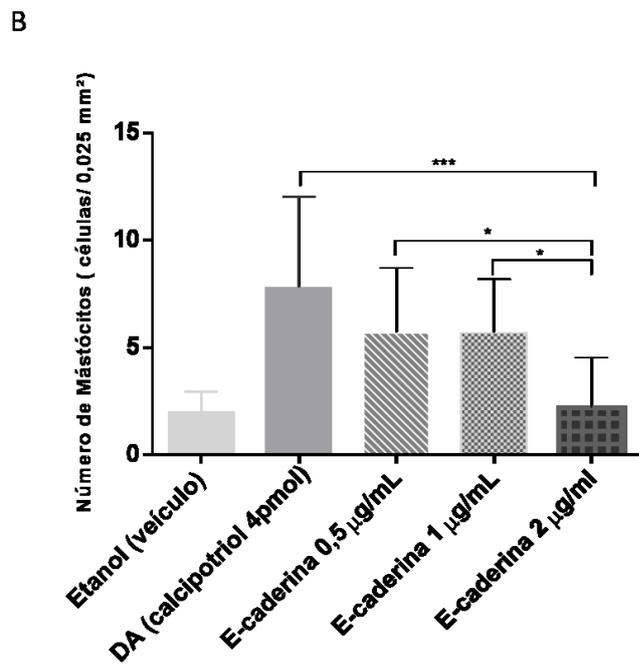
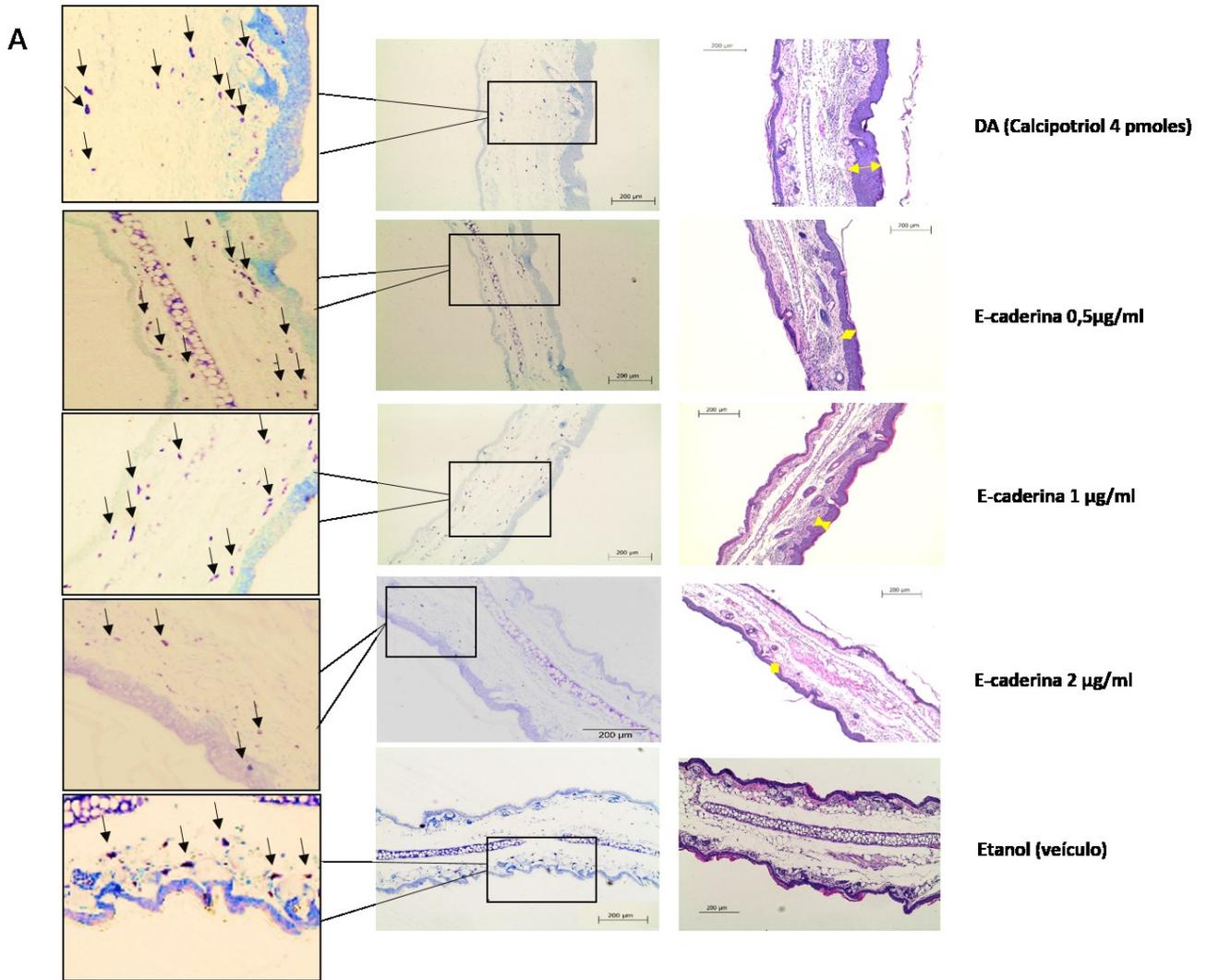


Figura 10. Análise histopatológica das lesões semelhantes à DA em orelhas tratadas ou não com e-caderina recombinante de camundongo em diferentes concentrações. **(A)** Espessura da epiderme é mostrada por setas amarelas nos painéis da direita coradas com Hematoxilina e Eosina com aumento de 40x, e mastócitos são indicados por setas pretas nos dois painéis à esquerda com aumento de 400x e 40x, corados com azul de toluidina; **(B)** Número de mastócitos em lesões de DA induzidas por calcipotriol e controle negativo (somente veículo, sem DA) e tratadas ou não com e-caderina na concentração de 0,5 µg/ml, 1 µg/ml ou 2 µg/ml. As diferenças entre os grupos foram analisadas por meio do teste ANOVA com pós-teste de Dunnett e os valores de p foram considerados significativos quando $p < 0,05$ (* $p < 0,05$ *** $p < 0,001$).

6 DISCUSSÃO

A dermatite atópica (DA) é uma doença cutânea inflamatória de caráter crônico não infecciosa com a presença de prurido intenso e grave, podendo ocorrer na infância desde o período de 1 a 6 meses de idade, prejudicando a qualidade de vida e particularmente levando a um grau variável de distúrbio psicológico em crianças mais velhas e adolescentes com DA grave (TSAKOK et al., 2019; LEUNG, 1995). Por essa razão, os modelos de camundongos para induzir lesões cutâneas semelhantes à DA já são bastante utilizados e importantes para melhor compreensão de sua imunopatogênese e também para avaliar a eficácia de novos agentes terapêuticos potenciais em estudos pré-clínicos.

O calcipotriol, um análogo da vitamina D, em alguns estudos é muito utilizado para indução de lesões semelhantes à DA em camundongos, causando lesões cutâneas inflamatórias e aumento de IgE local e sistêmica. Estes estudos sugerem que a indução da DA com calcipotriol há fundamento, pois em humanos a suplementação dessa vitamina na infância pode levar ao desenvolvimento de atopia na fase adulta (HYPPÖNEN et al., 2004).

Neste trabalho foi investigado se a OVA e o calcipotriol utilizados em associação poderiam potencializar (ação sinérgica) o efeito da indução de DA em camundongos em comparação com a indução provocada apenas com o uso de calcipotriol, mas foi observado que o seu uso concomitante não conseguiu aumentar as características clínicas, histopatológicas ou imunológicas nas lesões semelhantes à DA. Também, a OVA intraperitoneal e tópica não contribuiu para aumentar as respostas inflamatórias alérgicas, incluindo a produção de IgE total sérica ou tissular bem como as citocinas teciduais nas lesões tipo DA induzidas em orelhas de camundongos. Neste sentido, segundo Tordesillas et al (2014) a OVA não possui atividade intrínseca de protease, por isso não é capaz de induzir por si só uma lesão semelhante a DA.

Dessa forma, foi estabelecido que apenas a aplicação tópica de calcipotriol seria suficiente para induzir lesões semelhantes à DA, e que a concentração ótima foi a de 4 pmoles. Em estudo anterior foi descrito um protocolo de indução de DA em camundongos a longo prazo com aplicação tópica de calcipotriol na concentração de 2 nmoles e 4 nmoles (LI et al., 2006), porém essas doses em nossos experimentos foram consideradas muito altas, pois causaram efeitos tóxicos gravíssimos, levando à hipercalcemia, perda excessiva de peso e

atrofia muscular grave (caquexia) em camundongos, comprometendo profundamente a saúde sistêmica e provocando à morte em todos os animais em 5-7 dias. Além disso, nós testamos para padronização de indução outras doses de 40 pmoles, 4 pmoles e 1 pmoles por 20 μ l, sendo que a partir de 40 pmoles causou efeitos colaterais tóxicos e sistêmicos graves ou inaceitáveis.

Neste trabalho, a concentração de 4 pmoles de calcipotriol induziu a DA na orelha em camundongos, apresentando lesões com grande infiltrado inflamatório e aumento da concentração de IgE e TSLP no tecido da orelha, sem afetar a saúde sistêmica dos animais. Em concordância com os nossos resultados, em trabalhos anteriores, a indução de lesões cutâneas com calcipotriol aumentou a expressão de TSLP em queratinócitos epidérmicos e foi encontrado grande infiltrado inflamatório nas lesões (LI et al., 2006).

Alguns antígenos causam rompimento das junções aderentes interepiteliais e ativam células de langerhans e dentríticas (YOSHIDA et al., 2014), isto é observado na expressão de genes relacionados com a atividade dos queratinócitos e a infiltração de célula T, principalmente relacionadas a células Th2 que produzem as citocinas IL-4, IL-10 e IL-13 (KIM et al., 2016). A produção destas citocinas também regulam negativamente a expressão de genes essenciais da barreira epitelial: filagrina, involucrina e loricrina aumentando a permeabilidade da pele à alérgenos, haptenos e produtos químicos (MOOSBRUGGER-MARTINZ; SCHMUTH; DUBRAC, 2017).

A principal patogênese da doença é uma resposta predominante de perfil Th2, levando à produção de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13, as quais são participantes da desregulação do sistema imune (MOY et al., 2015).

Em experimentos realizados com camundongos para modelo semelhante às lesões de DA têm demonstrado que o calcipotriol é um bom indutor da doença. Todos esses modelos experimentais exibiram hiperplasia epidérmica com associação aumentada de infiltrado inflamatório e aumento de eosinófilos, além de apresentar níveis exacerbados de TSLP, IL-4, IL-5, IL-31, IL-10, IL-8, IFN- γ e TNF- β (MOOSBRUGGER-MARTINZ; SCHMUTH; DUBRAC, 2017).

Neste contexto, o modelo apresentado no presente estudo também exibiu as mesmas condições em relação às análises histopatológicas com infiltrado inflamatório, níveis aumentados de TSLP, IL-5 e IL-10, confirmando que realmente o modelo induzido com calcipotriol foi eficaz nas mesmas condições dos demais, porém diferindo na dose aplicada.

A produção de citocinas IL-4 e IL-13 e o aumento da expressão de TSLP nas lesões também estão relacionadas na ativação dos mastócitos (HORSMANHETMO et al., 1994; RUKWIED et al., 2000; NAGARKAR et al., 2012). Os dados deste presente trabalho confirmam o aumento de TSLP nas lesões induzidas com 4 pmoles de calcipotriol e um grande número de mastócitos, o que é visto nas lesões de pacientes no estado crônico.

A ligação do alérgeno ao anticorpo IgE induz a degranulação de mastócitos acompanhado da liberação de mediadores como histamina, heparina, serotonina, prostaglandinas, leucotrienos e fator ativador de plaquetas aumentando a vasodilatação e permeabilidade capilar local causando assim o processo inflamatório alérgico (KIM et al., 2016; MEKORI; METCALFE, 2005). O aumento de IgE total no soro e nas lesões induzidas com calcipotriol em camundongos também é observado em pacientes com DA. Porém, alguns pacientes com doença em fase crônica apresentam produção de autoalérgenos que são proteínas intracelulares expressas pelos queratinócitos, as quais são liberadas através do ato de coçar causando arranhões e dano tecidual. Com isso, anticorpos IgE é dirigida especificamente contra os queratinócitos, caracterizando a ocorrência de autorreatividade contra as proteínas epiteliais, aumentando assim a exposição alérgica e piorando o quadro clínico da doença (NAVARRETE-DECHENT et al., 2016).

Alguns estudos relataram o aumento de IgE sérica em modelos de DA em camundongos induzidos pelo calcipotriol (ELENTNER et al., 2009). Estes dados foram similares ao encontrado neste presente estudo utilizando 4 pmoles de calcipotriol, confirmando mais uma vez a importância deste composto para indução de lesões semelhantes à DA que ocorre em humanos.

A epiderme é a primeira barreira da pele em contato com o ambiente externo que possui várias camadas de epitélio estratificado, que tem como função a proteção contra microrganismos externos ou substâncias tóxicas, evitando a perda de água do organismo e expressando um conjunto de marcadores de diferenciação e junção celular (WATT, 2001). Entretanto, a pele com a DA tem disfunção na barreira epidérmica acompanhada de inflamação, perda de água transepidérmica (TWEL) e ativação de alarminas como IL-1 β , IL-25, IL-33 e TSLP (TSAKOK et al., 2019) como já visto anteriormente, que em conjunto induzem a inflamação e conseqüentemente reduzem a expressão de proteínas como a e-caderina que participa do processo de estratificação e junções interepiteliais nas camadas da epiderme (JENSEN et al., 1997).

A fim de amenizar os parâmetros clínicos e imunohistopatológicos das lesões semelhantes à DA induzidas por calcipotriol, apresentando disfunção da integridade epidérmica e desequilíbrio da resposta imune desviada para um perfil Th2, foi utilizado como tratamento neste estudo a e-caderina recombinante de camundongo. A e-caderina é expressa em todas as camadas celulares da epiderme e a sua função é crucial na manutenção da morfogênese e arquitetura tecidual ao participar da regulação das junções interepiteliais (TINKLE et al., 2008; JENSEN et al., 1997). Esta molécula tem sido essencial para a recuperação da resistência epidérmica, possuindo uma capacidade de retenção da barreira hídrica da epiderme funcional, evitando a perda desnecessária de água (TUNGGAL et al., 2005).

Neste estudo, a aplicação tópica de 2 µg/ml da e-caderina recombinante de camundongo durante 14 dias, foi eficaz na redução dos sinais clínicos da DA em modelo experimental como eritema, edema local, reduzindo a espessura da orelha e diminuindo os níveis elevados de IgE total sérica e tecidual. A importância da e-caderina tem sido visto por meio de estudos em camundongos neonatos, observando que a perda precoce da e-caderina endógena na epiderme causa morte dos neonatos através da perda de água transepidérmica (TWEL) (TUNGGAL et al., 2005; DE BENEDETTO et al., 2011a). Assim, além dos seus efeitos anti-inflamatórios, a e-caderina recombinante em forma de pomada pode contribuir visivelmente na hidratação da pele de camundongos com DA. Alguns estudos têm demonstrado que o uso de hidratantes nas lesões DA reduz também a expressão de TSLP (SANO et al., 2013), contudo neste estudo não foi observado a redução de TSLP tecidual em lesões tratadas somente com o veículo da pomada.

Em um contexto imunológico, a ativação das alarminas através da disfunção da barreira epitelial recruta células dentríticas da epiderme para ativação de resposta Th2 que promove a produção de anticorpos IgE através do switch de classe de anticorpo em células B (KLONOWSKA et al., 2018). Com isso, a disfunção da barreira causada pela indução da DA reduz a expressão da proteína de adesão e-caderina e fazem os queratinócitos e as ILC2 (células linfoides inatas do tipo 2) induzirem a produção de TSLP, que por sua vez estimula o desenvolvimento de células Th2 produtoras de IL-5 e IL-13. Estudos têm demonstrado que a presença da e-caderina suprime a ativação das ILCs2 através da ligação ao receptor de lectina tipo 1, amenizando a inflamação causada pelas lesões de DA (KIM, 2015; SAVINKO et al., 2012). A diminuição dos níveis de TSLP tecidual foi observado nas lesões tipo DA de camundongos tratados com 2 µg/ml de e-caderina, confirmando o efeito anti-inflamatório

nítido e importante desta molécula como monoterapia nas lesões com DA.

O tratamento com a e-caderina tópica aumentou os níveis de IL-10, o qual é uma citocina imunorregulatória responsável por equilibrar as respostas Th1/Th2, inibir a sobrevivência de eosinófilos e a síntese de IgE na DA (CHUNG, 2001). Em adição, a IL-10 pode atuar melhorando a viabilidade e proliferação das células B e a expressão de moléculas MHC de classe II, além de induzir o *switch* para a produção e secreção de anticorpos IgG bloqueadores (JEANNIN et al., 1998; LEE et al., 2012). Estes anticorpos IgG, em particular as da subclasse IgG4, serão importantes para impedirem que os anticorpos reagínicos IgE se liguem cruzadamente aos componentes alergênicos na superfície das células alvos, diminuindo dessa forma, a ativação mastocitária e, conseqüentemente, o processo inflamatório IgE-mediada (TAKETOMI et al., 2017).

O aumento de IL-10 também foi observado no grupo positivo para DA, sendo que em alguns estudos as lesões de DA apresentaram níveis de expressão aumentada do RNAm de IL-10, isso ocorre através do mecanismo de tolerância que previne a inflamação excessiva local (NOH; LEE, 1998; LEE et al., 2012). Além das células Treg e Th2, a IL-10 também pode ser produzida pelas células natural killer tipo 2 (NK2) e células B (células Breg), que suprimem a proliferação celular de linfócitos T CD4+ estimulados por alérgenos, promovendo a tolerância periférica (DENIZ; VAN DE VEEN; AKDIS, 2013).

A e-caderina empregada neste estudo foi de caráter exógeno, que demonstrou um efeito tópico eficaz no tratamento das lesões de DA experimental, por ser uma molécula de adesão e de sinalização celular, promove a regulação de respostas imunes inatas e adaptativas na epiderme, permite o transporte de citocinas e quimiocinas através do epitélio e pode ser amplamente expressa por ocorrência de antígenos apresentados pelas APCs. Por outro lado, alguns autores têm relatado que a e-caderina endógena está envolvida no contexto carcinogênico, pois em um ambiente com um tumor já pré-estabelecido, as próprias células tumorais irão induzir a expressão exacerbada desta molécula, sendo uma condição necessária para as células tumorais conseguirem formar metástase à distância e invadir órgãos e tecidos do organismo, permitindo a adesão com as células saudáveis (MENDONSA; NA; GUMBINER, 2018; RODRIGUEZ; LEWIS-TUFFIN; ANASTASIADIS, 2012)

Os efeitos adversos da e-caderina endógena são observados em pacientes com predisposição genética para o câncer ou que já possuem o câncer em seu organismo (KOURTIDIS et al., 2017), mas ainda não foi relatado nenhum estudo comprovando este

efeito em indivíduos saudáveis, isto é, até o presente momento, desconhece-se qualquer relato na literatura que a e-caderina exógena possa ter ação carcinogênica por si só. Este estudo foi pioneiro na utilização exógena da e-caderina recombinante de camundongo, na forma de pomada tópica, no tratamento de dermatite atópica experimental. Para confirmar o benefício da utilização da e-caderina no tratamento da DA, sugere-se incluir estudos adicionais envolvendo lesões de DA espontânea em cães e ensaios clínicos em seres humanos, mas por precaução, a sua utilização deve ser restrita a pacientes apresentando somente dermatite atópica, sem traços genéticos de câncer ou pacientes que apresentam concomitantemente DA e câncer.

7 CONCLUSÃO

Em conjunto, podemos concluir que o tratamento de lesões semelhantes à DA provocado pela aplicação tópica contínua de calcipotriol com e-caderina recombinante de camundongo mostrou um importante efeito anti-inflamatório, melhorando os parâmetros clínicos e laboratoriais. Este é o primeiro estudo pré-clínico utilizando a e-caderina de forma exógena no tratamento da dermatite atópica, podendo ser uma estratégia terapêutica prioritária no futuro para melhorar a qualidade de vida dos pacientes com DA por ser um componente biológico natural. Com isto, objetiva-se reduzir o uso de corticosteroides e/ou inibidores de calcineurina tópicos e, possivelmente, a e-caderina possa ser um agente poupador da administração de corticosteroides e/ou imunossupressores sistêmicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUABARA, K. et al. The prevalence of atopic dermatitis beyond childhood: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 3, p. 696-704, 2018. <https://doi.org/10.1111/all.13320>
- AMARAL, C. S. F. do; MARCH, M. de F. B. P.; SANT'ANNA, C. C. Quality of life in children and teenagers with atopic dermatitis. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 5, p. 717-723, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962012000500008>
- BIAGIONI, B. et al. Migrants and allergy: a new view of the atopic march. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*, v. 51, p. 100-114, 2019. <https://doi.org/10.23822/EurAnnACI.1764-1489.96>
- BIEDERMANN, T. et al. Regulation of T cell immunity in atopic dermatitis by microbes: The Yin and Yang of cutaneous inflammation. *Frontiers in Immunology*, v. 6, p. 353, 2015. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00353>
- BIKLE, D. D. Vitamin D metabolism and function in the skin. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.347,p.80-89,2011. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.05.017>
- BRUNNER, P. M.; LEUNG, D. Y. M.; GUTTMAN-YASSKY, E. Immunologic, microbial, and epithelial interactions in atopic dermatitis. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, v.120, p.34-41, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2017.09.055>
- BUSSEMAKERS, M. J. et al. Molecular cloning and characterization of the human E-cadherin cDNA. *Molecular biology reports*, v. 17, n. 2, p. 123-128, fev. 1993. <https://doi.org/10.1007/BF00996219>
- CEPELAK, I;DODIG, S;PAVIC, I. Filaggrin and atopic march. *Biochemia Medica*, v. 29, p.1-14, 2019. <https://doi.org/10.11613/BM.2019.030501>
- CHAO, Y. L.; SHEPARD, C. R.; WELLS, A. Breast carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition. *Molecular Cancer*, v. 9, p.179, 2010. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-179>
- CHOI, J. K. et al. Chrysin attenuates atopic dermatitis by suppressing inflammation of keratinocytes. *Food and Chemical Toxicology*, v. 110, p. 142-150, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.10.025>
- CHUNG, F. Anti-inflammatory cytokines in asthma and allergy: Interleukin-10, interleukin-12, interferon- γ . *Mediators of Inflammation*, v. 10, p. 51-59, 2001. <https://doi.org/10.1080/09629350120054518>
- CURY MARTINS, J. et al. Topical tacrolimus for atopic dermatitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, v. 7, p. 1-114, 2015. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009864.pub2>
- DAHER, S. et al. Diagnóstico em Doenças Alérgicas Mediadas por IgE. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia*, v. 32, p. 3-8, 2009.

DE BENEDETTO, A. et al. Tight Junction Defects in Atopic Dermatitis. **Journal Allergy of Clinical and Immunology**, v.127, p.773-786, 2011a. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.12.545>

DE BENEDETTO, A. et al. Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 127, p. 773-786, 2011b. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.12.545>

DENIZ, G.; VAN DE VEEN, W.; AKDIS, M. Natural killer cells in patients with allergic diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, p. 527-535, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.07.030>

EICHENFIELD, L. F. et al. Guidelines of care for the management of atopic dermatitis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 70, p. 338-351, 2014.

ELENTNER, A. et al. Langerhans cells are critical in the development of atopic dermatitis-like inflammation and symptoms in mice. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.13, p.2658-2672, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00797.x>

EYERICH, K.; EYERICH, S. Immune response patterns in non-communicable inflammatory skin diseases. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 32, p. 692-703, 2018. <https://doi.org/10.1111/jdv.14673>

FERNANDES, S. de S. C. et al. Epidemiological trends of allergic diseases in adolescents. **Journal Braziliense Pneumology**, v. 43, p. 368-372, 2017. <https://doi.org/10.1590/s1806-37562016000000255>

FLICKER, S.; VALENTA, R. Renaissance of the Blocking Antibody Concept in Type I Allergy. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 132, n. 1, p. 13-24, 2003. <https://doi.org/10.1159/000073260>

FURUE, M; ULZII, D; VU, Y, H; TSUJI, G; KIDO-NAKAHARA, M; NAKAHARA, T. Pathogenesis of Atopic Dermatitis: Current Paradigm. **Iranian Journal of Immunology**, v. 16, p. 97-107, 2019.

GUTTMAN-YASSKY, E.; KRUEGER, J. G.; LEBWOHL, M. G. Systemic immune mechanisms in atopic dermatitis and psoriasis with implications for treatment. **Experimental Dermatology**, v. 27, p. 409-417, 2018. <https://doi.org/10.1111/exd.13336>

GLOBAL OF ATLAS ALLERGY, (Haward) **European Academy of Allergy and clinical Immunology**, 2014.

HAJAR, T.; GONTIJO, J. R. V.; HANIFIN, J. M. New and developing therapies for atopic dermatitis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 93, p. 104-107, 2018. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20187682>

HAN, H.; ROAN, F.; ZIEGLER, S. F. The atopic march: current insights into skin barrier dysfunction and epithelial cell-derived cytokines. **Immunological Reviews**, v. 278, p. 116-130, 2017. <https://doi.org/10.1111/imr.12546>

HASHIMOTO, Y. et al. Scratching of their skin by NC/Nga mice leads to development of dermatitis. **Life Sciences**, v. 76, n. 7, p. 783-794, 31 dez. 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.07.022>

HORSMANHETMO, L. et al. Mast cells are one major source of interleukin-4 in atopic dermatitis. **British Journal of Dermatology**, v. 131, p. 348-353, 1994. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1994.tb08522.x>

HYPPÖNEN, E. et al. Infant vitamin D supplementation and allergic conditions in adulthood: Northern Finland birth cohort 1966. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1037, p.84-95, 2004. <https://doi.org/10.1196/annals.1337.013>

JEANNIN, P. et al. IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. **Journal of immunology**, v. 160, p. 3555-3561, 1998.

JENSEN, P. J. et al. E-cadherin and P-cadherin have partially redundant roles in human epidermal stratification. **Cell and Tissue Research**, v. 288, p. 307-316, 1997. <https://doi.org/10.1007/s004410050816>

JIN, M.; YOON, J. From Bench to Clinic: the Potential of Therapeutic Targeting of the IL-22 Signaling Pathway in Atopic Dermatitis. **Immune Network**, v. 18, p. 1-11, 2018. <https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e42>

JOHNSON, B. B. et al. Treatment resistant atopic dermatitis: challenges and solutions. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 12, p. 181-192, 2019. <https://doi.org/10.2147/CCID.S163814>

KALLINICH, T. et al. T-cell co-stimulatory molecules: Their role in allergic immune reactions. **European Respiratory Journal**, v. 29, p. 1246-1255, 2007. <https://doi.org/10.1183/09031936.00094306>

KAY, A. B. Allergy and Allergic Diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 344, p. 30-37, 2002. <https://doi.org/10.1056/NEJM200101043440106>

KEMENY, D. M. et al. The subclass of IgG antibody in allergic disease: II. The IgG subclass of antibodies produced following natural exposure to dust mite and grass pollen in atopic and non-atopic individuals. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 19, p. 545-549, 1989. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.1989.tb02431.x>

KIM, B. S. Innate Lymphoid Cells in the Skin. **The Journal of investigative dermatology**, v.135, p.673-678, 2015. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.401>

KIM, J. E. et al. Molecular mechanisms of cutaneous inflammatory disorder: Atopic dermatitis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 1-30, 2016. <https://doi.org/10.3390/ijms17081234>

KLONOWSKA, J. et al. New cytokines in the pathogenesis of atopic dermatitis-New therapeutic targets. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, p. 1-12, 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19103086>

KOURTIDIS, A. et al. A central role for cadherin signaling in cancer. **Experimental Cell Research**, v.358, p.78-85, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.04.006>

LABERGE, S. et al. Association of increased CD4+ T-cell infiltration with increased IL-16 gene expression in atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.102, p.645-650, 2005. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(98\)70282-9](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(98)70282-9)

LARCHÉ, M.; AKDIS, C. A.; VALENTA, R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, p. 761-771, 2006. <https://doi.org/10.1038/nri1934>

LEE, J. et al. Atopic Dermatitis and Cytokines: Recent Patents in Immunoregulatory and Therapeutic Implications of Cytokines in Atopic Dermatitis - Part I: Cytokines in Atopic Dermatitis. **Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery**, v. 6, p. 222-247, 2012. <https://doi.org/10.2174/187221312802652820>

LEUNG, D. Y. M.; BIEBER, T. Atopic dermatitis. **The Lancet**, v. 361, n. 9352, p. 151-160, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12193-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12193-9)

LEUNG, D. Y. M. Atopic dermatitis: The skin as a window into the pathogenesis of chronic allergic diseases. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 96, p. 302-318, 1995. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(95\)70049-8](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(95)70049-8)

LEUNG, D. Y. M. et al. New insights into atopic dermatitis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, p. 651-657, 2004. <https://doi.org/10.1172/JCI200421060>

LEUNG, D. Y. M. Atopic dermatitis: The skin as a window into the pathogenesis of chronic allergic diseases. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 96, p. 302-318, 1995. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(95\)70049-8](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(95)70049-8)

LI, M. et al. Topical vitamin D3 and low-calcemic analogs induce thymic stromal lymphopoietin in mouse keratinocytes and trigger an atopic dermatitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 11736-11741, 2006. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604575103>

LIMA, H. C. Fatos e mitos sobre imunomoduladores. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, p. 207-221, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962007000300002>

MARETZKY, T. et al. ADAM10-mediated E-cadherin release is regulated by proinflammatory cytokines and modulates keratinocyte cohesion in eczematous dermatitis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, p. 1737-1746, 2008. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5701242>

MARTEL, B. C. et al. Translational animal models of atopic dermatitis for preclinical studies. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 90, p. 389-402, 2017.

MEKORI, Y. A.; METCALFE, D. D. Mast cell-T cell interactions. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 104, p. 517-523, 2005. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(99\)70316-7](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(99)70316-7)

MENDONSA, A. M.; NA, T. Y.; GUMBINER, B. M. E-cadherin in contact inhibition and cancer. **Oncogene**, v. 37, p. 4769-4780, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0304-2>

MESQUITA, K. de C.; IGREJA, A. C. de S. M.; COSTA, I. M. C. Atopic dermatitis and vitamin D: facts and controversies. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 88, p. 945-953, 2013. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20132660>

MOOSBRUGGER-MARTINZ, V.; SCHMUTH, M.; DUBRAC, S. A mouse model for

atopic dermatitis using topical application of vitamin D3 or of its analog MC903. **Methods in Molecular Biology**, v. 1559, p. 91-106, 2017. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6786-5_8

MOY, A. P. et al. Immunologic Overlap of Helper T-Cell Subtypes 17 and 22 in Erythrodermic Psoriasis and Atopic Dermatitis. **JAMA Dermatology**, v. 151, p. 753-760, 2015. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2015.2>

NAGARKAR, D. R. et al. Airway epithelial cells activate TH2 cytokine production in mast cells through IL-1 and thymic stromal lymphopoietin. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.130, p.225-232, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.04.019>

NAKAI, K. et al. Reduced expression of epidermal growth factor receptor, E-cadherin, and occludin in the skin of flaky tail mice is due to filaggrin and loricrin deficiencies. **American Journal of Pathology**, v. 181, p. 969-977, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.06.005>

NAVARRETE-DECHENT, C. et al. Humoral and Cellular Autoreactivity to Epidermal Proteins in Atopic Dermatitis. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v.64, p.435-442, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00005-016-0400-3>

NOH, G. W.; LEE, K. Y. Blood eosinophils and serum IgE as predictors for prognosis of interferon-gamma therapy in atopic dermatitis. Allergy: **European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 53, p. 1202-1207, 1998. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1998.tb03842.x>

NOMURA, I. et al. Cytokine Milieu of Atopic Dermatitis, as Compared to Psoriasis, Skin Prevents Induction of Innate Immune Response Genes. **The Journal of Immunology**, v. 171, p.3262-3269, 2003. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.6.3262>

O'REGAN, G. M. et al. Filaggrin in atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.122, p.689-693, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.08.002>

ONG, P. Y. et al. Endogenous Antimicrobial Peptides and Skin Infections in Atopic Dermatitis. **New England Journal of Medicine**, v. 347, p. 1151-1160, 2002. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021481>

ONO, S. J. et al. Chemokines: Roles in leukocyte development, trafficking, and effector function. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, p. 1185-1199, 2003. <https://doi.org/10.1067/mai.2003.1594>

RENERT-YUVAL, Y.; GUTTMAN-YASSKY, E. What's New in Atopic Dermatitis. **Dermatologic Clinics**, v.37 ,p.205-213, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.det.2018.12.007>

ROEDIGER, B. et al. Cutaneous immunosurveillance and regulation of inflammation by group 2 innate lymphoid cells. **Nature Immunology**, v. 14, p. 564-573, 2013. <https://doi.org/10.1038/ni.2584>

RÖTZER V, MELEGA F, GARREIS F, PAULSEN F, W. J. E-Cadherin Is Important for Meibomian Gland Function as Revealed by a New Human ex Vivo Slice Culture Model. **The American Journal of Pathology**, v. 19, p. 30110-30105, 2019.

RUKWIED, R. et al. Mast cell mediators other than histamine induce pruritus in atopic

dermatitis patients: A dermal microdialysis study. **British Journal of Dermatology**, v. 142, p.114-1120, 2000.<https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2000.03535.x>

RUZICKA, T. et al. Anti-Interleukin-31 Receptor A Antibody for Atopic Dermatitis. **New England Journal of Medicine** v.376, p.826-835, 2017. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1606490>

SABAT, R. et al. T cell pathology in skin inflammation. **Seminars in Immunopathology**, v.41, p. 359-377, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00281-019-00742-7>

SALOCA, J. et al. Increased airways responsiveness in mice depends on local challenge with antigen. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 49, p. 65-70, 1994.<https://doi.org/10.1164/ajrccm.149.1.8111600>

SANO, Y. et al. Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in the horny layer of patients with atopic dermatitis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 171, p. 330-337, 2013.<https://doi.org/10.1111/cei.12021>

SAVINKO, T. et al. IL-33 and ST2 in atopic dermatitis: Expression profiles and modulation by triggering factors. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, p. 1392-1400, 2012.<https://doi.org/10.1038/jid.2011.446>

SEGAERT, S. et al. Optimizing Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Effects of Corticosteroid and Vitamin D Analogue Fixed-Dose Combination Therapy. **Dermatology and Therapy**, v.7,p.265-279, 2017. <https://doi.org/10.1007/s13555-017-0196-z>

SIMON, D. et al. Inflammatory cell numbers and cytokine expression in atopic dermatitis after topical pimecrolimus treatment. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 60, p.944-951, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2005.00798.x>

SIMPSON, E. L. et al. Two Phase 3 Trials of Dupilumab versus Placebo in Atopic Dermatitis. **New England Journal of Medicine**, v. 375, p. 2335-2348, 2016.

SPINDLER, V.; WASCHKE, J. Pemphigus-A disease of desmosome dysfunction caused by multiple mechanism. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 136, 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00136>

TAKETOMI, E. A. et al. Allergen-Specific Immunotherapy Follow-Up by Measuring Allergen-Specific IgG as an Objective Parameter. **In: Immunotherapy - Myths, Reality, Ideas, Future. METHODIEV**, ed. [s.l.] InTech, 2017. p. 382-401. <https://doi.org/10.5772/66711>

TAN, L. et al. Epicutaneous sensitization with ovalbumin, staphylococcal enterotoxin B and Vitamin D analogue induces atopic dermatitis in mice. **Journal of Central South University (Medical Sciences)**, v. 42, p. 1023-1029, 2017.

TINKLE, C. L. et al. New insights into cadherin function in epidermal sheet formation and maintenance of tissue integrity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, p.15405-15410, 2008. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807374105>

TSAKOK, T. et al. Atopic dermatitis: the skin barrier and beyond. **British Journal of**

Dermatology, v.180, p.464-474,2019. <https://doi.org/10.1111/bjd.16934>

TUNGGAL, J. A. et al. E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions. **EMBO Journal**, v. 24, p. 1146-1156, 2005. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600605>

WALLACH, D. Atopic Dermatitis, The Skin-Disease. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 31, p. 1397-1398, 2017. <https://doi.org/10.1111/jdv.14487>

WATT, F. M. Stem cell fate and patterning in mammalian epidermis. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 11, p. 410-417, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(00\)00211-2](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(00)00211-2)

WON, C. H. et al. A multicenter trial of the efficacy and safety of 0.03% tacrolimus ointment for atopic dermatitis in Korea. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 15, n. 30-34, 2004. <https://doi.org/10.1080/09546630310020812>

YOSHIDA, K. et al. Distinct behavior of human Langerhans cells and inflammatory dendritic epidermal cells at tight junctions in patients with atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 134, p. 856-864, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.08.001>