



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**Instituto de Ciências Biomédicas**

**Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas**

**15-Deoxi- $\Delta$ 12,14-prostaglandina J2 (15d-PGJ2) reduz a produção de IL-8 induzida por alérgenos do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* em linhagem de queratinócitos humanos**

**Hellen Dayane Silva Borges**

**Uberlândia**

**2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**Instituto de Ciências Biomédicas**

**Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas**

**15-Deoxi- $\Delta$ 12,14-prostaglandina J2 (15d-PGJ2) reduz a produção de IL-8 induzida por alérgenos do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* em linhagem de queratinócitos humanos**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como parte da obtenção do título de mestre.

**Hellen Dayane Silva Borges**

**Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior**

**(Orientador)**

**Uberlândia**

**2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

B732q  
2017

Borges, Hellen Dayane Silva, 1992  
15-Deoxi- $\Delta$ 12,14-prostaglandina J2 (15d-PGJ2) reduz a produção de IL-8 induzida por alérgenos do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* em linhagem de queratinócitos humanos / Hellen Dayane Silva Borges. - 2017.

67 p. : il.

Orientador: Jair Pereira da Cunha Júnior.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.  
Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. *Dermatophagoides pteronyssinus* - Teses.  
3. Pele - Inflamação - Teses. 4. - Teses. I. Cunha Júnior, Jair Pereira da,  
1974. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-  
Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

---

CDU: 612.017



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



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Hellen Dayane Silva Borges**

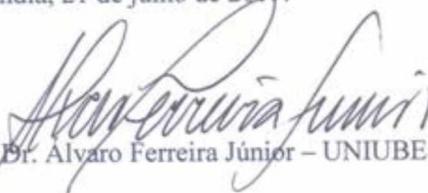
“15-Deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandina J2 (15d-PGJ2) reduz a produção de IL-8 induzida por alérgenos do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* em linhagem de queratinócitos humanos”

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, 21 de julho de 2017.

  
Prof. Dr. Alvaro Ferreira Júnior – UNIUBE

  
Prof.ª. Dra. Celene Maria de O. Simões Alves – ICBIM/UFU

  
Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Junior (orientador) – ICBIM/UFU

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar, mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”*

*Madre Teresa de Calcutá*

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”*

*José de Alencar*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a Deus por ter me proporcionado saúde, inteligência, muita força e perseverança que foram fundamentais para a conclusão desta etapa.

Aos meus pais José Dilson e Maria da Glória e minha irmã Hanna Kárita (*in memoriam*), que estiveram sempre ao meu lado, me incentivando e apoiando nas minhas decisões. Pessoas estas que me ensinaram a lutar e realizar meus sonhos e, acima de tudo, que soubesse conquistá-los com humildade.

Ao Prof. Jair e o Prof. Ernesto pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica e, pelos ensinamentos que vou carregar para sempre na minha carreira científica e, principalmente, pela confiança em mim depositada.

A Ana Cláudia pelas valiosas contribuições não somente para este trabalho, mas pela amizade que construímos ao longo desses anos, pelo carinho, paciência, disposição, pelo conhecimento a mim transmitido e pelo tempo despendido para me ajudar.

A todos os companheiros de laboratório Alfredo, Bianca, Greice, Karine, Isabela, Juliana e Vinicius que foram fundamentais durante esses anos de convívio, pelas boas risadas que tornaram os dias de trabalho mais leves, por toda a ajuda e pelo conhecimento compartilhado. Agradeço em especial à Bianca, pela amizade que, com certeza, levarei por toda vida, por me receber com tanto carinho e pela paciência em me ensinar a rotina do laboratório, me proporcionando não somente conhecimento de bancada, mas também por ser exemplo de força de vontade e dedicação, e a Karine, pela grande amizade que construímos, pelo companheirismo e parceria que vão além do ambiente de trabalho, por todos os momentos que vivemos juntas, pelo carinho em ouvir, pela preocupação e dedicação em me ajudar sempre, por todas as palavras de incentivo que contribuíram bastante para que eu chegasse ao fim dessa etapa.

Aos funcionários do laboratório Zilda e Max e da secretaria da Pós-graduação Luceleide e Lucélia que auxiliaram na viabilização deste trabalho.

Ao meu namorado, Leonardo, pelo carinho, companheirismo, compreensão, paciência e pela preocupação em estar ao meu lado, me fazer sorrir e por conseguir me tirar de casa nos momentos que mais precisei “refrescar as ideias”.

A Lidiane, pelos longos anos de amizade, por ser minha segunda irmã, pela disponibilidade de sempre me ouvir e pelos sábios conselhos e pelo incentivo durante todos os nossos anos de amizade.

Aos meus familiares e os meus amigos do EJC, em especial Tiago, que souberam compreender meus momentos de ausência. Agradeço pelas orações, pelas conversas nos momentos de dificuldade e pelos momentos maravilhosos que passamos juntos.

Ao apoio financeiro das instituições FAPEMIG, CAPES e CNPq.

## RESUMO

A dermatite atópica (DA) é uma doença inflamatória crônica da pele com alta incidência a nível mundial. A patogênese da DA é complexa, envolve interações entre susceptibilidade genética, alterações da barreira da pele, fatores imunológicos e ambientais, especialmente a exposição ao ácaro da poeira doméstica, como *Dermatophagoides pteronyssimus* (Dpt). Os queratinócitos participam da imunorregulação da DA, através da secreção de citocinas e quimiocinas e expressão de receptores envolvidos em reações inflamatórias. A pele humana expressa os três tipos de receptores PPAR (PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  e PPAR $\gamma$ ). Os agonistas PPAR apresentam propriedades anti-inflamatórias, pois reduzem a expressão de várias citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão celular. A prostaglandina ciclopentenona 15-desoxi D 12, 14-PGJ 2 (15d-PGJ 2), um ligante de receptor intranuclear de peroxissoma ativado por proliferador endógeno (PPAR $\gamma$ ) já tem mostrado efeitos anti-inflamatórios em diferentes linhagens celulares. Por isso, o objetivo desse estudo foi avaliar a capacidade imunomoduladora de 15d-PGJ2 na produção de citocinas inflamatórias mediadas pelo extrato de Dpt em linhagem de queratinócitos humanos (células HaCat). O tratamento com Dpt ou Dpt ativado por ditionotreitól - DTT (aDpt) induziu a produção de IL-8 de uma maneira dependente da dose, sendo aDpt indutor mais potente da IL-8. O pré-tratamento com 15d-PGJ2 mostrou uma redução significativa dos níveis de IL-8 e IL-6 induzidos por aDpt. Concluímos que o pré-tratamento com 15d-PGJ2 promove a regulação negativa da produção de IL-8 e IL-6 induzida por aDpt em células HaCat, permitindo uma posterior utilização no desenvolvimento de novas terapias para a doença.

**PALAVRAS-CHAVE:** dermatite atópica, 15d-PGJ2, queratinócitos, *Dermatophagoides pteronyssimus* e produção de IL-8.

## ABSTRACT

Atopic dermatitis (AD) is a chronic inflammatory skin disease with a high incidence worldwide. The pathogenesis of AD is complex, involving interactions between genetic susceptibility, changes in the skin barrier, immunological and environmental factors, especially exposure to the domestic dust mite such as *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt). Keratinocytes participate in the immunoregulation of AD, through secretion of cytokines, chemokines and expression of receptors involved in inflammatory reactions. The human skin expresses the three types of PPAR receptors (PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  and PPAR $\gamma$ .) PPAR agonists have anti-inflammatory properties because they reduce the expression of various proinflammatory cytokines, chemokines and cell adhesion molecules. Cyclopentenone 15-deoxy D 12, 14-PGJ 2 (15d-PGJ 2), an endogenous proliferator-activated peroxisome receptor (PPAR $\gamma$ ) intranuclear receptor ligand has already shown anti-inflammatory effects in different cell lines. The objective of this study was to evaluate the immunomodulatory capacity of 15d-PGJ2 in the production of inflammatory cytokines mediated by the Dpt extract in human keratinocyte line (HaCat cells). Dithiotreitol-DTT (aDpt) activated Dpt or Dpt treatment induced the production of IL-8 in a dose-dependent manner, being aDpt the most potent inducer IL-8. Pretreatment with 15d-PGJ2 showed a significant reduction of IL-8 and IL-6 levels induced by aDpt. We conclude that pre-treatment with 15d-PGJ2 promotes the down-regulation of aDpt-induced IL-8 and IL-6 production in HaCat cells, allowing further use in the development of novel therapies for the disease.

**KEY WORDS:** atopic dermatitis, 15d-PGJ2, keratinocytes, *Dermatophagoides pteronyssinus* and IL-8 production.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Análise da viabilidade de células HaCat por ensaio de MTT após tratamento com extrato de *Dermatophagoides pteronyssimus* (Dpt); Dpt ativado com 1 mM ditioneitol (aDpt) e 15d-PGJ2 em diferentes concentrações. **39**
- Figure 2:** Produção de IL-8 em células HaCat mensurados por ELISA sanduíche após tratamento com extrato de *Dermatophagoides pteronyssimus* (Dpt) e Dpt ativado com 1 mM ditioneitol (aDpt). **41**
- Figure 3:** Modulação da produção de citocinas em células HaCat pré-tratadas com 15d-PGJ2. **43**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
15d-PGJ2	15-deoxi-delta (12,14)-prostaglandina J2
ADM	<i>Acina-to-ductal metaplasia</i>
aDpt	Dpt ativado
AMPs	Peptideo antimicrobianos
API	<i>Activator protein 1</i>
BCL-6	<i>B-cell lymphoma 6 protein</i>
CBA	<i>Citometric Bead Array</i>
CCL	<i>Chemokine (C-C motif) ligand</i>
CCR	<i>Chemokine receptor</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cm <sup>2</sup>	Centímetros quadrados
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COX	Cicloxygenase
DA	Dermatite atópica
Der f	<i>Dermatophagoides farinae</i>
Der p	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
DMEM	Dulbecco's Eagles modificado
Dpt	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
DTT	Diotiotreitol
DUSP	<i>Dual specificity protein phosphatase</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ERK	<i>Extracelullar singal-regulated kinase</i>
FcεRI	Receptor de alta afinidade para IgE
FHN	Fator de hidratação natural
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>
G	Gravitacional
GM-SCF	Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	<i>Ácido Sulfúrico</i>
HDM	<i>House dust mite</i>
HETEs	Hidroxeicosatetraenóicos
IFN <sub>γ</sub>	Interferon gama
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
ILC	Células linfoides inatas
iNOS	NO sintase induzível
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
KDa	KiloDalton
LOX	Lipoxigenase
LTB <sub>4</sub>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
LTs	Leucotrieno
M	Molar

MDC	<i>Macrophage-derived chemokine</i>
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
MTT	Tetrazólio de metiltiazol
N	Normal
NaCl	Cloreto de sódio
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear kappa B
NHR	Receptores hormonais
NLR	Receptores ligantes de nucleotídeos
NLRPs	Receptor NOD- <i>like</i> para proteínas
nm	Nanômetros
NOD	Receptor para proteínas com domínios de ligação a nucleotídeos e oligomerização
PAR-2	Protease activator receptor 2
PBS	Solução salina tamponada de fosfato de sódio
PBS-T	PBS tween
PE	<i>Phicoeritrin</i>
PGD2	Prostaglandina D2
PGE2	Prostaglandina E2
PGH2	Prostaglandina H2
PGI2	Prostaglandina I2
PGJ2	Prostaglandina J2
pH	Potencial hidrogeniônico
PPAR	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SFB	Soro fetal bovino
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
T reg	Células T reguladoras
TARC	<i>Thymus-and activation-regulated chemokine</i>
TCP1	<i>Papillary thyroid cancer – 1</i>
TGF $\beta$	Fator de crescimento tumoral b
Th	<i>T helper</i>
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TSLP	Linfopoiética estromal tímica
$\mu$ g	Micrograma
$\mu$ L	Microlitros
$\mu$ M	Micromolar
UVA1	Ultravioleta A
WY 14643	Agonista de PPAR $\alpha$

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	12
1.1 Dermatite atópica .....	12
1.1.1 Classificações da dermatite atópica .....	12
1.2 Patogênese da dermatite atópica .....	13
1.2.1 Barreira epitelial .....	14
1.2.2 Resposta imune inata .....	16
1.2.3 Resposta imune celular .....	18
1.3 Papel dos queratinócitos na dermatite atópica .....	23
1.4 Receptor PPAR .....	24
1.4.1 PPAR e inflamação da pele .....	27
1.4.2 PPAR $\gamma$ .....	28
1.4.3 15d-PGJ2 .....	29
2. JUSTIFICATIVA .....	31
3. HIPÓTESES .....	32
3.1 Hipótese H0 .....	32
3.2 Hipótese H1 .....	32
4. OBJETIVOS .....	33
4.1 Objetivo geral .....	33
4.2 Objetivos específicos .....	33
5. METODOLOGIA .....	34
5.1 Cultivo celular de queratinócitos .....	34
5.2 Extrato de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (Dpt), aDpt e 15d-PGJ2 .....	34
5.3 Análise da viabilidade celular .....	35
5.4 Ensaio <i>in vitro</i> da modulação da resposta efetora da linhagem de queratinócitos .....	35
5.5 Quantificação de IL-8 por ELISA .....	36
5.6 Quantificação de citocinas inflamatórias .....	37
5.7 Análise estatística .....	37
6. RESULTADOS .....	38
6.1. Efeito de 15d-PGJ2, Dpt, aDpt ou DTT na viabilidade de células HaCat. ....	38
6.2. Dpt ou aDpt induz a produção de altos níveis de IL-8 em células HaCat. ....	40

6.3 15d-PGJ2 modula a produção de citocinas pró-inflamatórias em células HaCaT.....	42
7. DISCUSSÃO .....	44
8. CONCLUSÕES.....	49
9. REFERÊNCIAS.....	50

## **1.INTRODUÇÃO**

### **1.1 Dermatite atópica**

A Dermatite Atópica (DA) é uma doença inflamatória crônica da pele que começa na primeira infância, apresentando um curso de recidivas associadas a lesões cutâneas de distribuição e morfologia características, prurido e falta de sono (LEUNG, D. Y., 2013). A maioria dos doentes com DA melhoram até o início da adolescência e cerca de 20 a 30% continuam a apresentar dermatite na vida adulta (LEUNG, D. Y., 1999; ORFALI et al., 2013). A prevalência de DA no mundo é de aproximadamente 15-30% em crianças e 1-3% em adultos (LEUNG, D. Y. M. et al., 2004; ROEKEVISCH et al., 2016) atingindo indivíduos em países desenvolvidos e em desenvolvimento (BOGUNIEWICZ, M.; LEUNG, 2010; ODHIAMBO et al., 2009; WILLIAMS et al., 2008).

Vários estudos mostram que a DA apresenta etiologia complexa com a ativação de várias vias imunológicas que promovem a inflamação (NOVAK, N.; BIEBER; LEUNG, 2003; PENG, W.; NOVAK, 2015; WERFEL et al., 2016). Clinicamente, a patogênese da DA tem sido atribuída a uma interação complexa entre a susceptibilidade genética, fatores ambientais, alterações da barreira cutânea e da função do sistema imunológico (KABASHIMA, 2013; PENG, W.; NOVAK, 2015). Os fatores genéticos que determinam a expressão da atopia podem ser completos (triade atópica: dermatite, asma e rinite) ou incompletos; sendo que as anormalidades da resposta imunológica são desencadeadas por “gatilhos” como aeroalérgenos, produtos microbianos ou substâncias irritantes, dentre outros (JOHANSSON et al., 1998; KABASHIMA, 2013).

#### **1.1.1 Classificações da dermatite atópica**

A DA pode ser classificada em dois tipos fenótipos: extrínseca ou intrínseca. A DA extrínseca ou alérgica apresenta altos níveis de anticorpos IgE total no soro e a presença de IgE específica para alérgenos ambientais e alimentares. A DA intrínseca ou não-

alérgica exibe valores normais de IgE total e ausência de IgE específica (TOKURA, Y., 2010). A DA extrínseca é considerada o tipo clássico, com alta prevalência cerca de 70-80% dos casos, enquanto a incidência de DA intrínseca é de aproximadamente 20%, atingindo predominantemente mulheres (NOVAK, N. et al., 2003).

Alguns fatores podem estar mais relacionados à patogênese e desenvolvimento de determinado tipo de DA. No tipo extrínseco os indivíduos geralmente apresentam alterações da barreira cutânea, enquanto mutações genéticas são mais frequentes no tipo intrínseco (RHO et al., 2004). Imunologicamente, ambas as formas estão associadas à eosinofilia. No quadro de DA extrínseca ocorre a produção altos níveis de citocinas do perfil Th2, que estimulam a síntese de IgE e apresentam papel de importância no desenvolvimento e sobrevivência de eosinófilos. A DA intrínseca é caracterizada por baixos níveis das interleucinas IL-4, IL-5 e IL-13, e elevada produção de IFN $\gamma$ , sugerindo que os pacientes com DA intrínseca não são sensibilizados com alérgenos proteicos, que induzem respostas de perfil Th2, mas com outros antígenos, como por exemplo, alguns tipos de metais (TOKURA, YOSHIKI, 2016; WEIDINGER, S. et al., 2006).

## **1.2 Patogênese da dermatite atópica**

De modo geral, o quadro agudo da DA é caracterizado por lesões de pele intensamente pruriginosas, pápulas eritematosas associadas com escoriação e exsudação. Sob o ponto de vista imunológico encontramos um aumento de IgE sérica, eosinofilia, ativação crônica de macrófagos, elevada secreção de fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-SCF), prostaglandina E2 (PGE2), interleucinas IL-4, 5, 10, 13, 17 e 22, ativação e liberação de histamina por basófilos e diminuição de IFN (LEUNG, D. Y., 2013; ORFALI et al., 2013).

A inflamação crônica provoca, geralmente, a remodelação do tecido associada à formação de placas espessas com hiperplasia da pele (liquenificação), aumento da deposição de colágeno na derme e pápulas fibróticas secas. Macrófagos da derme são marcadamente aumentados no infiltrado dérmico durante a fase crônica e os eosinófilos intactos são menos comuns. As células T permanecem presentes na fase crônica,

embora em menor número em comparação com a fase aguda da doença. Em pacientes assintomáticos e aqueles que apresentam diferentes estágios de eczema atópico (doença ativa) ocorre a presença de infiltração de leucócitos (principalmente células T) caracterizando os achados histopatológicos desta doença (WERFEL, 2009).

Neste contexto da DA, os diferentes elementos celulares da pele exercem um importante papel na ativação/modulação dos diferentes compartimentos do sistema imunológico, podendo afetar a imunidade sistêmica como um todo (EGAWA; KABASHIMA, 2011).

### **1.2.1 Barreira epitelial**

A pele apresenta uma função de sentinela, capacitada para determinar quando e como responder a um amplo conjunto de agressões ambientais durante os estados homeostáticos e patológicos. A decisão de desencadear uma resposta a um antígeno envolve pelo menos 4 elementos. O primeiro desses elementos é a barreira física constituída pela epiderme que funciona como uma defesa primária e biossensor para o ambiente externo. O segundo elemento é a barreira química, composta por uma variedade de moléculas, incluindo os peptídeos antimicrobianos clássicos (AMPs), membros da família S100 e até mesmo produtos de degradação da filagrina (KUO et al., 2013). A filagrina é um peptídeo que reside de no estrato córneo e é progressivamente degradada por enzimas de modificação pós-traducionais que, em associação com aminoácidos hidrofílicos, seus metabólitos e vários íons formam o fator de hidratação natural (FHN). O FHN desempenha um papel crítico na manutenção do pH da pele, regulando dessa maneira eventos bioquímicos chave, incluindo a atividade de proteases, a permeabilidade da barreira e defesa antimicrobiana cutânea (O'REGAN et al., 2009). O terceiro elemento é a flora microbiota da pele, também conhecido como o microbiota, que exerce um papel na competição *in situ* com bioagentes patogênicos. O quarto e último nível de proteção é representado pela barreira imunológica, que apresenta componentes de resposta mais imediatos (imunidade inata) e ainda outros mais específicos (imunidade adaptativa) (KUO et al., 2013).

A epiderme representa o primeiro obstáculo contra agressões do meio externo e é constituída pelo estrato córneo, estrato granuloso, estrato espinhoso e o estrato basal. Na camada basal, os queratinócitos sintetizam proteínas como a queratina 5 e 14, enquanto os queratinócitos diferenciados sintetizam proteínas como a queratina 10, filagrina, involucrina e loricrina. As três últimas proteínas estão associadas com o envelope cornificado, uma camada circundante dos corneócitos, localizada no estrato córneo (DANSO et al., 2014).

O estrato córneo consiste não apenas em barreira física, mas representa também uma estrutura metabolicamente ativa, interagindo com camadas subjacentes da epiderme. O estrato córneo é composto por queratinócitos unidos por *tight junctions* e cercados por uma matriz de lipídeos altamente organizada, localizada nos espaços intercelulares entre os corneócitos. As principais classes de lipídeos presentes no estrato córneo humano são as ceramidas, ácidos graxos e colesterol (DE BENEDETTO et al., 2009; ELIAS; FEINGOLD, 1992).

Os lipídios presentes na pele, também desempenham um papel na DA mostrando que alterações na sua distribuição e comprimento de cadeia estão relacionadas com defeitos na barreira cutânea (JANSSENS et al., 2012). As moléculas de ceramidas, por exemplo, apresentam a capacidade de reter água no espaço extracelular do envelope córneo, contribuindo para uma maior homeostase cutânea. Interessantemente, baixos níveis de ceramidas têm sido relatados no envelope córneo da pele de pacientes com DA (SATOR; SCHMIDT; HONIGSMANN, 2003), indicando a importância do extrato córneo e das moléculas de ceramidas neste processo imunopatológico.

A associação genética mais forte com a DA até agora foi demonstrada para mutações e perda de função no gene de filagrina. A filagrina desempenha vários papéis na fisiopatologia da DA, é responsável por agregar filamentos de queratina em feixes compactos e modificar a composição de queratinócitos e a camada celular granular (THYSSEN; KEZIC, 2014). O que explica porque a menor expressão de um único componente do complexo de diferenciação epidérmica pode ter uma influência tão grande sobre toda a função da barreira cutânea.

Na DA, defeitos no metabolismo da pró-filagrina, uma das proteínas essenciais do estrato córneo e menor expressão de claudina 1 (proteína localizada nas *tight junctions*) levam a predisposição à infecções e a inflamação cutânea (ADDOR et al., 2012;

BATISTA et al., 2015). Além disso, a disponibilidade reduzida de metabólitos de filagrina, como o fator hidratante natural, leva a alterações na hidratação e no pH da pele (THYSSEN; KEZIC, 2014). O aumento do pH da pele aumenta a atividade das serinas proteases e calicreínas, levando à degradação dos corneodesmosomos e da aderência intercelular além de ser responsável por atenuar a atividade de outras enzimas responsáveis pela síntese de ceramidas (KAWASAKI et al., 2012; LANDHEER et al., 2013; MORIZANE et al., 2012).

As alterações do estrato córneo resultam em perda de água transepidermica e este comprometimento da barreira física da pele é particularmente intenso na DA, levando ao aumento da absorção de antígenos, e assim, contribuindo para a hiperreatividade cutânea que é característica da doença (PENG, W.; NOVAK, 2015).

É importante mencionar que citocinas de perfil Th2, como IL-4 e IL-13 e também outras interleucinas como IL-25 e IL-33 e fatores solúveis tais como a linfopietina estromal tímica (TLSP), podem ser detectados em altos níveis na pele de indivíduos com DA. Estes fatores também são capazes de modular a função dos queratinócitos e a integridade da barreira cutânea (HOWELL, MICHAEL D. et al., 2008; HOWELL, M. D. et al., 2007; MORIZANE et al., 2012). Além disso, TNF- $\alpha$  juntamente com as citocinas Th2, IL-4, IL-13 e IL-31 aumentam a secreção de TSLP de queratinócitos, danificam a organização lipídica e contribuem para a diminuição da produção de ácidos graxos livres de cadeia longa e ceramidas (DANSO et al., 2014).

### **1.2.2 Resposta imune inata**

As respostas inflamatórias às infecções da pele envolvem uma refinada comunicação celular, entre queratinócitos e células apresentadoras de antígenos, em especial as células de Langerhans. A ativação destes tipos celulares podem ocorrer por múltiplos receptores, incluindo receptores de reconhecimento padrão da família de receptores semelhantes ao Toll (TLR- *Toll like receptors*). Quando estimulados por microrganismos ou injúrias teciduais, estes receptores induzem a liberação de peptídeos antimicrobianos, citocinas e quimiocinas que agem em conjunto como um mecanismo

de defesa contra a penetração de microrganismos através do aumento da força de adesão celular mediada por *tight junctions* (YUKI et al., 2011).

Estudos anteriores demonstraram que monócitos de pacientes com DA são funcionalmente defeituosos na capacidade de produzir citocinas pró-inflamatórias a estímulos no receptor de Toll tipo 2 (TLR2) (HASANNEJAD et al., 2007; MRABET-DAHBI et al., 2008). Além disso, TLR2 com polimorfismo em um único nucleotídeo foi encontrado em maior frequência em doentes com DA grave, em comparação com grupos de controle (AHMAD-NEJAD et al., 2004) visto que, os monócitos de pacientes com DA que apresentaram mutação para TLR2 também reduziram a expressão de IL-8, IL-1 $\beta$ , e TNF- $\alpha$ . (MRABET-DAHBI et al., 2008; NIEBUHR et al., 2008).

A importância dos receptores ligantes de nucleotídeos (NLR) em pacientes com doenças inflamatórias como a DA tem sido sugerido recentemente. Um estudo coorte realizado com indivíduos portadores de DA e seus filhos mostrou que o receptor para proteínas com domínios de ligação a nucleotídeos e oligomerização (NOD) tipo 1 com polimorfismo em um único nucleotídeo está associado com aumento dos níveis de IgE e mais fracamente com o desenvolvimento da doença (WEIDINGER, STEPHAN et al., 2005), enquanto polimorfismo no alelo de NOD2 está associado com um risco de quase duas vezes mais chances de desenvolvimento de DA (KABESCH et al., 2003).

Em humanos já foram descritos 14 tipos de receptores NLRPs (receptor NOD-like para proteínas). Os queratinócitos primários expressam NLRP 1 a 8, 10, 11, 13 e 14 enquanto NLRP12 foi detectado apenas nas células de linhagem de queratinócitos HaCat (KUMMER et al., 2007; WATANABE et al., 2007). Alguns receptores NLRPs formam um complexo multiproteico denominado de inflamassoma. A ativação do inflamassoma estimula a produção de IL-1 $\beta$  e IL-18 através de caspase-1. Interessantemente proteases de alérgenos da poeira domiciliar ativam NLRP3, sugerindo que o NLRP3 apresenta um papel importante na patogênese da DA (DAI et al., 2011). Mutações no gene de NLRP3 e mutações em outras proteínas, que coletivamente resultam no aumento da produção de IL-1, são a causa de inúmeras doenças inflamatórias (DAVIS; WEN; TING, 2011). Pacientes com DA que não apresentavam mutações no gene da filagrina mostraram um aumento da expressão de IL-1 $\beta$  na epiderme proveniente da ativação do inflamassoma (KEZIC et al., 2012).

### 1.2.3 Resposta imune celular

Grande parte dos estudos nos últimos anos tem se dedicado a compreender os mecanismos imunológicos envolvidos na fisiopatologia da DA. O aumento da infiltração de células T, subtipos de células dendríticas, macrófagos, mastócitos e eosinófilos podem ser observados em lesões de DA, bem como o aumento da quantidade de diferentes citocinas e quimiocinas.

Após a exposição a um antígeno protéico, as células dendríticas fazem o papel de apresentadoras de antígenos e dessa maneira, estimulam a proliferação de células T induzindo diferentes respostas pelas células T auxiliares (HONDA, T. et al., 2012). Portanto, as interações funcionais das células imunológicas da pele também são essenciais para a compreensão da patogênese da DA.

Estudos *in vitro* demonstraram que após desafio alérgico as células dendríticas do subtipo inflamatório aumentam a liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (NOVAK, NATALIJA, 2012; YOSHIDA et al., 2014). Além disso, entre as células presentes na pele, as células dendríticas representam o tipo celular mais importante para iniciar a resposta imune do tipo Th2, pois expressam em sua superfície o receptor FcεRI, que apresenta alta afinidade para IgE (NOVAK, NATALIJA, 2012). O papel da IgE ainda é um assunto de debate, porque não está claro se ele desempenha um papel central na patogênese da DA. Sabe-se que o aumento da expressão desse receptor está relacionado com a gravidade das lesões cutâneas.

Os monócitos humanos são considerados precursores de macrófagos e células dendríticas porque os monócitos se diferenciam em macrófagos e células dendríticas sob um ambiente inflamatório. Estudos mostraram que células de langerhans residentes em tecido normal e macrófagos apresentam origem embrionária e se renovam através da proliferação (CHORRO et al., 2009; HASHIMOTO et al., 2013). No estado estacionário, os monócitos que migraram do sangue para o tecido mantêm seu caráter monocítico e apresentador de antígenos para células T nos linfonodos. A sinalização atenuada de IFN $\gamma$  e TGF $\beta$  e baixa responsividade de monócitos em indivíduos com DA contribuem para promover respostas imunes do perfil Th2 devido a diminuição da

sinalização de TGF $\beta$  por um lado e diminuição da estimulação da produção de citocinas do perfil Th1 por outro (GROS et al., 2011; PENG, W. M. et al., 2013).

Os mastócitos são as células-chave para mediar reações de hipersensibilidade de tipo I. Os resultados de modelos animais demonstram que essas células são necessárias para o desenvolvimento de lesões cutâneas (ANDO et al., 2013). Na DA o número de mastócitos na pele lesionada é aumentado, liberando IL-31, IL-17 e IL-22 o que suporta a hipótese de que os mastócitos promovem a inflamação da pele (MASHIKO et al.; OTSUKA; KABASHIMA, 2015). Além disso, na pele com DA, a  $\delta$ -toxina liberada por *Staphylococcus aureus* estimula a degranulação dessas células, promovendo a inflamação local pela liberação de mediadores pro-inflamatórios (NAKAMURA et al., 2013). Além disso, a DA parece estar associada ao recrutamento e ativação de basófilos. Recentemente foi demonstrado que basófilos em indivíduos com DA podem exibir atividade antibacteriana, no entanto, o papel dos basófilos na DA ainda não está bem definido (OTSUKA; KABASHIMA, 2015; YOUSEFI et al., 2015).

A eosinofilia é frequentemente associada com o aumento nos níveis de eosinófilos no sangue e apresentam correlação com a severidade da doença (KIEHL et al., 2001). Até agora o papel dos eosinófilos na patogênese da DA ainda é incerto. Existem indícios de que os eosinófilos contribuem na defesa contra a invasão de microrganismos nos casos de deficiência da barreira cutânea, regulando a resposta imune e/ou contribuindo para o remodelamento tecidual (ROTH et al., 2011).

De modo geral, a DA é considerada uma doença alérgica mediada por células Th2 que se caracteriza pela produção de IgE periférica anormal, eosinofilia, ativação de mastócitos, e indução de linfócitos Th2 que expressam as interleucinas IL-4, IL-5, IL-13 e IL-31 (BIEBER, 2010; KIM, S. et al., 2011). Um estudo com biópsias sequenciais de pacientes com DA após exposição à aeroalérgenos, como ácaros, demonstraram uma resposta imunológica bifásica caracterizada por alternar do perfil fenotípico Th2 para o perfil Th1 secretando IL-12 e IFN $\gamma$  em fases mais avançadas da doença (GREWE et al., 1995; LEUNG, D. Y., 2013). Neste contexto, o microambiente do fenótipo Th2 altera a diferenciação de queratinócitos e inibe a produção de peptídeos antimicrobianos predispondo o sítio a infecções (NOMURA et al., 2003).

Alguns estudos sugerem que IL-1 $\beta$  apresenta um papel importante na DA contribuindo para o desenvolvimento da inflamação cutânea. Um trabalho publicado recentemente mostrou que em indivíduos saudáveis com alelos funcionais para o gene da filagrina, IL-1 $\beta$  estimulou a produção de TLSP e diminuiu a expressão da filagrina e outras proteínas da epiderme. Estes efeitos foram impedidos quando estes indivíduos foram tratados com anti-IL-1 $\beta$  e antagonista do receptor para IL-1. Curiosamente nos indivíduos com DA a resposta a IL-1 $\beta$  foi de modo semelhante, mostrando que IL-1 $\beta$  pode ser um mediador precoce para a expressão do fenótipo da DA através da indução de TLSP e alteração da homeostase da epiderme (BERNARD et al., 2017).

Na DA, alguns estudos têm sugerido que tanto a IL-1 $\beta$  como a IL-1 $\alpha$  contribuem para o desenvolvimento da inflamação da pele: i) HDM tem sido descrito estimulando a ativação do inflamassoma de NLRP3 em queratinócitos e promovendo a secreção de IL-1 $\beta$  (DAI et al., 2011), ii) os transcritos de mRNA de IL-1 $\beta$  e IL-1 $\alpha$  são significativamente expressos na pele lesionada de indivíduos com DA aguda e crônica tanto em formas extrínsecas quanto intrínsecas (BIANCHI et al., 2011; GITTLER et al., 2012; SUAREZ-FARINAS et al., 2013), iii) níveis elevados de IL-1 $\beta$  foram registrados no soro de pacientes com DA, com correlação com a gravidade da DA (NUTAN; KANWAR; PARSAD, 2012).

Em adição ao paradigma Th1/Th2, os papéis das células Th17 e T reguladoras (Tregs) têm sido pesquisados (DI CESARE; DI MEGLIO; NESTLE, 2008; HONDA, T. et al., 2012). As células Th17 são caracterizadas pela produção de citocinas de perfil inflamatório, tais como IL-17A, IL-17F, IL-22 e IL-26, destacando-se os fatores TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, e IL-23 como os principais envolvidos na diferenciação de células T *naive* em Th17. A análise fenotípica de células mononucleares de sangue periférico de pacientes com DA exibiu um acentuado aumento da população de células T CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup>. Além disso, uma elevada percentagem de células produtoras de IL-17 foi encontrada em DA grave, sugerindo que há uma correlação direta entre a presença de células Th17 e gravidade da doença. O aumento dos níveis de IL-17 tem sido associado à presença de lesões cutâneas de pacientes com DA (KOGA et al., 2008).

Estudos em modelo de pele humana mostraram que IL-17A suprime a expressão de citocinas TSLP e citocinas do perfil Th2 e que citocinas da resposta imune Th2 também diminuem a função de IL-17A sugerindo que as vias Th17 e Th2 podem ser coreguladas

entre si (EYERICH et al., 2009). No entanto, outro estudo com camundongos deficientes em IL-17A mostraram respostas de perfil Th2 atenuadas na fase aguda da inflamação cutânea (NAKAJIMA et al., 2014). Mais resultados de outros modelos animais e sistemas humanos são necessários para desvendar o papel exato das células Th17 na DA.

Interessantemente, a IL-25 (IL-17E), um membro importante e distinto da família IL-17, estimula células do perfil Th2 mediando a inflamação através da ativação de células de memória Th2 juntamente com células dendríticas ativadas por TSLP (WANG, Y.-H. et al., 2007). Além disso, a IL25 também diminui a síntese de filamentos em queratinócitos (HVID et al., 2011). Também IL-33 e TSLP são citocinas derivadas do tecido epitelial e essenciais para a patogênese da DA, estimulando células Th2 e promovendo inflamação local (KINOSHITA et al., 2009).

As células Treg controlam a ativação de células autoreativas e T-efetoras e são cruciais para a manutenção da tolerância periférica a auto-antígenos. Células Treg CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> tem sido consideradas células Treg de “ocorrência natural” para distinguir de células Treg adaptativas, que são geradas após ativação. A população de células T-reg adaptativas é caracterizada pela secreção de altos níveis de IL-10 ou fator de crescimento transformante (AKDIS; BLASER; AKDIS, 2005). As mutações em FOXP3, fator nuclear expresso em células T-reg naturais e na subpopulação de células T-reg adaptativas, resultam em desregulação imune caracterizada por hiper produção de IgE, alergia alimentar e eczema, o que sugere um possível papel das células T-reg na DA (TORGERSON; OCHS, 2007).

Um estudo realizado com uma série de biópsias da pele de pacientes com DA mostrou a presença de células T-reg adaptativas, mas sem células T-reg FOXP3<sup>+</sup> naturais (VERHAGEN et al., 2006). No entanto, em estudos recentes, o número de células T-reg natural FOXP3<sup>+</sup> foi semelhante ou maior em pacientes com DA em comparação com os pacientes controles com pele saudável (FRANZ et al., 2007). Após exposição a uma dose média de radiação UVA-1, ocorre um aumento da produção de algumas citocinas pró-inflamatórias, porém sem alteração do número de células T-reg naturais (SCHNOPP et al., 2007).

Quanto à função de Treg na DA, foi relatado que sua atividade supressora é semelhante à de Treg em indivíduos saudáveis controles (OU et al., 2004). No entanto,

foi relatado um novo subtipo de Treg com capacidade de estimular resposta efetora de células Th2 em indivíduos com DA e que suas funções dependem da expressão de CCR6. Nesse trabalho, células Treg CCR6- CD24+ *high* produziram citocinas de perfil Th2 e co-cultura com células T efectoras aumentaram seletivamente a produção de IL-5, sugerindo a heterogeneidade de Treg na DA (REEFER et al., 2008). Em resumo, os estudos mais recentes têm identificado células T-reg na pele de pacientes com DA, mas os trabalhos desenvolvidos *in vitro* ainda não conseguiram traçar as principais diferenças nas atividades funcionais das células T-reg para assim determinar se são relevantes para o curso de DA *in vivo*.

Recentemente, também foi observado que células linfoides inatas (ILCs) estão presentes no infiltrado celular da pele e apresentam papel importante na DA produzindo as citocinas do tipo Th2 como IL-5, IL-9 e IL-13 promovendo inflamação local depois da estimulação com alérgenos, TSLP ou IL-33 (IMAI et al., 2013; SALIMI et al., 2013). IL-4 e IL-13 são os principais mediadores da resposta imune do perfil Th2 e a sinalização dessas citocinas ocorre através do receptor IL-4 (IL-4Ra). O receptor IL4Ra medeia mecanismos de produção de IgE pelas células B, a diferenciação de células dendríticas, ativação de células T e recrutamento de eosinófilos (HAMILTON et al., 2014).

O padrão de quimiocinas dos subconjuntos de células dendríticas difere profundamente entre a DA aguda e crônica e a pele com DA não lesionada. Quimiocinas como CCL17, CCL22 aumentam na pele durante a inflamação e estimulam o recrutamento de células dendríticas dos subtipos inflamatórios, bem como a infiltração de células T (GROS et al., 2011). Dados de estudos *in vitro* com células cutâneas indicam que células dendríticas não estimuladas de pacientes com DA são capazes de conduzir respostas imunes Th1, Th2 ou Th17, enquanto que o microambiente local impacta na sua polarização de células T *in vivo* (FUJITA et al., 2011).

### 1.3 Papel dos queratinócitos na dermatite atópica

Há crescente evidência de que as células do tecido residente, como os queratinócitos desempenham um papel importante em direcionar as respostas imunes. Alguns estudos relatam o papel passivo dos queratinócitos, demonstrando que essas células podem regular negativamente a resposta imune ou provocar anergia devido à ausência de moléculas B7 co-estimulatórias; (BAL et al., 1990; RENNE et al., 2010). No entanto, trabalhos recentes apontam para um papel mais ativo dos queratinócitos na imunorregulação (MARTEL et al., 2015; RYU et al., 2015). Os queratinócitos podem secretar várias citocinas e quimiocinas, além de expressar vários receptores de membrana envolvidos em reações inflamatórias (ALBANESI et al., 2005; NICKOLOFF; TURKA, 1994; STEINHOFF; BRZOSKA; LUGER, 2001; WITTMANN; WERFEL, 2006).

Os queratinócitos podem ser modulados pelas citocinas secretadas por células efetoras do perfil Th1 e Th2. Entre elas, o IFN $\gamma$  é um dos mais potentes fatores de ativação de queratinócitos, induzindo a expressão de moléculas de superfície (ICAM-1, MHC de classe I e II, CD40 e FAS), a produção de quimiocinas (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL18, CCL22 e CXCL10) e citocinas (IL-1, IL-6, IL-18 e TGF- $\beta$ ). Várias outras moléculas, como as metaloproteinases de matriz, fatores de crescimento, enzimas e fatores de transcrição/moléculas da via de sinalização intracelular também são regulados positivamente por queratinócitos (WITTMANN; WERFEL, 2006).

A produção de citocinas de primeira linha, tais como IL-1, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-33 ou TSLP, por células epiteliais é agora considerada como um evento chave de iniciação para a indução de respostas em interfaces epiteliais (PASTORE; MASCIA; GIROLOMONI, 2006; WILLART et al., 2012). Além disso, os queratinócitos epidérmicos de pacientes com DA são uma importante fonte de TSLP, que estimula células dendríticas na ativação de células T *helper*, resultando na produção de IL-4 e IL-13. Estas observações podem explicar a ligação entre o prurido com o desencadeamento da inflamação da pele mediada por Th2 na DA (LEUNG, D. Y. M. et al., 2004).

No entanto, TSLP certamente não é a única citocina epitelial capaz de induzir o desenvolvimento da DA e estimular as células de perfil Th2. Um modelo de asma induzida por baixas doses de ácaros da poeira doméstica (HDM) mostrou que a secreção

de IL-1 $\alpha$  pelas células epiteliais direcionaram a produção de GM-CSF e IL-33, mas não de TSLP, estimulando a resposta Th2, principal característica relatada nesse modelo de DA (WILLART et al., 2012).

Uma grande variedade de citocinas e quimiocinas interagem e produzem sintomas que são característicos da DA. A alteração da barreira epitelial estimula a produção de quimiocinas regulada pela ativação do timo (TARC/CCL17) e quimiocinas derivada de macrófagos (MDC/CCL22) nos queratinócitos (ONOUE et al., 2009), que atraem as células Th2 através do receptor de quimiocinas CC tipo 4 (CCR4). TSLP também é altamente expressa na epiderme da pele de pacientes com DA, induzida por lesão mecânica e promovendo a ativação do receptor ativado por proteases PAR-2 (KABASHIMA, 2013).

Os queratinócitos de doentes com DA também apresentam aumento da apoptose induzida por IFN- $\gamma$  em comparação com queratinócitos de indivíduos saudáveis. Estudos mostram a ativação de três genes relacionados com a apoptose (NOD2, DUSP1 e ADM) e outros oito genes foram identificados superexpressos em lesões cutâneas de DA (CCDC109B, CCL5, CCL8, IFI35, LYN, RAB31, IFITM1 e IFITM2) induzidos por IFN $\gamma$  em queratinócitos primários (REBANE et al., 2012). Adicionalmente, a expressão gênica modificada da filagrina, loricina, involucrina, corneodesmosina ou de proteínas do envelope córneo estão relacionadas a alterações na diferenciação de queratinócitos (SUÁREZ-FARIÑAS et al., 2011).

#### **1.4 Receptor PPAR**

A pele é rica em lipídeos presentes nas membranas celulares, corpos lamelares, estrato córneo e no espaço extracelular da camada epidérmica. Estes lipídeos são sintetizados ou oriundos do metabolismo epidérmico e podem se ligar a receptores hormonais (NHR) (ICRE; WAHLI; MICHALIK, 2006; MICHALIK; WAHLI, 2007; SCHMUTH, M. et al., 2007). Em humanos, a família NHR apresenta 48 membros e estes receptores são responsáveis pela homeostase cutânea, diferenciação de queratinócitos, formação de barreira, metabolismo lipídico e inflamação (CHAWLA; REPA; et al., 2001).

Os receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPAR) também fazem parte da família de receptores NHR e apresentam três isotipos: alfa, beta e gama, sendo cada uma dessas isoformas com ligantes e funções diferentes. A pele humana expressa os três tipos de receptores PPAR, sendo PPAR $\beta$  expresso em toda a epiderme enquanto PPAR $\alpha$  e PPAR $\gamma$  são expressos preferencialmente na epiderme suprabasal, onde residem os queratinócitos já diferenciados (ICRE et al., 2006; RIVIER et al., 1998; WESTERGAARD et al., 2001).

Os três isotipos de PPAR também são encontrados em células dendríticas, melanócitos e células de Langerhans imaturas presentes na epiderme (ANGELI et al., 2003; DUBRAC et al., 2007; EASTHAM; MILLS; NILES, 2008). Além disso, estes receptores também podem ser encontrados em linfócitos B e T humanos (HARRIS; PHIPPS, 2001; JONES, DALLAS C; DING; DAYNES, 2002). Após a ativação de células T ocorre *downregulation* da expressão de PPAR $\alpha$  e, contrariamente, nessa mesma situação, há um aumento da expressão dos receptores PPAR $\gamma$  (CLARK et al., 2000; JONES, DALLAS C et al., 2002; NORAZMI et al., 2012). PPAR $\alpha$  e PPAR $\gamma$  apresentam papel de grande importância, pois são capazes de regular a síntese de IL-2, um marcador de ativação precoce de células T estimulando a proliferação dessa população celular (CLARK et al., 2000; JONES, DALLAS C. et al., 2003). Os trabalhos referentes a expressão de PPAR em linfócitos B atualmente estão limitados ao estudo do potencial pró-apoptótico de seus agonistas em células normais e linhagens de células malignas (RAY et al., 2005; SCHLEZINGER et al., 2004).

Alguns trabalhos têm se dedicado a compreender o papel dos receptores PPAR na homeostase da epiderme, mostrando que após 6 horas da alteração experimental da barreira epitelial, em indivíduos saudáveis, houve uma redução dos níveis de mRNA para PPAR $\alpha$ , porém sem alteração nos níveis de mRNA para PPAR $\beta$  e PPAR $\gamma$  (TÖRMÄ; BERNE, 2009). Outro estudo a fim de investigar a importância de PPAR, mostrou que na gestação de camundongos *knockout* para PPAR $\alpha$  há um retardamento da formação do estrato córneo e diminuição de alguns marcadores de diferenciação de queratinócitos, involucrina e loricrina (SCHMUTH, MATTHIAS et al., 2002). Além da redução de camadas do estrato córneo também são observadas morte celular dos queratinócitos, contribuindo para o aumento da resposta inflamatória (DUBRAC et al., 2011).

Os receptores PPAR podem ser ativados por um amplo espectro de moléculas tais como ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, como, por exemplo, o ácido alfa-linoleico, ácido docosa-hexaenóico, metabólitos de ácido araquidônico e leucotrienos. Os ácidos graxos poli-insaturados, tais como o ácido araquidônico ou o ácido linoleico, são ligantes dos três tipos de receptores PPAR, enquanto os derivados de ácidos graxos das vias de cicloxigenase (COX) (prostaglandinas) e lipoxigenase (LOX) (leucotrienos ou LTs, ácidos hidroxieicosatetraenóicos ou HETEs) são ligantes que apresentam maior seletividade para um dos três isotipos (HARMON; LAM; GLASS, 2011).

Atualmente, os eicosanóides melhor caracterizados como ligantes de PPAR são LTB<sub>4</sub> e 8S-HETE, que preferencialmente ativam PPAR $\alpha$ , 15-desoxi-delta (12, 14)-prostaglandina J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>) e 15-HETE, que são seletivos para PPAR $\gamma$  e prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>, também chamada prostaciclina), que é um ligante PPAR $\beta/\delta$ . Existem também alguns ligantes sintéticos específicos para cada isotipo PPAR tais como as tiazolidinedionas, que envolvem a rosiglitazona e pioglitazona, que são ligantes seletivos de PPAR $\gamma$ . Já os fibratos tais como o fenofibrato, clofibrato, bezafibrato e gemfibrozil, são ligantes de PPAR $\alpha$ . No entanto ainda não estão disponíveis drogas que sejam ligantes de PPAR $\beta/\delta$  (RADINA; WALTER; LILIANE, 2005; SCHMUTH, MATTHIAS et al., 2014).

Em pele de camundongos a ativação de PPAR $\gamma$  induz a diferenciação de queratinócitos que contribui para a formação de barreira no estrato córneo, apresentando grande importância para a homeostase da pele (MAO-QIANG et al., 2004). Dessa forma, a função de barreira é determinada, em grande parte, por lipídeos extracelulares presentes no estrato córneo, mostrando que existe uma forte relação entre o metabolismo epidérmico e a função de barreira cutânea, destacando-se, neste contexto, a importância da modulação do metabolismo lipídico pelos ligantes de PPAR. Estudos em camundongos já mostraram que a ativação de todos os três isotipos PPAR acelera a reparação de barreira epitelial, sugerindo que os ligantes de PPAR induzem a síntese e metabolismo de lipídeos (MAN et al., 2006).

### 1.4.1 PPAR e inflamação da pele

Após lesão do tecido epitelial inicia-se o processo de cicatrização que envolve várias etapas, entre elas a inflamação, repitelização e remodelamento da matriz do tecido lesionado (COULOMBE, 2003). Cada uma dessas etapas ocorre praticamente concomitantemente e são reguladas por citocinas e fatores de crescimento. Estudos mostram que os receptores PPARs são expressos na epiderme de camundongos durante o desenvolvimento fetal e desaparecem do epitélio interfolicular após o nascimento. No entanto, apenas a expressão dos receptores PPAR $\alpha$  e PPAR $\beta/\delta$ , são reativados na epiderme adulta durante a fase inflamatória de lesões na epiderme. Enquanto a expressão de PPAR $\alpha$  é reativada de maneira transitória, os receptores PPAR $\beta/\delta$  são altamente expressos até o fim do processo cicatricial (MICHALIK et al., 2001).

Em camundongos PPAR-nulos durante a fase inflamatória da cicatrização, a sinalização para o recrutamento de células de perfil inflamatório para o local da lesão é prejudicado, destacando a importância dos receptores PPAR na cicatrização tecidual. PPAR $\alpha$  e PPAR $\beta/\delta$  são importantes para a repitelização local rápida, com PPAR $\alpha$  envolvido durante a fase inflamatória inicial e PPAR $\beta/\delta$  durante todo o processo de cicatrização (MICHALIK et al., 2001).

No início da resposta inflamatória são produzidas pelos queratinócitos, neutrófilos e macrófagos algumas citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha/\beta$ . Essas citocinas estimulam a expressão de PPAR $\beta/\delta$  através da sinalização JNK/AP-1 em queratinócitos. Além disso, essas citocinas também são responsáveis por estimular a produção de ligantes endógenos para a ativação de PPAR $\beta/\delta$  que, uma vez ativado aumenta a expressão de genes anti-apoptóticos, o que proporciona o aumento da sobrevivência dos queratinócitos durante a inflamação (TAN et al., 2001).

Estudos realizados em queratinócitos psoriásicos mostraram que a expressão de PPAR $\beta/\delta$  é aumentada, enquanto a de PPAR $\alpha$  e PPAR $\gamma$  é diminuída (RIVIER et al., 1998; WESTERGAARD et al., 2003). Curiosamente o tratamento com agonistas de PPAR $\gamma$  melhora as lesões psoriásicas após a ingestão oral dos agonistas de PPAR $\gamma$  troglitazona ou pioglitazona (ROBERTSHAW; FRIEDMANN, 2005). Ainda são

necessários mais estudos para avaliar o potencial valor clínico dos ligantes PPAR para o tratamento de doenças inflamatórias da pele.

Os agonistas PPAR têm propriedades anti-inflamatórias, reduzem a expressão de várias citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão celular e a função das células apresentadoras de antígeno na epiderme, maturação e migração de células de Langerhans (DUBRAC et al., 2011; DUBRAC; SCHMUTH, 2011; DUBRAC et al., 2007). Alguns trabalhos mostraram que a ativação de PPAR $\alpha$  por WY 14643 inibe a maturação de células de Langerhans de uma forma dependente de PPAR $\alpha$ , pois estes efeitos não são encontrados com o tratamento com WY 14643 em modelos de PPAR $\alpha$  nulo (DUBRAC et al., 2007). O mecanismo subjacente envolve a sinalização por NF- $\kappa$ B. Interferon tipo I induz a expressão de PPAR  $\beta/\delta$  que por sua vez atenua a sinalização mesenquima-epitelial de IL-1 através da estimulação da produção do antagonista do receptor de IL-1. A regulação da sinalização da IL-1 inibe a proliferação de queratinócitos e diminui fatores mitogênicos em fibroblastos (CHONG et al., 2009).

O agonista de PPAR $\gamma$ , pioglitazona, reduz a expressão de TLR2, TLR4, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e a proteína quimioatraente-1 em monócitos de sangue humano (DASU et al., 2009). A ativação farmacológica de PPAR $\gamma$  inibe a maturação de células de Langerhans, a capacidade migratória e proliferação de células T (FU; LUO; LOPES-VIRELLA, 2002). Além disso, os agonistas de PPAR $\alpha$  e PPAR $\gamma$  estimulam a produção *in vitro* de células T reguladoras (DUBRAC et al., 2011), mantendo um alto nível de expressão de FOXP3 (LEI et al., 2010).

#### 1.4.2 PPAR $\gamma$

O receptor PPAR $\gamma$  é um receptor nuclear e é responsável pela regulação do metabolismo lipídico e vem se destacando como um importante regulador da imunidade adaptativa (DAYNES, RAYMOND A.; JONES, DALLAS C., 2002; GLASS; SAIJO, 2010; STRAUS; GLASS, 2007; WAHLI; MICHALIK, 2012). Os ligantes PPAR $\gamma$  apresentam papel de regulação negativa na ativação das células T (WANG, P. et al., 2001), proliferação (TOBIASOVA et al., 2011) e diferenciação (KLOTZ et al., 2009) a

fim de prevenir ou inibir a patogênese de modelos de doenças alérgicas (HAMMAD et al., 2004; HONDA, K. et al., 2004; WOERLY et al., 2003).

O tratamento de células T com os agonistas de PPAR $\gamma$  rosiglitazona, ciglitazona, pioglitazona e 15d-PGJ2 inibe a proliferação de células T e a produção de IL-2 (CLARK et al., 2000; THOMPSON et al., 2007). O tratamento com ciglitazona aumenta a sobrevivência na doença do enxerto versus o hospedeiro por meio das células Treg que expressam PPAR $\gamma$  (WOHLFERT et al., 2007). A diferenciação das células de perfil Th17 é inibida em camundongos pela pioglitazona, retardando assim o aparecimento da doença ou melhorando as características clínicas da encefalomielite autoimune experimental (KLOTZ et al., 2009). Além disso, os ligantes de PPAR $\gamma$  ciglitazona, rosiglitazona e pioglitazona também são capazes de inibir eficazmente a inflamação alérgica num modelo de asma através da regulação de PTEN (HONDA, K. et al., 2004; LEE et al., 2003).

Alguns estudos fornecem evidências de que os receptores PPARs podem inibir a expressão de genes inflamatórios através de vários mecanismos, incluindo a formação de complexos com p65 (CHAWLA; BARAK; et al., 2001), modulação da atividade de p38, uma proteína quinase ativada por mitógeno, secção do co-repressor BCL-6 (KELLY et al., 2004) e formação de complexos diretos com membros da família AP-1 e NF-kB (LEE et al., 2003). É provável que pelo menos alguns desses mecanismos atuem de uma forma específica para o tipo de célula. Contudo, mecanismos resultando na inibição global de NF-kB são inconsistentes com os efeitos dos agonistas de PPAR em macrófagos, uma vez que apenas um subconjunto de genes de NF-kB são inibidos.

### **1.4.3 15d-PGJ2**

A prostaglandina J2 (PGJ2) e os seus metabólitos podem ocorrer de forma natural na produção de prostaglandina D2 (PGD2). A síntese se inicia pela ativação da fosfolipase A2 que resulta na liberação de ácido araquidônico, que se converte em prostaglandina H2 (PGH2) pela ação de cicloxigenases. O intermediário formado é convertido em uma série de prostanóides, biologicamente ativos e cada um deles

apresentam receptores seletivos. A PGD2 é formada pela ação de sintetases de PGD2 e, alternativamente, pode sofrer desidratação química e formar a ciclopentona prostaglandina PGJ2 que, por sua vez, pode sofrer uma desidratação por perda do grupo 15-hidroxila, que juntamente com a migração da ligação dupla 13,14 de PGJ2, resulta na formação de 15d-PGJ2 (SCHER; PILLINGER, 2005).

O último desses metabólitos, 15d-PGJ2, é um ligante endógeno de alta afinidade para o receptor intranuclear de peroxissoma ativado por proliferador  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) (FORMAN et al., 1995; KLIEWER et al., 1995). 15d-PGJ2 inibe a expressão de vários genes relacionados com perfil pró-inflamatório incluindo os genes para NO sintase induzível (iNOS), ciclooxigenase-2 (COX-2) e várias citocinas (DAYNES, RAYMOND A; JONES, DALLAS C, 2002; JIANG; TING; SEED, 1998; RICOTE, MERCEDES et al., 1998). Estudos indicam que esses efeitos são mediados pela inibição de vários fatores de transcrição, como NF- $\kappa$ B, proteína ativadora 1 (AP-1) e transdutor de sinal e ativador da transcrição-1 (STAT-1)(GILROY et al., 1999). Além disso, 15d-PGJ2 tem sido encontrada na fase de resolução do processo inflamatório, sugerindo que 15d-PGJ2 possa apresentar um papel importante na regulação da resposta inflamatória (GILROY et al., 1999).

## 2. JUSTIFICATIVA

A DA é uma das doenças de pele inflamatórias mais frequentes, afetando até 25% das crianças e 1-3% dos adultos em todo o mundo (NOVAK, N., 2009). Indivíduos com a doença grave ou persistente sofrem de uma redução significativa de qualidade de vida (BEATTIE; LEWIS-JONES, 2006), além disso, a DA apresenta um enorme impacto econômico sobre a sociedade (BOGUNIEWICZ, MARK et al., 2007; MANCINI; KAULBACK; CHAMLIN, 2008). A patogênese da DA envolve interações entre vários fatores, incluindo susceptibilidade genética, fatores ambientais, defeitos de barreira da pele e fatores imunológicos (BOGUNIEWICZ, M.; LEUNG, 2010; LEUNG, D., 2003). Dentre os fatores ambientais, podemos destacar os ácaros da poeira doméstica (HDM), alérgenos importantes para o desenvolvimento da DA, bem como da asma e rinite (SCHÄFER, 2008). *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Dermatophagoides farinae* são os tipos mais comuns de HDM e são conhecidos por contribuir também para a imunopatogênese de DA (WEGHOFER et al., 2008).

Estudos mostram que as células da epiderme, como queratinócitos desempenham um papel importante em direcionar as respostas imunes (BAL et al., 1990; RENNE et al., 2010). Estudos recentes apontam para um papel ativo dos queratinócitos na imunorregulação de DA (RYU et, 2015; MARTEL et al, 2015), secretando várias citocinas e quimiocinas, além de expressar vários receptores de membrana envolvidos em reações inflamatórias (ALBANESI et al., 2005; NICKOLOFF; TURKA, 1994; STEINHOFF et al., 2001; WITTMANN; WERFEL, 2006). No entanto, poucos estudos foram realizados para identificar o papel dos queratinócitos em dermatite atópica induzida por ácaros da poeira domiciliar.

A pele humana expressa os três tipos de receptores PPAR (PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  e PPAR $\gamma$ ) (ICRE et al., 2006; RIVIER et al., 1998; WESTERGAARD et al., 2001). Os agonistas PPAR têm propriedades anti-inflamatórias, reduzem a expressão de várias citocinas pró-inflamatórias, quimiocina e moléculas de adesão celular (DUBRAC et al., 2011; DUBRAC; SCHMUTH, 2011; DUBRAC et al., 2007). Neste contexto, os estudos com 15d-PGJ2, agonista de PPAR $\gamma$ , podem contribuir para compreender melhor a resposta imune na indução de DA *in vitro* e a capacidade de 15d-PGJ2 em modular a resposta imunológica em resposta a DA, permitindo sua posterior utilização no desenvolvimento de novas terapias para a doença.

### **3. HIPÓTESES**

#### **3.1 Hipótese H0**

O pré-tratamento com 15d-PGJ2 não reduzirá significativamente a produção de citocinas inflamatórias induzidas por alérgenos do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* em linhagem de queratinócitos humanos.

#### **3.2 Hipótese H1**

O pré-tratamento com 15d-PGJ2 reduzirá significativamente a produção de citocinas inflamatórias induzidas por alérgenos do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* em linhagem de queratinócitos humanos.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade imunomoduladora de 15d-PGJ2 na produção de citocinas inflamatórias induzidas por alérgenos do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* em linhagem de queratinócitos humanos (HaCat).

### 4.2 Objetivos específicos

- Estabelecer um modelo *in vitro* de ativação celular induzida por alérgenos do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* utilizando células de linhagem de queratinócitos humanos (células HaCat);
- Avaliar a toxicidade de diferentes tratamentos com concentrações crescentes de 15d-PGJ2 e do extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus* ativado ou não por ditiotreitól;
- Avaliar a produção de IL-8 em linhagem de queratinócitos humanos, após a estimulação com diferentes concentrações do extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus* ativado ou não por ditiotreitól;
- Quantificar as citocinas humanas do perfil inflamatório (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12) secretadas pelos queratinócitos após pré-tratamento com 15d-PGJ2 seguido da estimulação com o extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus*;
- Avaliar a capacidade imunomoduladora do pré-tratamento com 15d-PGJ2 na produção de citocinas induzida por alérgenos do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* em queratinócitos humanos (células HaCat).

## 5. METODOLOGIA

### 5.1 Cultivo celular de queratinócitos

A linhagem de queratinócitos humanos imortalizados, células HaCat, foram adquiridas no banco de células do Rio de Janeiro – BCRJ (código BCRJ: 0341) e cultivados em frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup> contendo meio Dulbecco's Eagles modificado (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Thermo Fisher) inativado a 56°C, 1% de antibiótico (10.000 U/mL de penicilina e 10mg/mL de estreptomicina), L- glutamina e aminoácidos essenciais em estufa umidificada a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. O repique celular foi realizado quando a monocamada celular atingiu o estágio de confluência, com a tripsinização das células pela adição de 3 mL de solução contendo 0,25% de Tripsina e 0,2% de EDTA, preparadas em solução de NaCl 0,9%. Após o descolamento das células o processo foi interrompido pela adição de DMEM suplementado com 10% de SFB, pois a presença de alfa 1-anti-tripsina no soro neutraliza a ação da tripsina. Após a lavagem das células obtidas com DMEM, as mesmas foram transferidas para novos frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup>, e mantidas para os experimentos posteriores (BOUKAMP et al., 1988).

### 5.2 Extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt), aDpt e 15d-PGJ2

Para o uso em cultura celular o extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) (Hollister, código 6692UP) foi concentrado e dialisado em solução salina tamponada com fosfato (PBS) 0,01M, pH 7,2, utilizando membranas de *cut off* de 6 kDa (PEREIRA et al., 2005). Após a realização da diálise, o extrato de Dpt foi filtrado em membrana de 0,22 µm e a concentração proteica do extrato foi determinada por leitura de absorbância a 280 nm usando o nanospectrofotômetro Biodrop (Biodrop Touch Duo). aDpt (extrato de Dpt ativado) foi obtido por tratamento de Dpt com 1 mM de ditioneitol (DTT) 15 minutos antes do uso como estímulo celular (OGAWA et al., 2007). O extrato de Dpt e a 15d-PGJ2 (Sigma-Aldrich, código: D8440) foram armazenados a -20°C até o uso.

### 5.3 Análise da viabilidade celular

A função mitocondrial de queratinócitos foi avaliada por ensaio de MTT (tetrazólio de metiltiazol) (MOSMANN, 1983). Os queratinócitos foram cultivados em placas de 96 poços ( $10^5$  células/poço/200  $\mu$ L) em meio completo. Após 24 horas as células estavam completamente aderidas na placa e foram lavadas com PBS 0,01M, pH 7,2 para adição dos estímulos em concentrações crescentes dos alérgenos Dpt (5; 10; 20 e 40  $\mu$ g/mL) e aDpt (5; 10 e 20  $\mu$ g/mL) e o controle 1 mM de DTT por 24 horas e 15d-PGJ2 (2,5, 5 e 10  $\mu$ M) diluídos em meio incompleto por 3 horas. Após estes diferentes intervalos de tempo, as placas de cultura foram centrifugadas a 400 x g por 10 minutos para remoção do sobrenadante. Como controle, as células foram incubadas, nas mesmas condições, somente com meio incompleto. A seguir, os queratinócitos foram pulsados com 100  $\mu$ L/poço de MTT (Sigma-Aldrich, código 88417) a 0,5 mg/mL, quatro horas antes do término do período de incubação com os estímulos, e mantidas em condições de cultura. Posteriormente, as placas foram novamente centrifugadas (400 x g por 10 minutos a 18°C) com descarte do sobrenadante, sendo adicionado solução de SDS 10% e N-dimetilformamida 50% (100  $\mu$ L/poço) para a solubilização dos cristais de formazan resultantes da redução do anel tetrazólico do sal MTT. A leitura foi realizada após 30 minutos a 570 nm em leitora de placas (BioTek Epoch). Os resultados foram expressos como porcentagem de viabilidade celular em relação aos controles e as concentrações que não afetaram significativamente a viabilidade celular foram empregadas posteriormente nos ensaios *in vitro* de modulação da resposta efetora de queratinócitos.

### 5.4 Ensaio *in vitro* da modulação da resposta efetora da linhagem de queratinócitos

A função efetora da linhagem de queratinócitos mantidos em cultura como descrito anteriormente foi analisada pela produção de citocinas após estimulação com as diferentes concentrações de Dpt, aDpt e pré-tratamento com 15d-PGJ2. Brevemente, queratinócitos mantidos em cultura, foram contados em câmara hemocitométrica de Neubauer e analisados quanto à viabilidade celular utilizando o corante de exclusão vital azul de Tripan a 0,4% em PBS 0,01M, pH 7,2 para a utilização em experimentos de estimulação celulares.

Células viáveis foram semeadas em placas de cultura celular de 96 poços (Corning Incorporation Costar, New York, NY, EUA), em meio DMEM completo, na concentração de  $1 \times 10^5$  células, 200  $\mu\text{L}$ /poço e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$  por 24 horas. Após a aderência das células, foi removido o sobrenadante, as placas foram lavadas com PBS 0,01M, pH 7,2 e adicionados os estímulos Dpt (5; 10; 20 e 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), aDpt (5; 10 e 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e 15d-PGJ2 (0,6; 1,2 e 2,5  $\mu\text{M}$ ) diluídos em meio incompleto, em concentrações previamente analisadas pelo ensaio de viabilidade celular (MTT), sendo as placas de cultura incubadas por 24 horas para o estímulo de Dpt e aDpt e 3 horas para o estímulo com 15d-PGJ2 a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . O sobrenadante foi coletado após centrifugação a  $400 \times g$  por 5 minutos e armazenado a  $-70^\circ\text{C}$  para posterior análise de citocinas.

### 5.5 Quantificação de IL-8 por ELISA

As concentrações de IL-8 em sobrenadantes de células de HaCat estimuladas com Dpt (5, 10, 20 e 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou aDpt (5, 10 e 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foram mensuradas por ELISA sanduíche usando o kit de detecção para IL-8 humano (BD OptEIA™). As placas de 96 poços foram sensibilizadas usando 50  $\mu\text{L}$ / poço do anticorpo monoclonal específico para IL-8, diluídos em tampão de carbonato de sódio pH = 9,5, 0,1 M, na proporção de 1:250. As placas foram incubadas *overnight* a  $-20^\circ\text{C}$ . Os sítios de ligação não-específicos foram bloqueados usando 150  $\mu\text{L}$ / poço de tampão de fosfato de sódio com soro fetal bovino a 10% por 1 hora. Os padrões de IL-8 foram aplicados na placa em diluição dupla seriada e amostras diluídas em 1:10 usando como diluente tampão de fosfato de sódio com soro fetal bovino a 10%. As placas foram incubadas por 2 horas para que a IL-8 se ligue ao anticorpo imobilizado. Em seguida adicionou-se o anticorpo anti-IL-8 humano biotilado conjugado com estreptavidina-peroxidase juntamente com a streptavidina ambos diluídos na proporção 1:250, sendo incubado por 1 hora. As lavagens com tampão fosfato de sódio com tween a 0,05% (PBS-T) foram feitas entre cada uma das etapas. Para a revelação foi adicionado solução de substrato TMB e, posteriormente, uma solução de parada ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 2N). As absorbâncias foram mensuradas utilizando um leitor de placas (Biotek Epoch) através da leitura nos espectros de 450 e 570 nm. As absorbâncias foram obtidas a partir do cálculo:

absorbância a 450 nm – absorbância a 570 nm. Feito isso, esses valores foram convertidos em valores de concentração através do software microplate reader, usando como referência os valores de absorbância da curva-padrão, construída com a diluição de IL-8 em concentrações conhecidas.

## 5.6 Quantificação de citocinas inflamatórias

As citocinas humanas inflamatórias (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12) foram mensuradas no sobrenadante de cultura de células HaCat pré-tratadas com concentrações de 15d-PGJ2 (0,6-2,5  $\mu$ M) por 3 horas e posteriormente estimuladas com aDpt (20  $\mu$ g/mL) por 24 horas pelo método de captura, utilizando-se *Cytometric Bead Array* (CBA) (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, o sobrenadante da cultura de queratinócitos e padrões de citocinas foram incubados com microesferas (*beads*) de captura de tamanho e fluorescência conhecidos, recobertas com anticorpos específicos que permitem a ligação das respectivas citocinas. O anticorpo de detecção conjugado com ficoeritrina (PE) foi adicionado subsequentemente e, após as incubações, foi acrescentado 1mL de tampão de lavagem e centrifugado a 200 x g por 5 minutos. Os sedimentos contendo as *beads* foram ressuspensos em 200 $\mu$ L e submetidos à análise no citômetro de fluxo BD FACSAria III <sup>TM</sup> (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). Os dados obtidos foram analisados pelo Software FCAP Array (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA versão,1.0.1), observando os limites de detecção de cada citocina.

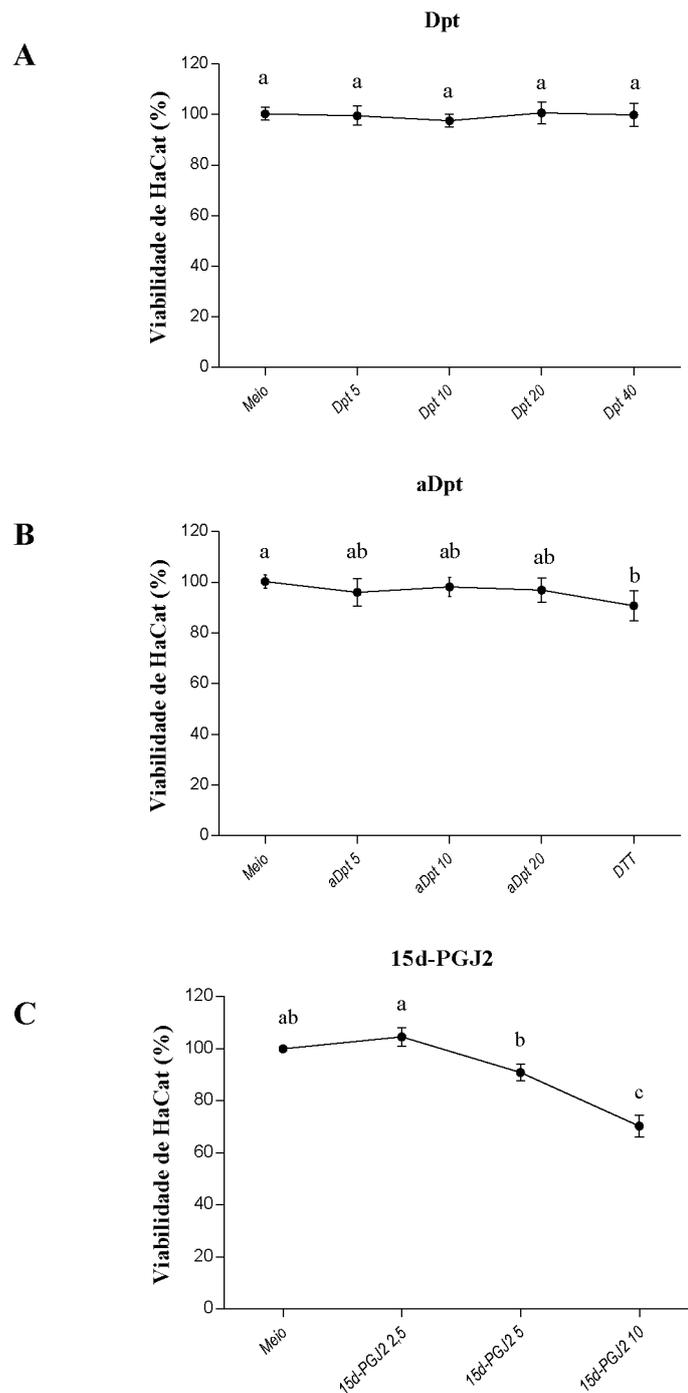
## 5.7 Análise estatística

Os dados foram analisados no software GraphPad Prism (versão 5.0) para comparar os efeitos de diferentes tratamentos. As diferenças entre os tratamentos foram analisadas por *One way* ANOVA, com teste de comparação múltipla de Bonferroni; ou, quando apropriado, as diferenças foram verificadas pelo teste de Mann Whitney. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Efeito de 15d-PGJ2, Dpt, aDpt ou DTT na viabilidade de células HaCat.

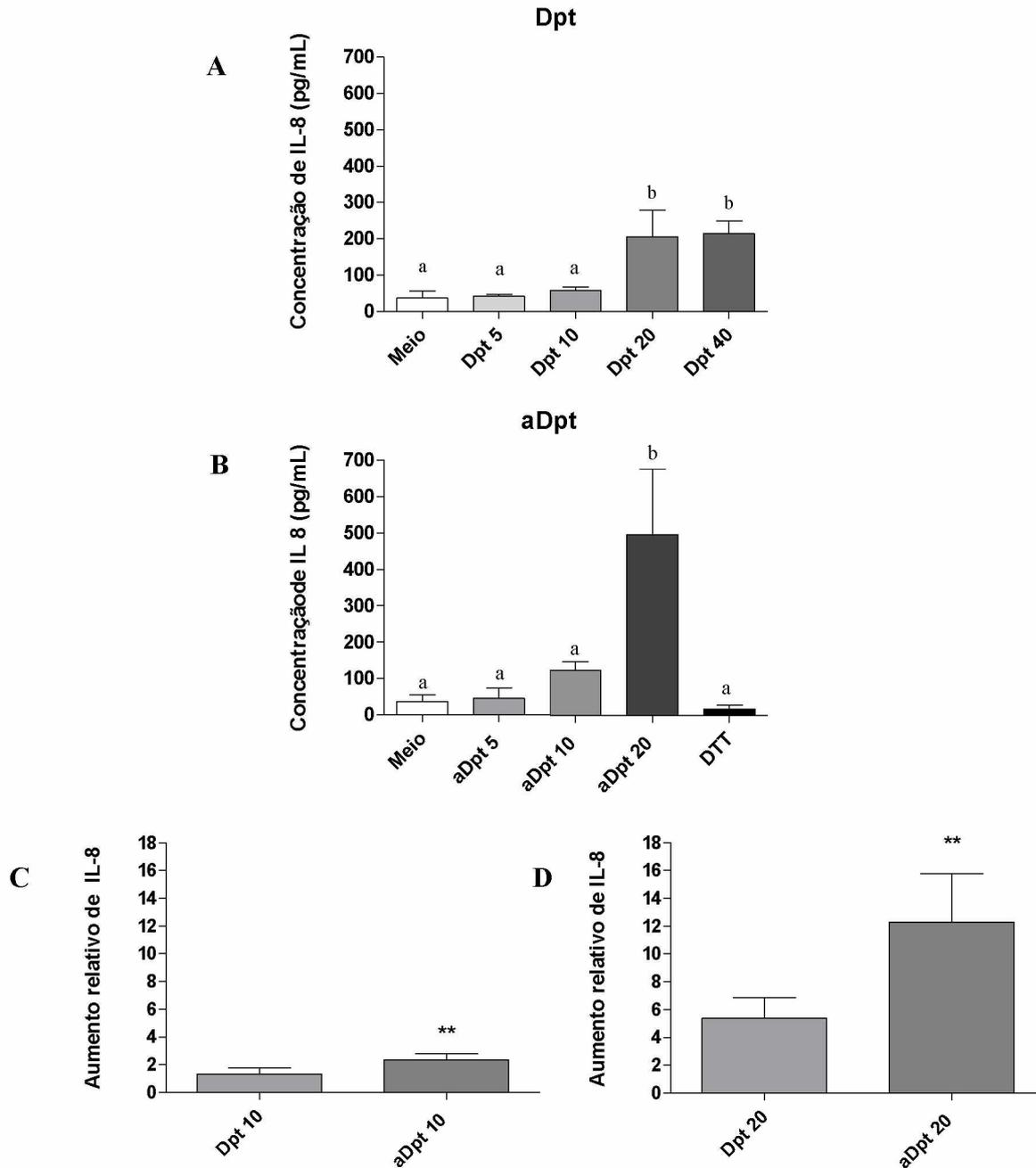
A análise do efeito das diferentes concentrações de extrato de *D. pteronyssinus* (Dpt); Dpt ativado com ditioneitol 1 mM (aDpt); 15d-PGJ2 e DTT (1 mM) sobre a viabilidade das células HaCat foi realizada utilizando o método MTT (**Fig. 1**). Alta porcentagem de células viáveis (> 95%) foi detectada após 24 horas de estimulação com 5; 10; 20 e 40 µg/mL de extrato de Dpt (**Fig. 1A**) e 5; 10; 20 µg/mL de aDpt (**Fig. 1B**). As células HaCat tratadas com DTT 1 mM (controle) também mantiveram alta viabilidade celular (88%). Observou-se alta viabilidade celular nos queratinócitos tratados com 2,5 e 5 µM de 15d-PGJ2 e uma redução gradual e significativa ( $p < 0,05$ ) da viabilidade foi detectada quando as células HaCat são tratadas com maiores concentrações de 15d-PGJ2 atingindo valores de 72% de células viáveis no tratamento com 10 µM de 15d-PGJ2 (**Fig. 1C**).



**Figura 1:** Análise da viabilidade de células HaCat por ensaio de MTT após tratamento com extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt); Dpt ativado com 1 mM ditioneitol (aDpt) e 15d-PGJ2 em diferentes concentrações. O número de células viáveis (%) foi analisado após 24 hrs de estímulo com Dpt (5; 10; 20 e 40  $\mu\text{g/mL}$ ) (A); aDpt (5; 10; 20  $\mu\text{g/mL}$ ) e DTT (1mM) para controle (B) e após 3 horas de tratamento com 15d-PGJ2 (2.5; 5 e 10  $\mu\text{M}$ ) (C). Meio DMEM incompleto foi usado como controle negativo. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. As diferenças estatisticamente significativas foram determinadas por *One way* ANOVA com teste de comparação múltipla de Bonferroni com significância para  $p < 0,05$ . Letras iguais não indicam diferença estatística entre as médias. Significância estatística indicada por letras diferentes.

## 6.2. Dpt ou aDpt induz a produção de altos níveis de IL-8 em células HaCat.

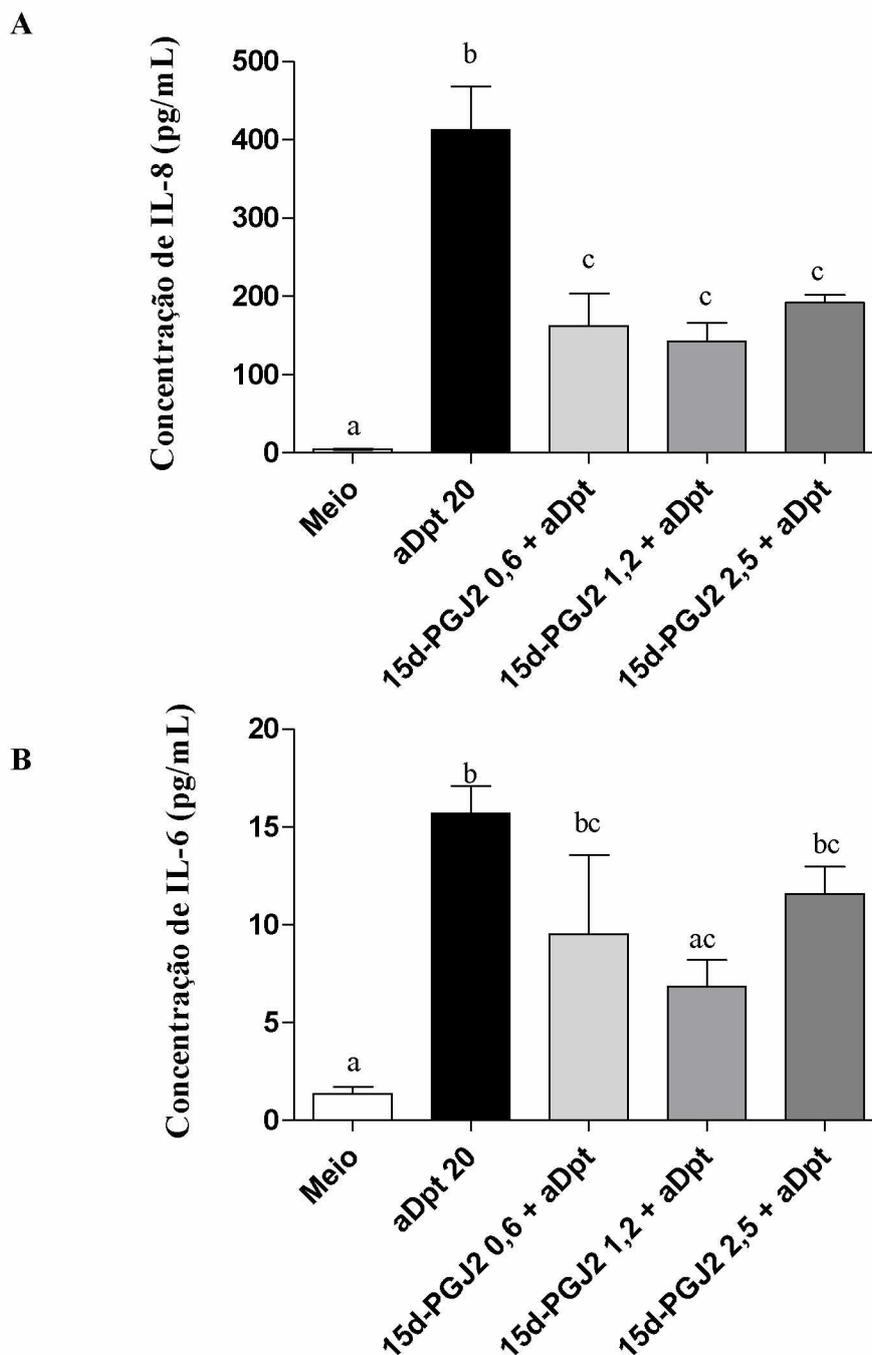
O efeito do extrato de Dpt na produção de IL-8 em células HaCat foi avaliado pelo método de ELISA sanduíche. As células HaCat produziram altos níveis de IL-8 após o estímulo com várias concentrações de Dpt (**Fig. 2A**), observamos que a produção de IL-8 ocorre de maneira dependente da dose. No entanto, não foi observado um aumento significativo na produção de IL-8 do estímulo de 20 para 40  $\mu\text{g/mL}$ . Da mesma forma, a produção de IL-8 foi intensificada após o tratamento com Dpt ativado por DTT (aDpt) (**Fig. 2B**). Comparando o aumento relativo da produção de IL-8 após estímulo com 10  $\mu\text{g/mL}$  de Dpt ou aDpt (**Fig 2C**) e 20  $\mu\text{g/mL}$  de Dpt ou aDpt (**Fig 2D**) em relação ao controle sem estímulo, observamos que aDpt é um potente indutor da produção de IL-8. Os dados mostraram que aumento relativo após estimulação dos queratinócitos com 20  $\mu\text{g/mL}$  de aDpt chega a ser 12 vezes maior que o controle sem estímulo. Com base nestes dados, definimos que a concentração de 20  $\mu\text{g/mL}$  de aDpt seria usado em ensaios subsequentes.



**Figure 2:** Produção de IL-8 em células HaCat mensurados por ELISA sanduíche após tratamento com extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) and Dpt ativado com 1 mM dithiothreitol (aDpt). As células HaCat foram incubadas com meio incompleto e estimuladas por 24 hrs com Dpt (5; 10; 20 e 40 µg/mL) (A); aDpt (5; 10; 20 µg/mL) e DTT (1mM) para controle (B). Meio DMEM incompleto foi usado como controle negativo. Comparação do aumento relativo dos níveis de IL-8 produzido por células HaCat após 24 horas de tratamento 10µg/mL (C) e 20µg/mL (D) de Dpt ou aDpt em relação ao controle negativo. Os dados são expressos como média ± desvio padrão. As diferenças estatisticamente significantes foram determinadas por *One way* ANOVA com teste de comparação múltipla de Bonferroni ou teste de Mann Whitney. Significância estatística indicada por letras diferentes  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ . Letras iguais não indicam diferença estatística entre as médias.

### 6.3 15d-PGJ2 modula a produção de citocinas pró-inflamatórias em células HaCaT.

Usando como base os dados fornecidos pelo ensaio de viabilidade celular escolhemos concentrações menores que 2,5  $\mu\text{M}$  de 15d-PGJ2 para o uso no pré-tratamento das células HaCaT. A produção de citocinas também foi avaliada em sobrenadantes de cultura de células HaCaT estimuladas com 20  $\mu\text{g/mL}$  de Dpt ativado (aDpt) durante 24 horas, pré-tratadas com 0,6, 1,2 e 2,5  $\mu\text{M}$  de 15d-PGJ2 por 3 horas (**Fig. 3**). A análise de citocinas mostrou que mesmo em baixa concentração de 15d-PGJ2 (0,6  $\mu\text{M}$ ) observamos inibição significativa ( $p < 0,001$ ) da produção de IL-8 induzida por aDpt em células de HaCaT (**Fig. 3A**), modulando a resposta ao estímulo aDpt. Observou-se ainda que o tratamento com 15d-PGJ2 apresenta uma tendência de redução da produção de IL-6 em células HaCaT, com redução significativa ( $p < 0,01$ ) dos níveis de IL-6 no pré-tratamento com 1,2  $\mu\text{M}$  de 15d-PGJ2 (**Fig. 3B**), enfatizando o perfil imunomodulador de 15d-PGJ2. Não foram detectadas nas amostras analisadas a presença das citocinas TNF, IL-1 $\beta$ , IL-10 e IL-12 frente ao estímulo de Dpt ou no pré-tratamento com 15d-PGJ2 (dados não mostrados).



**Figure 3:** Modulação da produção de citocinas em células HaCat pré-tratadas com 15d-PGJ2. As células HaCat foram previamente incubadas com diferentes concentrações de 15d-PGJ2 (0.6; 1.2 e 2.5  $\mu$ M) por 3 horas. Em seguida, as células foram estimuladas com Dpt (20 $\mu$ g/mL) ativado com 1 mM ditiotreitol (aDpt). A produção basal de células incubadas com meio DMEM incompleto foi usada como controle negativo e células HaCat tratadas apenas com aDpt foram consideradas como controle positivo. A produção das citocinas IL-8 (**A**) e IL-6 (**B**) foram mensuradas por *Cytometric Bead Array*. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. As diferenças estatisticamente significantes foram determinadas por *One way ANOVA* com teste de comparação múltipla de Bonferroni com significância para  $p < 0,05$ . Letras iguais não indicam diferença estatística entre as médias. Significância estatística indicada por letras diferentes.

## 7. DISCUSSÃO

A dermatite atópica (DA) é uma doença crônica, pruriginosa e inflamatória da pele que pode ser induzida por ácaros domésticos, como o *Dermatophagoides pteronyssinus* (SCHÄFER, 2008; WEGHOFER et al., 2008). Na DA, observa-se uma redução significativa da qualidade de vida do paciente e também o desenvolvimento de distúrbios de ansiedade e psicológicos, muitas vezes decorrentes do preconceito e até mesmo das dificuldades nas relações sociais devido aos aspectos das lesões cutâneas. Além disso, indivíduos com DA apresentam restrições à exposição ao sol e algumas condições de trabalho. O prurido, um dos sintomas da dermatite, pode levar a distúrbios do sono, que refletem a importância desta doença também sob o aspecto socioeconômico (ENK, 1997; MANCINI et al., 2008). A patogênese da DA envolve uma interação complexa entre vários fatores importantes, como susceptibilidade genética, fatores ambientais, alterações na barreira da pele e a função do sistema imunológico (KABASHIMA, 2013). Os queratinócitos participam da resposta imune da DA secretando várias citocinas e quimiocinas e também expressando vários receptores da superfície celular envolvidos em reações cutâneas inflamatórias (BAL et al., 1990; MARTEL et al., 2015; RENNE et al., 2010; RYU et al., 2015).

Alguns estudos já publicados mostram que a 15d-PGJ2, um ligante endógeno do receptor intranuclear PPAR $\gamma$ , tem efeitos anti-inflamatórios em diferentes linhagens celulares (FARNESI-DE-ASSUNÇÃO et al., 2012; NAPIMOGA et al., 2012; SURH et al., 2011). Portanto, no presente estudo avaliamos o efeito do pré-tratamento com 15d-PGJ2 na produção de citocinas inflamatórias induzidas por *Dermatophagoides pteronyssinus* em linhagem de queratinócitos humanos.

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados para avaliar a toxicidade das diferentes concentrações dos tratamentos a serem utilizados nos ensaios de células de HaCat. Os resultados mostraram que os tratamentos com Dpt e aDpt, mesmo em altas concentrações, mantiveram alta viabilidade celular (> 95%). Em contrapartida, as concentrações crescentes de 15d-PGJ2 resultaram em uma diminuição significativa na viabilidade celular. Da mesma forma, um estudo usando células papilares de carcinoma da tireóide (TPC-1) mostrou que o tratamento com concentrações abaixo de 9,3  $\mu$ M de 15d-PGJ2 não alterou significativamente a viabilidade deste tipo de célula, embora o 15d-PGJ2 tenha um potencial pró-apoptótico em altas concentrações (TRINDADE-DA-

SILVA et al., 2016). Por esse motivo, vários estudos tem sido realizados para avaliar a capacidade antitumoral de 15d-PGJ2 em linhagens celulares de câncer de mama (MUHAMMAD; MOKHTAR; YAACOB, 2016), pulmão (WANG, J.-J.; MAK, 2011), ovários (BRÄUTIGAM et al., 2011), próstata (CHAFFER et al., 2006), entre outros.

Os ácaros da poeira domiciliar pertencentes ao gênero *Dermatophagoides* (*D. farinae* e *D. pteronyssinus*) são os principais aeroalérgenos associados à ocorrência de doenças alérgicas, incluindo dermatite atópica (PLATTS-MILLS; CHAPMAN, 1987). Os alérgenos Der f 1 e Der p 1, oriundos de ácaros da poeira, fazem parte da família de cisteína-proteases cuja atividade proteolítica está associada à patogênese de algumas alergias por: (i) facilitar a passagem de alérgenos através da barreira epitelial; (ii) clivar e/ou interagir com inibidores intrínsecos de proteases e (iii) modular a função de vários tipos celulares através da clivagem de moléculas de superfície celular (OGAWA et al., 2007). Além disso, *D. pteronyssinus* estimula as células do tecido epitelial a produzirem citocinas e quimiocinas importantes para o desenvolvimento da DA. No entanto, a atividade de cisteína-protease do Dpt pode ser inativada pela oxidação do grupo catalítico tiol no processo de armazenamento ou purificação do alérgeno, mas essa atividade proteolítica pode ser regenerada através do tratamento com agentes redutores tais como ditioneitol (OGAWA et al., 2007).

Em colaboração com esses dados, nossos ensaios mostraram que as células HaCat estimuladas por Dpt produziram níveis de IL-8 de forma dependente da dose e a ativação do Dpt com agente redutor DTT (aDpt) potencializou a indução da produção de IL-8. Estudos realizados com células epiteliais estimuladas com a cisteína-protease Der p 1 e serina-proteases Der p 3 e Der p 9 também mostraram elevação da produção de IL-8 e outras citocinas pró-inflamatórias por meio da ativação da via de sinalização PAR-2 (ASOKANANTHAN et al., 2002; KING et al., 1998; SUN et al., 2001). No entanto, Kita e colaboradores (2003 e 2004) sugeriram que os eosinófilos respondem a cisteína-protease através de um receptor de protease antibacteriano (MIKE; KITA, 2003; REED; KITA, 2004). Portanto, para assegurar que a resposta imune de queratinócitos na produção de IL-8 ocorre através da ativação de PAR-2 ou outras moléculas alvo, novos estudos precisam ser realizados.

A demonstração da atividade proteolítica de Der p 1 e Der f 1 estimulando a produção de IL-8 em queratinócitos primários e em células HaCat já foi anteriormente

descrita (KATO et al., 2005; OGAWA et al., 2007). Kato e colaboradores (2005) mostraram que Cistatina A está abundantemente presente na pele humana, bloqueando as atividades proteolíticas de cisteína-proteases de ácaros, em condições fisiológicas normais da pele. No entanto, pacientes com DA apresentam disfunção da barreira epitelial proveniente das lesões, diminuindo a presença de alguns inibidores como a Cistatina A e, conseqüentemente, facilitando a atividade proteolítica dos alérgenos do Grupo 1 (Der f 1 e Der p 1) na patogênese da DA (KATO et al., 2005). Reforçando os dados encontrados pelo nosso grupo, os trabalhos precedentes mostram que a atividade proteolítica de Dpt pode estar envolvida na sensibilização através da pele, reduzindo a função físico-química de barreira da pele, fornecendo uma porta de entrada para alérgenos e irritantes que, conseqüentemente, estimulam os queratinócitos a produzirem IL-8, contribuindo para a iniciação e manutenção da inflamação cutânea.

No presente estudo, o pré-tratamento de células de HaCat com 15d-PGJ2 demonstrou uma diminuição da produção de IL-8 induzida por aDpt. Um trabalho anterior demonstrou que o tratamento com 15d-PGJ2 induziu um aumento na produção de IL-8 nos queratinócitos primários (KIM, Y. I. et al., 2011). Neste estudo, os autores apenas avaliaram o papel da 15d-PGJ2 nos queratinócitos primários isolados sem considerar a influência dos alérgenos neste microambiente. A comparação do mecanismo fisiopatológico da resposta imune entre as linhagens celulares de queratinócitos humanos (primário e HaCat) tem limitações oriundas das diferenças nos perfis de expressão gênica dos marcadores de diferenciação e também dos fatores relacionados à transcrição de genes associados ao estrato córneo, como filagrina, loricrina, involucrina e queratina (SEO et al., 2012). Alguns estudos publicados mostram que os ligantes de PPAR, como o 15d-PGJ2, diminuem a expressão de TLR2 na superfície de queratinócitos primários (KIM, Y. I. et al., 2011) e TLR4, e só é observado nas células de HaCat, sugerindo que a expressão de alguns receptores depende da diferenciação celular (KÖLLISCH et al., 2005; PIVARCSI et al., 2004). Curiosamente, as células epiteliais intestinais tratadas com 15d-PGJ2 reduzem a inflamação ao diminuir os níveis de mRNA para TLR4 (EUN et al., 2006).

A IL-8 é um membro da família de quimiocinas CXC e está associada ao recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório (BAGGIOLINI, 1998). A produção de IL-8 pode ser induzida por uma série de citocinas pró-inflamatórias, produtos virais, bacterianos ou estresse celular. A síntese de IL-8 pode ser controlada a nível

transcricional ou pós-transcricional através das vias de transdução de sinal NF- $\kappa$ B, Erk e JNK que regulam a atividade do promotor de IL-8, sendo que p38 MAPK rege a síntese de IL-8 a nível de mRNA. Após a estimulação, I $\kappa$ B torna-se fosforilado sendo direcionado ao proteossoma, permitindo que NF- $\kappa$ B se transloque para o núcleo. Em última análise, a atividade de transcrição induzida por NF- $\kappa$ B aumentada também pode requerer fosforilação das subunidades NF- $\kappa$ B, bem como a ligação de co-ativadores (SCHMITZ; BACHER; KRACHT, 2001).

Um trabalho também desenvolvido com células HaCat, mostrou que IL-4 inibe a expressão de mRNA para IL-8 induzida por TNF $\alpha$ . Mostrou ainda que a regulação pode ocorrer a nível de transcrição e envolve a via JAK/STAT6. A regulação negativa da atividade do promotor de IL-8 ocorre parcialmente através da inibição da atividade transcricional NF- $\kappa$ B sem afetar a translocação nuclear (RAINGEAUD; PIERRE, 2005). Esses achados sugerem que 15d-PGJ2 pode estar inibindo a produção de IL-8 mediada por Dpt, através do estímulo da produção de IL-4, no entanto mais estudos devem ser realizados para avaliar qual é o mecanismo associado ao efeito imunomodulador da 15d-PGJ2 na produção de IL-8 em células HaCat.

Os nossos experimentos também mostraram que o tratamento prévio com 15d-PGJ2 apresenta uma tendência de redução dos níveis de produção de IL-6 induzida por Dpt em células HaCat corroborando com os dados de Trindade-da-Silva e colaboradores (TRINDADE-DA-SILVA et al., 2016), que documentaram a redução da expressão dos níveis de mRNA para IL-6 após o tratamento com 15d-PGJ2 em células TCP1. Os efeitos anti-inflamatórios da ativação de PPAR $\gamma$  em macrófagos já foram demonstrados em vários estudos (RICOTE, M. et al., 1998; VALLEDOR; RICOTE, 2004). Na presença de 15d-PGJ2 ou tiazolidinedionas, a secreção de vários mediadores inflamatórios, como por exemplo, IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  são inibidos, bem como a produção de óxido nítrico sintase-induzível (iNOS). Além disso, outro trabalho mostra que o tratamento com 15d-PGJ2 inibe a produção de IL-10 e IL-12 em macrófagos (AZUMA et al., 2001).

Corroborando com os dados já registrados em macrófagos, as nossas análises mostraram que o pré-tratamento com 15d-PGJ2 em células HaCat não induziu níveis significativos das citocinas TNF, IL1 $\beta$ , IL-10 e IL-12. Sabe-se que em linhagem de monócitos/macrófagos, a IL-4 exibe propriedades anti-inflamatórias, por exemplo,

inibindo a produção de IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL-10 induzida por LPS (D'ANDREA et al., 1995). Em células HaCat, IL-4 e IL-13 inibem a produção de TNF $\alpha$ , contribuindo parcialmente para manter o equilíbrio Th1/ Th2 em doenças inflamatórias como DA (XIAO et al., 2003).

O tratamento com 15d-PGJ2 reduz significativamente a migração de eosinófilos para a cavidade peritoneal, reduzindo a eosinopoiase. Os agonistas de PPAR- $\gamma$  principalmente 15d-PGJ2, têm apresentado eficácia terapêutica em doenças induzidas por eosinófilos como um mecanismo de controle alternativo, via IL-23 / IL-17 e IL-33 (FARNESI-DE-ASSUNÇÃO et al., 2012).

Conforme os dados apresentados, os estudos com 15d-PGJ2, agonista de PPAR $\gamma$ , mostraram ser bastante promissores e podem contribuir para compreender melhor a resposta imune na indução de DA *in vitro* bem como avaliar a capacidade de 15d-PGJ2 em modular a resposta imunológica em resposta a DA, permitindo sua posterior utilização no desenvolvimento de novas terapias para a doença.

## 8. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste estudo conclui-se que:

- Foi possível estabelecer um modelo *in vitro* de ativação queratinócitos induzida por alérgenos do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*, utilizando células HaCat.
- As concentrações usadas nos ensaios com estímulos com extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus* ativado ou não por ditiotreitol e no pré-tratamento com 15d-PGJ2 não foram tóxicos para as células HaCat.
- As células HaCat ativadas com o extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus*, secretam altos níveis de IL-8, de maneira dose-dependente, sugerindo que os queratinócitos podem participar ativamente da imunoregulação do processo inflamatório na dermatite atópica.
- A produção de IL-8 em células HaCat é potencializada através da utilização do extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus* ativado por ditiotreitol.
- Células HaCat estimuladas com extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus* ativado por ditiotreitol produzem altos níveis de citocinas pró inflamatórias como IL-6 e IL-8 mas não produzem TNF, IL-1 $\beta$ , IL-10 e IL-12.
- O pré-tratamento com 15d-PGJ2 promove redução da produção de IL-6 e IL-8 secretadas pelas células HaCat estimuladas com o extrato *Dermatophagoides pteronyssinus*, ativado por ditiotreitol, permitindo sua posterior utilização no desenvolvimento de novas terapias para a doença.

Dado o exposto, rejeita-se a hipótese H0 e admite-se a hipótese H1 confirmando que o pré-tratamento com 15d-PGJ2 reduziu significativamente a produção de citocinas inflamatórias, IL-6 e IL-8, induzidas por alérgenos do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* em linhagem de queratinócitos humanos.

## 9. REFERÊNCIAS

ADDOR, F. A. et al. Atopic dermatitis: correlation between non-damaged skin barrier function and disease activity. **Int J Dermatol**, v. 51, n. 6, p. 672-6, 2012.

AHMAD-NEJAD, P. et al. The Toll-like receptor 2 R753Q polymorphism defines a subgroup of patients with atopic dermatitis having severe phenotype. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 113, n. 3, p. 565-567, 2004.

AKDIS, M.; BLASER, K.; AKDIS, C. A. T regulatory cells in allergy: Novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 116, n. 5, p. 961-968, 2005.

ALBANESI, C. et al. Keratinocytes in inflammatory skin diseases. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v. 4, n. 3, p. 329-34, 2005.

ANDO, T. et al. Mast Cells Are Required for Full Expression of Allergen/SEB-Induced Skin Inflammation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 12, p. 2695-2705, 2013.

ANGELI, V. et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  Inhibits the Migration of Dendritic Cells: Consequences for the Immune Response. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 10, p. 5295-5301, 2003.

ASOKANANTHAN, N. et al. House dust mite allergens induce proinflammatory cytokines from respiratory epithelial cells: the cysteine protease allergen, Der p 1, activates protease-activated receptor (PAR)-2 and inactivates PAR-1. **J Immunol**, v. 169, n. 8, p. 4572-8, 2002.

AZUMA, Y. et al. 15-Deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2) inhibits IL-10 and IL-12 production by macrophages. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 283, n. 2, p. 344-6, 2001.

BAGGIOLINI, M. Chemokines and leukocyte traffic. **Nature**, v. 392, n. 6676, p. 565-568, 1998.

BAL, V. et al. Antigen presentation by keratinocytes induces tolerance in human T cells. **Eur J Immunol**, v. 20, n. 9, p. 1893-7, 1990.

BATISTA, D. I. et al. Profile of skin barrier proteins (filaggrin, claudins 1 and 4) and Th1/Th2/Th17 cytokines in adults with atopic dermatitis. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 29, n. 6, p. 1091-5, 2015.

BEATTIE, P. E.; LEWIS-JONES. A comparative study of impairment of quality of life in children with skin disease and children with other chronic childhood diseases. **British Journal of Dermatology**, v. 155, n. 1, p. 145-151, 2006.

BERNARD, M. et al. IL-1beta induces thymic stromal lymphopoietin and an atopic dermatitis-like phenotype in reconstructed healthy human epidermis. **J Pathol**, 2017.

BIANCHI, P. et al. Analysis of Gene Expression in Atopic Dermatitis Using a Microabrasive Method. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 2, p. 469-472, 2011.

BIEBER, T. Atopic dermatitis. **Ann Dermatol**, v. 22, n. 2, p. 125-37, May 2010.

BOGUNIEWICZ, M. et al. A multiple-domain framework of clinical, economic, and patient-reported outcomes for evaluating benefits of intervention in atopic dermatitis. **Journal of drugs in dermatology: JDD**, v. 6, n. 4, p. 416-423, 2007.

BOGUNIEWICZ, M.; LEUNG, D. Y. Recent insights into atopic dermatitis and implications for management of infectious complications. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, n. 1, p. 4-13; quiz 14-5, 2010.

BOUKAMP, P. et al. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. **The Journal of cell biology**, v. 106, n. 3, p. 761-771, 1988.

BRÄUTIGAM, K. et al. Combined treatment with TRAIL and PPAR $\gamma$  ligands overcomes chemoresistance of ovarian cancer cell lines. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 137, n. 5, p. 875-886, 2011.

CHAFFER, C. L. et al. PPAR $\gamma$ -independent induction of growth arrest and apoptosis in prostate and bladder carcinoma. **BMC Cancer**, v. 6, n. 1, p. 53, 2006.

CHAWLA, A. et al. PPAR-[gamma] dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. **Nat Med**, v. 7, n. 1, p. 48-52, 2001.

CHAWLA, A. et al. Nuclear Receptors and Lipid Physiology: Opening the X-Files. **Science**, v. 294, n. 5548, p. 1866-1870, 2001.

CHONG, H. et al. Regulation of epithelial–mesenchymal IL-1 signaling by PPAR $\beta/\delta$  is essential for skin homeostasis and wound healing. **The Journal of Cell Biology**, v. 184, n. 6, p. 817-831, 2009.

CHORRO, L. et al. Langerhans cell (LC) proliferation mediates neonatal development, homeostasis, and inflammation-associated expansion of the epidermal LC network. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 13, p. 3089-3100, 2009.

CLARK, R. B. et al. The Nuclear Receptor PPAR $\gamma$  and Immunoregulation: PPAR $\gamma$  Mediates Inhibition of Helper T Cell Responses. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 3, p. 1364-1371, 2000.

COULOMBE, P. A. Wound Epithelialization: Accelerating the Pace of Discovery. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 121, n. 2, p. 219-230, 2003.

D'ANDREA, A. et al. Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor alpha production. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 181, n. 2, p. 537-546, 1995.

DAI, X. et al. Mite allergen is a danger signal for the skin via activation of inflammasome in keratinocytes. **J Allergy Clin Immunol**, v. 127, n. 3, p. 806-14 e1-4, 2011.

DANSO, M. O. et al. TNF-alpha and Th2 cytokines induce atopic dermatitis-like features on epidermal differentiation proteins and stratum corneum lipids in human skin equivalents. **J Invest Dermatol**, v. 134, n. 7, p. 1941-50, 2014.

DASU, M. R. et al. Pioglitazone Inhibits Toll-Like Receptor Expression and Activity in Human Monocytes and db/db Mice. **Endocrinology**, v. 150, n. 8, p. 3457-3464, 2009.

DAVIS, B. K.; WEN, H.; TING, J. P. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. **Annu Rev Immunol**, v. 29, p. 707-35, 2011.

DAYNES, R. A.; JONES, D. C. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 10, p. 748-759, 2002.

DE BENEDETTO, A. et al. Atopic dermatitis: a disease caused by innate immune defects? **J Invest Dermatol**, v. 129, n. 1, p. 14-30, 2009.

DI CESARE, A.; DI MEGLIO, P.; NESTLE, F. O. A role for Th17 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis? **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, n. 11, p. 2569-2571, 2008.

DUBRAC, S. et al. Lack of IL-2 in PPAR- $\alpha$ -deficient mice triggers allergic contact dermatitis by affecting regulatory T cells. **European Journal of Immunology**, v. 41, n. 7, p. 1980-1991, 2011.

DUBRAC, S.; SCHMUTH, M. PPAR-alpha in cutaneous inflammation. **Dermato-Endocrinology**, v. 3, n. 1, p. 22-25, 2011.

DUBRAC, S. et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\alpha$  Activation Inhibits Langerhans Cell Function. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 7, p. 4362-4372, 2007.

EASTHAM, L. L.; MILLS, C. N.; NILES, R. M. PPAR $\alpha/\gamma$  Expression and Activity in Mouse and Human Melanocytes and Melanoma Cells. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 6, p. 1327-1333, 2008.

EGAWA, G.; KABASHIMA, K. Skin as a peripheral lymphoid organ: revisiting the concept of skin-associated lymphoid tissues. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, n. 11, p. 2178-2185, 2011.

ELIAS, P. M.; FEINGOLD, K. R. Lipids and the epidermal water barrier: metabolism, regulation, and pathophysiology. **Semin Dermatol**, v. 11, n. 2, p. 176-82, 1992.

ENK, A. H. Allergic contact dermatitis: understanding the immune response and potential for targeted therapy using cytokines. **Mol Med Today**, v. 3, n. 10, p. 423-8, 1997.

EUN, C. S. et al. Attenuation of Colonic Inflammation by PPAR $\gamma$  in Intestinal Epithelial Cells: Effect on Toll-like Receptor Pathway. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 51, n. 4, p. 693-697, 2006.

EYERICH, K. et al. IL-17 in atopic eczema: Linking allergen-specific adaptive and microbial-triggered innate immune response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, n. 1, p. 59-660000, 2009.

FARNESI-DE-ASSUNÇÃO, T. S. et al. PPAR- $\gamma$  agonists, mainly 15d-PGJ2, reduce eosinophil recruitment following allergen challenge. **Cellular Immunology**, v. 273, n. 1, p. 23-29, 2012.

FORMAN, B. M. et al. 15-deoxy- $\Delta$ 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR $\gamma$ . **Cell**, v. 83, n. 5, p. 803-812, 1995.

FRANZ, B. et al. Low number of regulatory T cells in skin lesions of patients with cutaneous lupus erythematosus. **Arthritis & Rheumatism**, v. 56, n. 6, p. 1910-1920, 2007.

FU, Y.; LUO, N.; LOPES-VIRELLA, M. F. Upregulation of interleukin-8 expression by prostaglandin D2 metabolite 15-deoxy-delta12, 14 prostaglandin J2 (15d-PGJ2) in human THP-1 macrophages. **Atherosclerosis**, v. 160, n. 1, p. 11-20, 2002.

FUJITA, H. et al. Lesional dendritic cells in patients with chronic atopic dermatitis and psoriasis exhibit parallel ability to activate T-cell subsets. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 128, n. 3, p. 574-582.e12, 2011.

GILROY, D. W. et al. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. **Nature medicine**, v. 5, n. 6, p. 698-701, 1999.

GITTLER, J. K. et al. Progressive activation of TH2/TH22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 130, n. 6, p. 1344-1354, 2012.

GLASS, C. K.; SAIJO, K. Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 5, p. 365-376, 2010.

GREWE, M. et al. Analysis of the cytokine pattern expressed in situ in inhalant allergen patch test reactions of atopic dermatitis patients. **Journal of investigative dermatology**, v. 105, n. 3, p. 407-410, 1995.

GROS, E. et al. Expression of chemokines and chemokine receptors in lesional and nonlesional upper skin of patients with atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 124, n. 4, p. 753-760.e1, 2009.

GROS, E. et al. Reduced IFN- $\gamma$  receptor expression and attenuated IFN- $\gamma$  response by dendritic cells in patients with atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 128, n. 5, p. 1015-1021, 2011.

HAMILTON, J. D. et al. Dupilumab improves the molecular signature in skin of patients with moderate-to-severe atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 134, n. 6, p. 1293-1300, 2014.

HAMMAD, H. et al. Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma; in Dendritic Cells Inhibits the Development of Eosinophilic Airway Inflammation in a Mouse Model of Asthma. **The American Journal of Pathology**, v. 164, n. 1, p. 263-271, 2004.

HARMON, G. S.; LAM, M. T.; GLASS, C. K. PPARs and Lipid Ligands in Inflammation and Metabolism. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 6321-6340, 2011.

HARRIS, S. G.; PHIPPS, R. P. The nuclear receptor PPAR gamma is expressed by mouse T lymphocytes and PPAR gamma agonists induce apoptosis. **European Journal of Immunology**, v. 31, n. 4, p. 1098-1105, 2001.

HASANNEJAD, H. et al. Selective impairment of Toll-like receptor 2-mediated proinflammatory cytokine production by monocytes from patients with atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 120, n. 1, p. 69-75, 2007.

HASHIMOTO, D. et al. Tissue-Resident Macrophages Self-Maintain Locally throughout Adult Life with Minimal Contribution from Circulating Monocytes. **Immunity**, v. 38, n. 4, p. 792-804, 2013.

HONDA, K. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma; is expressed in airways and inhibits features of airway remodeling in a mouse asthma model. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 113, n. 5, p. 882-888, 2004.

HONDA, T. et al. Update of Immune Events in the Murine Contact Hypersensitivity Model: Toward the Understanding of Allergic Contact Dermatitis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 2, p. 303-315, 2012.

HOWELL, M. D. et al. Th2 Cytokines Act on S100/A11 to Downregulate Keratinocyte Differentiation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, n. 9, p. 2248-2258, 2008.

HOWELL, M. D. et al. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. **J Allergy Clin Immunol**, v. 120, n. 1, p. 150-5, 2007.

HVID, M. et al. IL-25 in atopic dermatitis: a possible link between inflammation and skin barrier dysfunction? **J Invest Dermatol**, v. 131, n. 1, p. 150-7, 2011.

ICRE, G.; WAHLI, W.; MICHALIK, L. Functions of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)  $\alpha$  and  $\beta$  in Skin Homeostasis, Epithelial Repair, and Morphogenesis. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 11, n. 1, p. 30-35, 2006.

IMAI, Y. et al. Skin-specific expression of IL-33 activates group 2 innate lymphoid cells and elicits atopic dermatitis-like inflammation in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 34, p. 13921-6, 2013.

JANSSENS, M. et al. Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients. **Journal of Lipid Research**, v. 53, n. 12, p. 2755-2766, 2012.

JIANG, C.; TING, A. T.; SEED, B. PPAR- $\gamma$  agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. **Nature**, v. 391, n. 6662, p. 82-86, 1998.

JOHANSSON, O. et al. Langerhans cells in prurigo nodularis investigated by HLA-DR and S-100 immunofluorescence double staining. **Journal of Dermatological Science**, v. 17, n. 1, p. 24-32, 1998.

JONES, D. C.; DING, X.; DAYNES, R. A. Nuclear Receptor Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) Is Expressed in Resting Murine Lymphocytes THE PPAR $\alpha$  IN T AND B LYMPHOCYTES IS BOTH TRANSACTIVATION AND TRANSREPRESSION COMPETENT. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 9, p. 6838-6845, 2002.

JONES, D. C. et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha$  Negatively Regulates T-bet Transcription Through Suppression of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 1, p. 196-203, 2003.

KABASHIMA, K. New concept of the pathogenesis of atopic dermatitis: interplay among the barrier, allergy, and pruritus as a trinity. **J Dermatol Sci**, v. 70, n. 1, p. 3-11, 2013.

KABESCH, M. et al. Association between polymorphisms in caspase recruitment domain containing protein 15 and allergy in two German populations. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 4, p. 813-817, 2003.

KATO, T. et al. Cystatin A inhibits IL-8 production by keratinocytes stimulated with Der p 1 and Der f 1: Biochemical skin barrier against mite cysteine proteases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 116, n. 1, p. 169-176, 2005.

KAWASAKI, H. et al. Altered stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin-null mice. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 129, n. 6, p. 1538-1546, 2012.

KELLY, D. et al. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR- $\gamma$  and RelA. **Nat Immunol**, v. 5, n. 1, p. 104-112, 2004.

KEZIC, S. et al. Filaggrin loss-of-function mutations are associated with enhanced expression of IL-1 cytokines in the stratum corneum of patients with atopic dermatitis and in a murine model of filaggrin deficiency. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 129, n. 4, p. 1031-1039, 2012.

KIEHL, P. et al. Tissue eosinophilia in acute and chronic atopic dermatitis: a morphometric approach using quantitative image analysis of immunostaining. **British Journal of Dermatology**, v. 145, n. 5, p. 720-729, 2001.

KIM, S. et al. IL-31 Serum Protein and Tissue mRNA Levels in Patients with Atopic Dermatitis. **Annals of Dermatology**, v. 23, n. 4, p. 468-473, 2011.

KIM, Y. I. et al. Effects of 15-deoxy-(1)(2),(1)(4)-prostaglandin J(2) on the production of IL-8 and the expression of Toll-like receptor 2 in human primary keratinocytes stimulated with lipopolysaccharide. **Mol Biol Rep**, v. 38, n. 5, p. 3207-12, 2011.

KING, C. et al. Dust Mite Proteolytic Allergens Induce Cytokine Release from Cultured Airway Epithelium. **The Journal of Immunology**, v. 161, n. 7, p. 3645-3651, 1998.

KINOSHITA, H. et al. Cytokine milieu modulates release of thymic stromal lymphopoietin from human keratinocytes stimulated with double-stranded RNA. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, n. 1, p. 179-186, 2009.

KLIEWER, S. A. et al. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and promotes adipocyte differentiation. **Cell**, v. 83, n. 5, p. 813-819, 1995.

KLOTZ, L. et al. The nuclear receptor PPAR $\gamma$  selectively inhibits Th17 differentiation in a T cell-intrinsic fashion and suppresses CNS autoimmunity. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 10, p. 2079-2089, 2009.

KOGA, C. et al. Possible pathogenic role of Th17 cells for atopic dermatitis. **J Invest Dermatol**, v. 128, n. 11, p. 2625-30, 2008.

KÖLLISCH, G. et al. Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes. **Immunology**, v. 114, n. 4, p. 531-541, 2005.

KUMMER, A. J. et al. Inflammasome Components NALP 1 and 3 Show Distinct but Separate Expression Profiles in Human Tissues Suggesting a Site-specific Role in the Inflammatory Response. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 55, n. 5, p. 443-452, 2007.

KUO, I. H. et al. The cutaneous innate immune response in patients with atopic dermatitis. **J Allergy Clin Immunol**, v. 131, n. 2, p. 266-78, 2013.

LANDHEER, J. et al. Epicutaneous application of house dust mite induces thymic stromal lymphopoietin in nonlesional skin of patients with atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, n. 5, p. 1252-1254, 2013.

LEE, C.-H. et al. Transcriptional Repression of Atherogenic Inflammation: Modulation by PPAR $\delta$ . **Science**, v. 302, n. 5644, p. 453-457, 2003.

LEI, J. et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha$  and  $\gamma$  Agonists Together with TGF- $\beta$  Convert Human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T Cells into Functional Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 12, p. 7186-7198, 2010.

LEUNG, D. New concepts in the pathogenesis of atopic dermatitis. **Current Opinion in Immunology**, v. 15, n. 6, p. 634-638, 2003.

LEUNG, D. Y. Pathogenesis of atopic dermatitis. **J Allergy Clin Immunol**, v. 104, n. 3 Pt 2, p. S99-108, 1999.

LEUNG, D.Y. New insights into atopic dermatitis: role of skin barrier and immune dysregulation. **Allergol Int**, v. 62, n. 2, p. 151-61, 2013.

LEUNG, D. Y. M. et al. New insights into atopic dermatitis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 5, p. 651-657, 2004.

MAN, M.-Q. et al. Basis for Improved Permeability Barrier Homeostasis Induced by PPAR and LXR Activators: Liposensors Stimulate Lipid Synthesis, Lamellar Body Secretion, and Post-Secretory Lipid Processing. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, n. 2, p. 386-392, 2006.

MANCINI, A. J.; KAULBACK, K.; CHAMLIN, S. L. The Socioeconomic Impact of Atopic Dermatitis in the United States: A Systematic Review. **Pediatric Dermatology**, v. 25, n. 1, p. 1-6, 2008.

MAO-QIANG, M. et al. Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor (PPAR)- $\gamma$  Activation Stimulates Keratinocyte Differentiation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 123, n. 2, p. 305-312, 2004.

MARTEL, B. C. et al. Human Atopic Dermatitis Skin-derived T Cells can Induce a Reaction in Mouse Keratinocytes in vivo. **Scandinavian journal of immunology**, v. 82, n. 2, p. 125-134, 2015.

MASHIKO, S. et al. Human mast cells are major IL-22 producers in patients with psoriasis and atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 136, n. 2, p. 351-359.e1, 2015.

MICHALIK, L. et al. Impaired skin wound healing in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) $\alpha$  and PPAR $\beta$  mutant mice. **The Journal of Cell Biology**, v. 154, n. 4, p. 799-814, 2001.

MICHALIK, L.; WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in skin health, repair and disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1771, n. 8, p. 991-998, 2007.

MIIKE, S.; KITA, H. Human eosinophils are activated by cysteine proteases and release inflammatory mediators. **J Allergy Clin Immunol**, v. 111, n. 4, p. 704-13, 2003.

MORIZANE, S. et al. TH2 cytokines increase kallikrein 7 expression and function in patients with atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 130, n. 1, p. 259-2610, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MRABET-DAHBI, S. et al. The Toll-like receptor 2 R753Q mutation modifies cytokine production and Toll-like receptor expression in atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 121, n. 4, p. 1013-1019, 2008.

MUHAMMAD, S. N. H.; MOKHTAR, N. F.; YAACOB, N. S. 15d-PGJ2 Induces Apoptosis of MCF-7 and MDA-MB-231 Cells via Increased Intracellular Calcium and Activation of Caspases, Independent of ER and ER. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 17, n. 7, p. 3223-3228, 2016.

NAKAJIMA, S. et al. IL-17A as an Inducer for Th2 Immune Responses in Murine Atopic Dermatitis Models. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 8, p. 2122-2130, 2014.

NAKAMURA, Y. et al. Staphylococcus  $\delta$ -toxin induces allergic skin disease by activating mast cells. **Nature**, v. 503, n. 7476, p. 397-401, 2013.

NAPIMOGA, M. H. et al. Exogenous administration of 15d-PGJ2-loaded nanocapsules inhibits bone resorption in a mouse periodontitis model. **J Immunol**, v. 189, n. 2, p. 1043-52, Jul 15 2012.

NICKOLOFF, B. J.; TURKA, L. A. Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes. **Immunol Today**, v. 15, n. 10, p. 464-9, 1994.

NIEBUHR, M. et al. Dysregulation of toll-like receptor-2 (TLR-2)-induced effects in monocytes from patients with atopic dermatitis: impact of the TLR-2 R753Q polymorphism. **Allergy**, v. 63, n. 6, p. 728-734, 2008.

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, n. 6, p. 3262-3269, 2003.

NORAZMI, M. et al. The Modulation of PPAR $\gamma$ 1 and PPAR $\gamma$ 2 mRNA Expression by Ciglitazone in CD3/CD28-Activated Naïve and Memory CD4<sup>+</sup> T Cells. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 849195, 2012.

NOVAK, N. New insights into the mechanism and management of allergic diseases: atopic dermatitis. **Allergy**, v. 64, n. 2, p. 265-75, 2009.

NOVAK, N. An update on the role of human dendritic cells in patients with atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 129, n. 4, p. 879-886, 2012.

NOVAK, N.; BIEBER, T.; LEUNG, D. Y. Immune mechanisms leading to atopic dermatitis. **J Allergy Clin Immunol**, v. 112, n. 6 Suppl, p. S128-39, 2003.

NUTAN, F. N.; KANWAR, A. J.; PARSAD, D. The effect of topically applied corticosteroids on interleukin 1beta levels in patients with atopic dermatitis. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 26, n. 8, p. 1020-2, 2012.

O'REGAN, G. M. et al. Filaggrin in atopic dermatitis. **J Allergy Clin Immunol**, v. 124, n. 3 Suppl 2, p. R2-6, 2009.

ODHIAMBO, J. A. et al. Global variations in prevalence of eczema symptoms in children from ISAAC Phase Three. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 124, n. 6, p. 1251, 2009.

OGAWA, T. et al. Upregulation of the Release of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor from Keratinocytes Stimulated with Cysteine Protease Activity of Recombinant Major Mite Allergens, Der f 1 and Der p 1. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 146, n. 1, p. 27-35, 2007.

ONOUE, A. et al. Induction of eosinophil- and Th2-attracting epidermal chemokines and cutaneous late-phase reaction in tape-stripped skin. **Experimental Dermatology**, v. 18, n. 12, p. 1036-1043, 2009.

ORFALI, R. L. et al. Atopic dermatitis in adults: clinical and epidemiological considerations. **Revista da Associação Médica Brasileira (English Edition)**, v. 59, n. 3, p. 270-275, 2013/01/01 2013.

OTSUKA, A.; KABASHIMA, K. Mast cells and basophils in cutaneous immune responses. **Allergy**, v. 70, n. 2, p. 131-140, 2015.

OU, L. S. et al. T regulatory cells in atopic dermatitis and subversion of their activity by superantigens. **J Allergy Clin Immunol**, v. 113, n. 4, p. 756-63, 2004.

PASTORE, S.; MASCIA, F.; GIROLOMONI, G. The contribution of keratinocytes to the pathogenesis of atopic dermatitis. **Eur J Dermatol**, v. 16, n. 2, p. 125-31, 2006.

PENG, W.; NOVAK, N. Pathogenesis of atopic dermatitis. **Clin Exp Allergy**, v. 45, n. 3, p. 566-74, 2015.

PENG, W. M. et al. Attenuated TGF- $\beta$ 1 responsiveness of dendritic cells and their precursors in atopic dermatitis. **European Journal of Immunology**, v. 43, n. 5, p. 1374-1382, 2013.

PEREIRA, E. A. et al. IgE, IgG1, and IgG4 antibody responses to *Blomia tropicalis* in atopic patients. **Allergy**, v. 60, n. 3, p. 401-6, 2005.

PIVARCSI, A. et al. Differentiation-regulated expression of Toll-like receptors 2 and 4 in HaCaT keratinocytes. **Archives of Dermatological Research**, v. 296, n. 3, p. 120-124, 2004.

PLATTS-MILLS, T. A.; CHAPMAN, M. D. Dust mites: immunology, allergic disease, and environmental control. **J Allergy Clin Immunol**, v. 80, n. 6, p. 755-75, 1987.

RADINA, K.; WALTER, W.; LILIANE, M. PPARs in Diseases: Control Mechanisms of Inflammation. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 25, p. 2995-3009, 2005.

RAINGEAUD, J.; PIERRE, J. Interleukin-4 downregulates TNF $\alpha$ -induced IL-8 production in keratinocytes. **FEBS Letters**, v. 579, n. 18, p. 3953-3959, 2005.

RAY, D. M. et al. CD40 Engagement Prevents Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  Agonist-Induced Apoptosis of B Lymphocytes and B Lymphoma Cells by an NF- $\kappa$ B-Dependent Mechanism. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 7, p. 4060-4069, 2005.

REBANE, A. et al. Mechanisms of IFN- $\gamma$ -induced apoptosis of human skin keratinocytes in patients with atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 129, n. 5, p. 1297-1306, 2012.

REED, C. E.; KITA, H. The role of protease activation of inflammation in allergic respiratory diseases. **J Allergy Clin Immunol**, v. 114, n. 5, p. 997-1008, 2004.

REEFER, A. J. et al. Analysis of CD25<sup>hi</sup>CD4<sup>+</sup> "regulatory" T-cell subtypes in atopic dermatitis reveals a novel TH2-like population. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 121, n. 2, p. 415-422.e3, 2008.

RENNE, J. et al. Interleukin-1 from epithelial cells fosters T cell-dependent skin inflammation. **Br J Dermatol**, v. 162, n. 6, p. 1198-205, 2010.

RHO, N. K. et al. Immunophenotyping of inflammatory cells in lesional skin of the extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis. **British Journal of Dermatology**, v. 151, n. 1, p. 119-125, 2004.

RICOTE, M. et al. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. **Nature**, v. 391, n. 6662, p. 79-82, 1998.

RIVIER, M. et al. Differential Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Subtypes During the Differentiation of Human Keratinocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 111, n. 6, p. 1116-1121, 1998.

ROBERTSHAW, H.; FRIEDMANN, P. S. Pioglitazone: a promising therapy for psoriasis. **British Journal of Dermatology**, v. 152, n. 1, p. 189-191, 2005.

ROEKEVISCH, E. et al. Atopic dermatitis patients with filaggrin loss-of-function mutations show good but lower responses to immunosuppressive treatment. **Br J Dermatol**, 2016.

ROTH, N. et al. Distinct eosinophil cytokine expression patterns in skin diseases – the possible existence of functionally different eosinophil subpopulations. **Allergy**, v. 66, n. 11, p. 1477-1486, 2011.

RYU, W. I. et al. IL-33 induces Egr-1-dependent TSLP expression via the MAPK pathways in human keratinocytes. **Experimental Dermatology**, v. 24, n. 11, p. 857-863, 2015.

SALIMI, M. et al. A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. **J Exp Med**, v. 210, n. 13, p. 2939-50, 2013.

SATOR, P. G.; SCHMIDT, J. B.; HONIGSMANN, H. Comparison of epidermal hydration and skin surface lipids in healthy individuals and in patients with atopic dermatitis. **J Am Acad Dermatol**, v. 48, n. 3, p. 352-8, 2003.

SCHÄFER, T. The impact of allergy on atopic eczema from data from epidemiological studies. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 8, n. 5, p. 418, 2008.

SCHER, J. U.; PILLINGER, M. H. 15d-PGJ2: The anti-inflammatory prostaglandin? **Clinical Immunology**, v. 114, n. 2, p. 100-109, 2005.

SCHLEZINGER, J. J. et al. Environmental and Endogenous Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  Agonists Induce Bone Marrow B Cell Growth Arrest and Apoptosis: Interactions between Mono(2-ethylhexyl)phthalate, 9-cis-Retinoic Acid, and 15-Deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J2. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 5, p. 3165-3177, 2004.

SCHMITZ, M. L.; BACHER, S.; KRACHT, M. I $\kappa$ B-independent control of NF- $\kappa$ B activity by modulatory phosphorylations. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 26, n. 3, p. 186-190, 2001.

SCHMUTH, M. et al. Role of PPAR, LXR, and PXR in epidermal homeostasis and inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1841, n. 3, p. 463-473, 2014.

SCHMUTH, M. et al. Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha$  in Epidermal Development in Utero. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 119, n. 6, p. 1298-1303, 2002.

SCHMUTH, M. et al. Nuclear Hormone Receptors in Human Skin. **Hormone and Metabolic Research**, v. 39, n. 2, p. 96-105, 2007.

SCHNOPP, C. et al. Fox-P3-positive regulatory T cells are present in the skin of generalized atopic eczema patients and are not particularly affected by medium-dose UVA1 therapy. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 23, n. 2-3, p. 81-85, 2007.

SEO, M. D. et al. HaCaT Keratinocytes and Primary Epidermal Keratinocytes Have Different Transcriptional Profiles of Cornified Envelope-Associated Genes to T Helper Cell Cytokines. **Biomol Ther (Seoul)**, v. 20, n. 2, p. 171-6, 2012.

STEINHOFF, M.; BRZOSKA, T.; LUGER, T. A. Keratinocytes in epidermal immune responses. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, v. 1, n. 5, p. 469-76, 2001.

STRAUS, D. S.; GLASS, C. K. Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms. **Trends in Immunology**, v. 28, n. 12, p. 551-558, 2007.

SUAREZ-FARINAS, M. et al. Intrinsic atopic dermatitis shows similar TH2 and higher TH17 immune activation compared with extrinsic atopic dermatitis. **J Allergy Clin Immunol**, v. 132, n. 2, p. 361-70, Aug 2013.

SUÁREZ-FARIÑAS, M. et al. Nonlesional atopic dermatitis skin is characterized by broad terminal differentiation defects and variable immune abnormalities. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 127, n. 4, p. 954-964.e4, 2011.

SUN, G. et al. Interaction of mite allergens Der p3 and Der p9 with protease-activated receptor-2 expressed by lung epithelial cells. **J Immunol**, v. 167, n. 2, p. 1014-21, Jul 15 2001.

SURH, Y.-J. et al. 15-Deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J2, an electrophilic lipid mediator of anti-inflammatory and pro-resolving signaling. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, n. 10, p. 1335-1351, 2011.

TAN, N. et al. Critical roles of PPAR $\beta/\delta$  in keratinocyte response to inflammation. **Genes & Development**, v. 15, n. 24, p. 3263-3277, 2001.

THOMPSON, P. W. et al. Interleukin-10 is upregulated by nanomolar rosiglitazone treatment of mature dendritic cells and human CD4<sup>+</sup> T cells. **Cytokine**, v. 39, n. 3, p. 184-191, 2007.

THYSSEN, J. P.; KEZIC, S. Causes of epidermal filaggrin reduction and their role in the pathogenesis of atopic dermatitis. **J Allergy Clin Immunol**, v. 134, n. 4, p. 792-9, Oct 2014.

TOBIASOVA, Z. et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Agonists Prevent In Vivo Remodeling of Human Artery Induced by Alloreactive T Cells: Clinical Perspective. **Circulation**, v. 124, n. 2, p. 196-205, 2011.

TOKURA, Y. Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis. **J Dermatol Sci**, v. 58, n. 1, p. 1-7, Apr 2010.

TOKURA, Y. Atopic Dermatitis: Common Extrinsic and Enigmatic Intrinsic Types. In: KABASHIMA, K. (Ed.). **Immunology of the Skin: Basic and Clinical Sciences in Skin Immune Responses**. Tokyo: Springer Japan, 2016. p.339-358. ISBN 978-4-431-55855-2.

TORGERSON, T. R.; OCHS, H. D. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked: Forkhead box protein 3 mutations and lack of regulatory T cells. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 120, n. 4, p. 744-750, 2007.

TÖRMÄ, H.; BERNE, B. Sodium lauryl sulphate alters the mRNA expression of lipid-metabolizing enzymes and PPAR signalling in normal human skin in vivo. **Experimental Dermatology**, v. 18, n. 12, p. 1010-1015, 2009.

TRINDADE-DA-SILVA, C. A. et al. 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 Induces Apoptosis and Upregulates SOCS3 in Human Thyroid Cancer Cells. **PPAR Res**, v. 2016, p. 4106297, 2016.

VALLEDOR, A. F.; RICOTE, M. Nuclear receptor signaling in macrophages. **Biochem Pharmacol**, v. 67, n. 2, p. 201-12, 2004.

VERHAGEN, J. et al. Absence of T-regulatory cell expression and function in atopic dermatitis skin. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 117, n. 1, p. 176-183, 2006.

WAHLI, W.; MICHALIK, L. PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 23, n. 7, p. 351-363, 2012.

WANG, J.-J.; MAK, O.-T. Induction of apoptosis by 15d-PGJ2 via ROS formation: An alternative pathway without PPAR $\gamma$  activation in non-small cell lung carcinoma A549 cells. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 94, n. 3-4, p. 104-111, 2011.

WANG, P. et al. Inhibition of the transcription factors AP-1 and NF- $\kappa$ B in CD4 T cells by peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  ligands. **International Immunopharmacology**, v. 1, n. 4, p. 803-812, 2001.

WANG, Y.-H. et al. IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 8, p. 1837-1847, 2007.

WATANABE, H. et al. Activation of the IL-1 $\beta$ -Processing Inflammasome Is Involved in Contact Hypersensitivity. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 8, p. 1956-1963, 2007.

WEGHOFER, M. et al. Variability of IgE reactivity profiles among European mite allergic patients. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 38, n. 12, p. 959-965, 2008.

WEIDINGER, S. et al. Loss-of-function variations within the filaggrin gene predispose for atopic dermatitis with allergic sensitizations. **J Allergy Clin Immunol**, v. 118, n. 1, p. 214-9, 2006.

WEIDINGER, S. et al. Association of NOD1 polymorphisms with atopic eczema and related phenotypes. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 116, n. 1, p. 177-184, 2005.

WERFEL, T. The role of leukocytes, keratinocytes, and allergen-specific IgE in the development of atopic dermatitis. **J Invest Dermatol**, v. 129, n. 8, p. 1878-91, 2009.

WERFEL, T. et al. Cellular and molecular immunologic mechanisms in patients with atopic dermatitis. **J Allergy Clin Immunol**, v. 138, n. 2, p. 336-49, 2016.

WESTERGAARD, M. et al. Modulation of Keratinocyte Gene Expression and Differentiation by PPAR-Selective Ligands and Tetradecylthioacetic Acid. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 116, n. 5, p. 702-712, 2001.

WESTERGAARD, M. et al. Expression and Localization of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Nuclear Factor B in Normal and Lesional Psoriatic Skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 121, n. 5, p. 1104-1117, 2003.

WILLART, M. A. M. et al. Interleukin-1 $\alpha$  controls allergic sensitization to inhaled house dust mite via the epithelial release of GM-CSF and IL-33. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 8, p. 1505-1517, 2012.

WILLIAMS, H. et al. Is eczema really on the increase worldwide? **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 121, n. 4, p. 947-196673536, 2008.

WITTMANN, M.; WERFEL, T. Interaction of keratinocytes with infiltrating lymphocytes in allergic eczematous skin diseases. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, v. 6, n. 5, p. 329-34, 2006.

WOERLY, G. et al. Peroxisome Proliferator-activated Receptors  $\alpha$  and  $\gamma$  Down-regulate Allergic Inflammation and Eosinophil Activation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n. 3, p. 411-421, 2003.

WOHLFERT, E. A. et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) and Immunoregulation: Enhancement of Regulatory T Cells through PPAR $\gamma$ -Dependent and -Independent Mechanisms. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 7, p. 4129-4135, 2007.

XIAO, T. et al. Both IL-4 and IL-13 inhibit the TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  enhanced MDC production in a human keratinocyte cell line, HaCaT cells. **Journal of Dermatological Science**, v. 31, n. 2, p. 111-117, 2003.

YOSHIDA, K. et al. Distinct behavior of human Langerhans cells and inflammatory dendritic epidermal cells at tight junctions in patients with atopic dermatitis. **J Allergy Clin Immunol**, v. 134, n. 4, p. 856-64, 2014.

YOUSEFI, S. et al. Basophils exhibit antibacterial activity through extracellular trap formation. **Allergy**, v. 70, n. 9, p. 1184-1188, 2015.

YUKI, T. et al. Activation of TLR2 Enhances Tight Junction Barrier in Epidermal Keratinocytes. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 6, p. 3230-3237, 2011.