

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação de mestrado

**Disseleneto de bis-(3-amino-2-piridina) melhora a dermatite atópica e os
distúrbios psiquiátricos associados regulando o status inflamatório e
oxidativo**

Caren Aline Ramson da Fonseca

Pelotas, 2020

Caren Aline Ramson da Fonseca

Disseleneto de bis-(3-amino-2-piridina) melhora a dermatite atópica e os distúrbios psiquiátricos associados regulando o status inflamatório e oxidativo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Bioprospecção.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ethel Antunes Wilhelm

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Cristiane Luchese

Pelotas, 2020

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

F677d Fonseca, Caren Aline Ramson da

Disseleneto de bis-(3-amino-2-piridina) melhora a dermatite atópica e os distúrbios psiquiátricos associados regulando o status inflamatório e oxidativo / Caren Aline Ramson da Fonseca ; Ethel Antunes Wilhelm, orientadora ; Cristiane Luchese, coorientadora. — Pelotas, 2020.

118 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

1. Inflamação. 2. Estresse oxidativo. 3. Depressão. 4. Ansiedade. 5. 2,4-dinitroclorobenzeno. I. Wilhelm, Ethel Antunes, orient. II. Luchese, Cristiane, coorient. III. Título.

CDD : 574.192

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Caren Aline Ramson da Fonseca

Disseleneto de bis-(3-amino-2-piridina) melhora a dermatite atópica e os distúrbios psiquiátricos associados regulando o status inflamatório e oxidativo

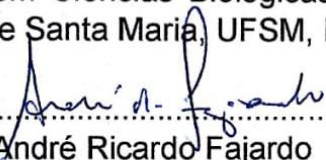
Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de mestre em Bioquímica e Bioprospecção, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 06/03/2020.

Banca examinadora:



Prof^a. Dr^a. Ethel Antunes Wilhelm (Orientadora)
Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica) pela Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Brasil.



Prof. Dr. André Ricardo Fajardo
Doutor em Química pela Universidade Estadual de Maringá, UEM, Brasil.



Dr. Marcel Henrique Marcondes Sari
Doutor em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica) pela Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Brasil.

*Dedico esta dissertação a minha mãe, aos meus irmãos e ao meu amor
Donizete ♥*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por me iluminar, me dar sabedoria e colocar pessoas tão especiais ao meu lado, para que eu pudesse seguir em frente com os meus sonhos e objetivos e não desanimar com as dificuldades.

A minha mãe, Olga e aos meus irmãos, Maicom e Cátia, meu eterno agradecimento, por sempre acreditarem na minha capacidade e nunca terem medidos esforços para me auxiliar. Por me apoiarem sempre, independente das circunstâncias e dificuldades. Em especial a minha mãe, que sempre soube me dizer as palavras certas nos momentos em que eu mais precisei. Eu amo muito vocês !!!

A meu namorado, Donizete, por estar sempre ao meu lado me incentivando e apoiando. Muito Obrigada pela paciência, amor, carinho e o cuidado de sempre!!! Amo muito você!!!

A minha sogra Ana, por toda a preocupação, incentivo, amor e cuidado. Muito Obrigada!!!

À minha orientadora, Ethel, pela disponibilidade e paciência em me auxiliar neste trabalho. Por me ensinar, incentivar e acreditar em mim. Por todo conhecimento e crescimento durante esta trajetória que contribuiu significativamente para que eu pudesse ter chegado até aqui. A Cristiane, obrigada pela orientação juntamente com a Ethel, por todas as oportunidades e por contribuir para meu crescimento. Meu eterno obrigada!!!

A todos os meus colegas do LaFarBio, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Em especial a Jaini, que me acompanha desde a graduação nesta longa caminhada. A Renata, a Mika, a Ane, a Karline, a Angélica e o Guilherme por todo incentivo, companheirismo e por dividir comigo todas minhas angústias. Obrigada pelo carinho, pelas risadas e os dias divertidos ao lado de vocês!!!

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, e também à Universidade Federal de Pelotas. Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq, FAPERGS e ao Biotério Central da UFPel por todos os auxílios prestados no decorrer do trabalho. Enfim agradeço, a todos que de uma forma ou de outra colaboraram para a realização deste trabalho.

“Sempre há outra chance, uma outra amizade, um outro amor, uma nova força.
Para todo fim, um recomeço.”

(O pequeno príncipe)

RESUMO

DA FONSECA, Caren Aline Ramson. **Disseleneto de bis-(3-amino-2-piridina) melhora a dermatite atópica e os distúrbios psiquiátricos associados regulando o status inflamatório e oxidativo.** 2020. 118f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Bioprospecção) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

A dermatite atópica (DA) é uma patologia complexa e multifatorial. A susceptibilidade genética, os fatores ambientais, a disfunção da barreira cutânea e a desregulação do sistema imunológico têm sido implicados na patogênese da DA. Essa doença afeta negativamente a saúde física e mental dos portadores, aumentando consideravelmente a prevalência de transtornos de ansiedade e depressão e acentuando os sinais e sintomas da DA. Em vista disso, foi investigado o efeito supressor do disseleneto de bis-(3-amino-2-piridina) (BAPD), no modelo de DA em camundongos BALB/c. A pele dorsal dos animais foi sensibilizada nos dias 1-3 através da aplicação tópica de 2,4-dinitroclorobenzeno (DNCB). Posteriormente, os camundongos foram desafiados com 20 µL de DNCB na orelha e 200 µL na pele dorsal nos dias 14, 17, 20, 23, 26 e 29. O tratamento dos animais foi realizado pela via oral com o BAPD (1 ou 5 mg/kg) ou Dexametasona (5 mg/kg) dos dias 14 a 29. O teste de campo aberto (OFT), labirinto em cruz elevado (EPM), teste de suspensão da cauda (TST), comportamento de coçar e os escores de gravidade da pele foram determinados no dia 30. Posteriormente, os animais foram submetidos a eutanásia por inalação do anestésico isoflurano e as orelhas, pele dorsal, hipocampo/córtex cerebral e o plasma sanguíneo foram removidos para determinação dos parâmetros inflamatórios (edema da orelha, atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), expressão de citocinas pro-inflamatórias e análise histológica), oxidativos e antioxidantes (espécies reativas (RS), espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), níveis de tiol não proteico (NPSH), atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR), glutathione S-transferase (GST)), bem como os níveis de corticosterona e atividade da enzima Na⁺, K⁺-ATPase. Os resultados do estudo demonstraram que o DNCB aumentou a gravidade das lesões de pele, o comportamento de coçar, a inflamação e o estresse oxidativo. O BAPD (1 e 5 mg/kg) melhorou o dano cutâneo, o comportamento de coçar, e restaurou a atividade da enzima MPO na orelha e no dorso dos animais induzidos com DNCB. Além disso, o composto reduziu os níveis de expressão do fator de necrose tumoral (TNF-α), interferon (IFN- γ), interleucina (IL)-33, IL-18, IL-1β, bem como aumentou a expressão de IL-10 no dorso dos animais. A análise histológica revelou que o tratamento com BAPD 5 mg/kg reduziu a resposta inflamatória diminuindo o infiltrado de neutrófilos no dorso dos camundongos. Os parâmetros de estresse oxidativo demonstraram que os níveis de RS, TBARS e a atividade da enzima GST aumentaram nos animais induzidos com DNCB. Por outro lado, os níveis de enzimas antioxidantes como SOD, CAT, GPx, GR e os níveis de NPSH foram inibidos nesses animais. BAPD (1 e 5 mg/kg) foi capaz de atenuar os parâmetros oxidativos, além de restaurar a atividade das enzimas antioxidantes. Os níveis

de corticosterona foram reduzidos apenas com a dose de 5 mg/kg do composto. A atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase no hipocampo e córtex cerebral diminuiu nos animais expostos ao DNCB. O tratamento com BAPD (1 e 5 mg/kg) restaurou a atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase apenas no córtex cerebral. A eficácia do BAPD foi semelhante ou superior à dexametasona nos parâmetros avaliados. Os dados do presente estudo demonstraram o efeito supressor do BAPD na comorbidade transtornos psiquiátricos - DA regulando o *status* inflamatório e oxidativo em camundongos.

Palavras-chaves: inflamação, estresse oxidativo, depressão, ansiedade, 2,4-dinitroclorobenzeno.

ABSTRACT

DA FONSECA, Caren Aline Ramson. **Bis-(3-amino-2-pyridine) diselenide improves psychiatric disorders – atopic dermatitis comorbidity by regulating inflammatory and oxidative status.** 2020. 118f. Dissertation (Master in Biochemistry and Bioprospecting) - Biochemistry and Bioprospecting Postgraduate Program. Federal University of Pelotas, Pelotas.

Atopic dermatitis (AD) is a complex and multifactorial pathology. Genetic susceptibility, environmental factors, dysfunction of the skin barrier and dysregulation of the immune system have been implicated in the pathogenesis of AD. This disease negatively affects the physical and mental health of patients, considerably increasing the prevalence of anxiety and depression disorders and accentuating the signs and symptoms of AD. In view of this, the suppressive effect of the bis- (3-amino-2-pyridine) diselenide (BAPD) was investigated in the AD model in BALB/c mice. The animals' dorsal skin was sensitized on days 1-3 through the topical application of 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB). Posteriorly, the mice were challenged with 20 μ L of DNCB in the ear and 200 μ L in the dorsal skin on days 14, 17, 20, 23, 26 and 29. The animals were treated orally with BAPD (1 or 5 mg/kg) or Dexamethasone (5 mg/kg) from days 14 to 29. The open field test (OFT), elevated plus maze (EPM), tail suspension test (TST), scratching behavior and skin severity scores were determined on day 30. Posteriorly, the animals were euthanized by inhalation of the isoflurane anesthetic and the ears, dorsal skin, hippocampus/cerebral cortex and blood plasma were removed to determine inflammatory parameters (ear edema, myeloperoxidase enzyme (MPO) activity, expression of pro-inflammatory cytokines and histological analysis), oxidative and antioxidant (reactive species (RS), reactive species to thiobarbituric acid (TBARS), levels of non-protein thiol (NPSH), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione S-transferase (GST) activity, as well as the levels of corticosterone and Na^+ , K^+ -ATPase enzyme activity. The results of the study demonstrated that DNCB increased the severity of skin lesions, scratching behavior, inflammation and oxidative stress. BAPD (1 and 5 mg/kg) improved cutaneous damage, scratching behavior, and restored MPO enzyme activity in the ear and back of animals induced with DNCB. In addition, the compound reduced levels of expression of tumor necrosis factor ($\text{TNF-}\alpha$), interferon ($\text{IFN-}\gamma$), interleukin (IL)-33, IL-18, IL-1 β , as well as increased expression of IL-10 on the back of the animals. Histological analysis revealed that treatment with BAPD 5 mg/kg reduced the inflammatory response by reducing the infiltration of neutrophils on the back of the mice. The oxidative stress parameters demonstrated that the levels of RS, TBARS and GST enzyme activity increased in animals induced with DNCB. On the other hand, the levels of antioxidant enzymes such as SOD, CAT, GPx, GR and the levels of NPSH were inhibited in these animals. BAPD (1 and 5 mg/kg) was able to attenuate oxidative parameters, in addition to restoring the activity of antioxidant enzymes. Corticosterone levels were reduced only with the dose of 5 mg/kg of the compound. The activity of the enzyme Na^+ , K^+ -ATPase in the hippocampus and cerebral cortex decreased in animals exposed to DNCB. Treatment with BAPD (1 and 5 mg/kg) restored Na^+ ,

K⁺-ATPase enzyme activity only in the cerebral cortex. The effectiveness of BAPD was similar or superior to dexamethasone in the evaluated parameters. The data from the present study demonstrated the suppressive effect of BAPD in comorbidity psychiatric disorders - AD regulating inflammatory and oxidative status in mice.

Keywords: inflammation, oxidative stress, depression; anxiety; 2,4-dinitrochlorobenzene.

Lista de Figuras

Revisão Bibliográfica

Figura 1	Representação esquemática das hipóteses Dentro-Fora e Fora-Dentro.....	26
Figura 2	Representação esquemática da interação entre estresse oxidativo, defeito da barreira cutânea e inflamação na dermatite atópica	30
Figura 3	Representação esquemática dos subtipos da dermatite atópica.....	31
Figura 4	Representação esquemática da fisiopatologia da dermatite atópica.....	33
Figura 5	Representação esquemática da influência do estresse sobre o eixo HPA.....	35
Figura 6	Estrutura química do BAPD.....	46

- Figura 1** (A) Chemical structure of bis (3-amino-2-pyridine) diselenide (BAPD). (B) Experimental protocol design.....90
- Figura 2** Effect of bis (3-amino-2-pyridine) diselenide (BAPD) treatment oral on atopic dermatitis (AD)-like symptoms and scratching incidence 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)-induced in mice. (A) Images of skin and ear lesions from the groups of mice taken on the last day of the experiment (day 30). (B) Dermatitis scores. (C) Scratching time.....91
- Figura 3** Effect of bis (3-amino-2-pyridine) diselenide (BAPD) treatment oral on elevated plus-maze, tail suspension and open field tests, and serum corticosterone levels and Na^+ , K^+ -ATPase activity in mice exposed to 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB). (A) represents of open arms entries, (B) time spent in the open arms, (C) time of immobility, (D) number of crossing, (E) number of rearing, (F) corticosterone levels, (G) Na^+ , K^+ -ATPase activity in hippocampus and (H) Na^+ , K^+ -ATPase activity in cerebral cortex.....92
- Figura 4** Effect of bis (3-amino-2-pyridine) diselenide (BAPD) treatment oral on (A) ear swelling, (B) ear MPO activity and (C) dorsal skin MPO activity in mice exposed to 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB).....93
- Figura 5** Effect of bis (3-amino-2-pyridine) diselenide (BAPD) treatment oral on the mRNA expression levels of $\text{TNF-}\alpha$ (A), $\text{IFN-}\gamma$ (B), IL-33 (C), IL-18 (D), IL-10 (E), IL-1 β (F) in the dorsal skin of mice exposed to 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB).....94
- Figura 6** Histological profiles of the back skin of the mice after the treatment with bis (3-amino-2-pyridine) diselenide (BAPD) or

dexamethasone using HE staining: (A) Control - normal skin. HE. 100X. (B to D) 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) - non-ulcerated skin showing formation of subepidermal pustules (arrow), dilation of lymphatic vessels (*) and a discreet degree of parakeratotic hyperkeratosis and formation of intraepidermal pustules (arrow). HE. 100X. Dermis superficial and deep dermis exhibiting abundant inflammatory infiltrate of neutrophils (arrow). HE. 200X. (E to H) Dexamethasone (Dexa) - non-ulcerated skin presenting abundant inflammatory infiltrate of neutrophils mainly along the superficial dermis (arrow). Skin showing large intraepidermal pustules (arrow) and presenting crust formation (between arrows), discrete inflammatory response in the dermis and presence of bacterial colony (arrowhead). HE. 100X. Dermis thickened with macrophages infiltrates (white arrow), plasma cells (arrowhead) and lymphocytes, vascular congestion, edema and dilated lymphatic vessels (*). (I to K) DNCB + BAPD 1 mg/kg - non ulcerated skin with mild parakeratotic hyperkeratosis, presence of intraepidermal pustules (arrow). (L to O) DNCB + BAPD 5 mg/kg - skin presenting moderate parakeratotic hyperkeratosis, formation of large intraepidermal pustules (*), presence of folliculitis (arrow).....95

Figura 7 Effect of bis (3-amino-2-pyridine) diselenide (BAPD) treatment oral on the levels of (A) RS, (B) TBARS, and (C) NPSH and on the activities of (D) SOD, (E) CAT, (F) GPx, (G) GR and (H) GST in the dorsal skin of mice.....96

Lista de Tabelas

Manuscrito

Table 1	Primers used for quantitative real-time polymerase chain reaction. Listed are the forward and reverse primer sequences used to amplify each target gene as well as the GAPDH endogenous control.....	84
----------------	--	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACHe	Acetilcolinesterase
BAPD	Disseleneto de bis-(3-amino-2-piridina)
CAT	Catalase
COX-2	Ciclooxigenase-2
CRAMP	Peptídeo antimicrobiano relacionado à catelina
DA	Dermatite atópica
Der f	<i>Dermatophagoides farinae</i>
Der p	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
DNCB	2,4-dinitroclorobenzeno
ERs	Espécies reativas
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
FLG	Filagrina
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GST	Glutathione S-transferase
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
INF-γ	Interferon- γ
OVA	Ovalbumina
Ox	Oxazolona
TNCB	Trinitroclorobenzeno
SEA	Enterotoxina estafilocócica A
SEB	Enterotoxina estafilocócica B
SEC	Enterotoxina estafilocócica C
TSST	Toxina da síndrome do choque tóxico
CD4	Linfócito T auxiliar
CD8	Linfócito T citotóxico
Dox	Doxiciclina
rtTA	Transativador reverso do sistema responsivo a tetraciclina
K5	Queratina 5

HPA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
PATE	Perda de água transepidermica
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SOD	Superóxido dismutase
Th1	Linfócitos auxiliares tipo 1
Th2	Linfócitos auxiliares tipo 2

SUMÁRIO

1. Introdução	20
2. Objetivos	23
2.1. Objetivo geral	23
2.2. Objetivos específicos	23
3. Revisão Bibliográfica	24
3.1. Dermatite atópica	24
3.2. Fisiopatologia da dermatite atópica	25
3.2.1. Envolvimento do estresse oxidativo na fisiopatologia da dermatite atópica	28
3.2.2. Ação do sistema imunológico na fisiopatologia da dermatite atópica	30
3.3. Transtornos de ansiedade e depressão na dermatite atópica	33
3.4. Modelos animais de dermatite atópica	35
3.4.1. Dermatite atópica induzida por haptenos	35
3.4.2. Dermatite atópica induzida por sensibilização epicutânea com ovalbumina (OVA)	37
3.4.3. Dermatite atópica induzida por superantígenos	38
3.4.4. Dermatite atópica induzida pela aplicação de alérgeno de ácaro da poeira doméstica	39
3.4.5. Dermatite atópica induzida por modelo animal geneticamente modificado/Camundongos transgênicos TSLP	40
3.5. Tratamentos farmacológicos	41
3.5.1. Corticosteroides tópicos e orais	42
3.5.2. Imunossupressores	43
3.5.3. Anti-histamínicos	43
3.5.4. Anticorpos monoclonais	44
3.6. Novas estratégias terapêuticas para a dermatite atópica e comorbidades associadas	44
4. Manuscrito científico	47
5. Conclusões	97
Perspectivas futuras	98
Referências	99
Anexos	117

1. Introdução

A pele, maior órgão do corpo humano, reúne uma complexidade própria no que diz respeito à sua constituição, atuando como uma barreira anatômica e fisiológica, protegendo o organismo contra a entrada de agentes estranhos ou microrganismos indesejáveis (MILLER et al., 2013; ENGBRETSSEN e THYSSEN, 2016). A pele protege o corpo e, enquanto desempenha tal função, é exposta a diversos fatores externos, o que pode levar a uma série de problemas e doenças, entre as quais destaca-se a Dermatite atópica (DA). A DA, conhecida também como Eczema atópico, é uma doença cutânea inflamatória crônica, caracterizada por prurido intenso e lesões eczematosas recorrentes (YOSIPOVITCH e PAPOIU, 2008; BIEBER, 2010). Sua prevalência aumentou significativamente ao longo dos anos e atualmente afeta até 30% das crianças e até 17% dos adultos em todo o mundo (SACOTTE e SILVERBERG, 2018).

Os sintomas clínicos da DA, particularmente a coceira incessante e a sensação negativa das aparências físicas alteradas pelas lesões cutâneas eczematosas, impõem uma carga psicológica intensa aos portadores e suas famílias (BUSKE-KIRSCHBAUM et al., 2001). Evidências crescentes mostram que pacientes com DA sofrem com transtornos psicológicos (ansiedade e depressão) e com cargas sociais significativas (YAGHMAIE et al., 2013; CHENG et al., 2015; EGEBERG et al., 2016; SANDERS et al., 2018). Além disso, foi evidenciado que mediadores inflamatórios na DA também podem contribuir para o desenvolvimento da depressão (NICHOLAS et al., 2017; FARZANFAR et al., 2018).

Os transtornos de saúde mental, como a ansiedade e depressão são uma das principais causas de incapacidade em todo o mundo (DAYLs e HALE, 2017). A depressão caracteriza-se como perda de interesse e prazer nas atividades e experiências cotidianas, afetando cerca de 4,4% a população global. Na sua forma mais grave, pode levar ao suicídio. Similarmente, a ansiedade é consequência do medo excessivo, ou prevenção de ameaças percebidas, atingindo aproximadamente 3,6% dos indivíduos (WHO, 2017) Estudos apontam que essas desordens estão associadas ao aumento da

morbidade e mortalidade (CUIJPERS et al., 2002; PHILLIPS et al., 2009; MILOYAN et al., 2016).

Essa patologia multifatorial e complexa está relacionada ao comprometimento da barreira epidérmica, o qual pode ocasionar a penetração de certos agentes ambientais/alérgenos e a uma desregulação do sistema imunitário (KULTHANAN et al., 2011). O sistema imunológico da DA é mediado por desequilíbrio das células T, como os linfócitos auxiliares tipo 1 e 2 (linfócitos Th1 e Th2). O estabelecimento e manutenção de respostas imunes e homeostase dependem destas células, especialmente os linfócitos Th2. Essas células estão envolvidas em muitas doenças inflamatórias e autoimunes, protegendo o organismo contra diversos patógenos, tumores e o ambiente, além de manter a memória imunológica e auto tolerância (TURNER et al., 2012; COHEN, 2014; KUMAR et al., 2018). As células Th2 ativam linfócitos B para produção de imunoglobulina E (IgE), induzindo assim a ativação de mastócitos e acarretando a reação alérgica, bem como lesões cutâneas eczematosas. Além disso, essas células são responsáveis pela infiltração de eosinófilos no tecido. Em vista disso, uma inibição na atividade de linfócitos Th2 pode ocasionar em uma melhora nos sintomas causados pela DA (EYERICH et al., 2013).

As circunstâncias da DA são contínuas e geralmente mostram um padrão de exacerbação e remissão com tratamentos intermitentes e surtos periódicos (GARMHAUSEN et al. 2013). Essa patologia não tem cura e por esse motivo, o principal objetivo da terapêutica destina-se em proporcionar uma melhora na qualidade de vida dos portadores (BLOME et al., 2016). Em vista disso, a base do tratamento para a DA há anos tem sido o uso de agentes anti-inflamatórios tópicos, os hidratantes, corticosteroides e inibidores da calcineurina (MEGNA et al. 2017). No entanto, a taxa de sucesso é muito baixa e o uso prolongado destes medicamentos pode levar a vários efeitos adversos (OTANI et al. 2015). Nesse contexto, a busca de compostos mais eficazes no tratamento dessa patologia, com baixos efeitos adversos faz-se necessário. Diante disso, nosso grupo de pesquisa tem se dedicado ao estudo de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da DA (WEBER et al., 2018; VOSS et al., 2018). Em vista disso, os compostos de piridina e orgânicos de selênio tem chamado a atenção, uma vez que, estudos revelaram propriedades

farmacológicas relevantes para o tratamento da inflamação e do estresse oxidativo (MÁRQUEZ-FLORES et al. 2011; PINZ et al. 2016; WORACHARTCHEEWAN et al. 2012; VOGT et al. 2018). Frente a isto, destacamos o disseleneto de bis-(3-amino-2-piridina) (BAPD), pelas atividades biológicas já apresentadas.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Investigar o efeito supressor do BAPD nas lesões cutâneas semelhantes à DA e nas comorbidades (ansiedade e depressão) induzidas por 2,4-dinitroclorobenzeno (DNCB) em camundongos. Além disso, pretende-se elucidar os mecanismos envolvidos na possível ação farmacológica do composto.

2.2. Objetivos específicos

- Verificar o efeito supressor do BAPD frente aos sinais clínicos da DA.
- Investigar o potencial farmacológico do BAPD frente às comorbidades (ansiedade e depressão) associadas à DA.
- Determinar se a ação anti-inflamatória do BAPD contribui para os efeitos protetores no modelo de DA.
- Elucidar a contribuição da ação antioxidante do BAPD para o seu efeito supressor da DA.
- Analisar se o efeito supressor do BAPD na DA e suas comorbidades está correlacionado com a modulação do eixo hipotalâmico da hipófise adrenal e da enzima Na^+ , K^+ -ATPase.
- Comparar o efeito farmacológico do BAPD em relação a Dexametasona.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Dermatite atópica

A DA, um dos tipos mais comuns de alergia cutânea, crônica, não contagiosa, é caracterizada por apresentar espessamento, ressecamento da pele além de feridas com pápulas eritematosas intensamente pruriginosas associadas a escoriações e exsudatos serosos (EICHENFIELD et al., 2014; WOLLENBERG et al., 2016). A pele afetada apresenta uma epiderme de espessura reduzida, baixa coesão entre os corneócitos e pouco hidratada. Além disso, a pele exibe vermelhidão e coceira (TOKURA, 2010). Essa doença é marcada por fases de exacerbações, remissões e está frequentemente associada a diversas alterações a nível das funções da barreira cutânea acopladas a desregulações do sistema imunitário (LEUNG et al., 2013). A DA é dos principais problemas de saúde não fatal associada a doenças de pele, que ocasiona imprevisível impacto na vida dos portadores. De fato, as lesões cutâneas podem causar considerável sofrimento psicológico e uma carga dramática na qualidade de vida dos pacientes e de suas famílias, aumentando o risco para incidência de outras patologias inflamatórias bem como de outras complicações (SERRA-BALDRICH et al., 2017).

A palavra dermatite remete à pele (Derma), enquanto o termo atopia significa tendência pessoal e/ou familiar para tornar-se sensibilizado e produzir anticorpos específicos da classe IgE em resposta à alérgenos (JOHANSSON et al., 2004; SALAZAR-ESPINOSA, 2014). Seu surgimento é mais comum nas dobras dos braços e na parte de trás dos joelhos. No entanto, as zonas do couro cabeludo, face, pescoço, extremidades e tronco podem ser afetadas. As lesões variam conforme a idade do indivíduo e quando persiste na idade adulta, esta doença tem tendência a tornar-se mais severa. De fato, a DA está se tornando mais evidente em idosos e caracteriza-se por uma eritrodermia excessiva aliada a um elevado prurido (LOPES et al., 2016; BIEBER et al., 2017). Os principais fatores de risco para permanência dos sintomas são gravidade inicial da dermatite e sensibilização atópica (ILLI et al., 2004).

Atualmente a taxa de prevalência dessa doença está aumentando e esse acréscimo é mais significativo nos países desenvolvidos (MORTZ et al.,

2019). Essa patologia, geneticamente predisposta, está associada ao histórico familiar, começando na infância. De fato, no século XX, a DA era considerada uma doença pediátrica. No entanto, a partir da década de 80, novos casos dessa doença começaram a surgir, porém em indivíduos com idades superiores (adolescentes, jovens adultos ou adultos com idade avançada) (ELLIS et al., 2012; TANEI et al., 2013). Desde 2013, a alta incidência de DA em crianças e adultos a tornou uma das doenças de pele mais onerosas do mundo (VOS et al., 2016).

Estima-se que entre 10 a 30% das crianças e até 10% dos adultos sofram de DA. A maioria dos casos de DA começa na primeira infância, com quase 50% se desenvolvendo até 1 ano de idade e 30% entre 1 e 5 anos. Desses indivíduos, 43,2% apresentam crescimento espontâneo da doença, 38,3% persistem com DA leve e 18,7% continuam com doença grave, enquanto que 80% dos casos persistem na idade adulta (ILLI et al., 2004; ORFALI et al., 2013; HAY et al., 2014; MARGOLIS et al., 2014; KANCHONGKITIPHON et al., 2015; DANBY et al., 2016; GUO et al., 2019). Apenas 16,8% dos pacientes com DA iniciam após a adolescência e sua prevalência na idade adulta varia de 2,1% a 4,9% (SIDBURY et al., 2014; BARBAROT et al. 2018). Estudos comprovam que componentes genéticos associados a fatores ambientais influenciam no risco de desenvolvimento de DA em 82% e 18% dos casos, respectivamente (BROWN et al., 2012; MU et al., 2014; OSZUKOWSKA et al., 2015). Ainda, outros trabalhos assumem que crianças com DA têm maior predisposição para o desenvolvimento de asma e rinite alérgica em comparação a crianças que não desenvolveram a doença (LI et al., 2014).

3.2. Fisiopatologia da dermatite atópica

A fisiopatologia da DA é muito complexa, incompleta e envolve vários fenômenos de natureza imunológica e não imunológica. Ainda não está claro os mecanismos que desencadeiam essa doença. Sugere-se que a predisposição genética direcionada para o comprometimento da barreira cutânea aliada à exposição a certos agentes ambientais/alérgenos e ainda a uma desregulação da resposta imunitária podem levar à ativação de processos

inflamatórios na pele e consequentemente a predisposição à DA. A DA caracteriza-se como um subconjunto desses fatores, dessa forma, não há uma única causa para o surgimento dessa patologia (BRANDT e SIVAPRASAD, 2011; KULTHANAN et al., 2011; ZHENG et al., 2011).

Frente a isto, duas hipóteses diferentes foram propostas para explicar a fisiopatologia da DA. A primeira teoria definida como Dentro-Fora, aponta que o defeito primário reside no sistema imunológico (ativação das células Th2), causando sensibilização excessiva ao anticorpo IgE, inflamação e o comprometimento da barreira cutânea de forma secundária (Figura 1A). A segunda teoria, Fora-Dentro, propõe que a barreira cutânea anormal precede a DA, causando aumento da exposição à alérgenos e patógenos, induzindo a sensibilização excessivas por IgE e consequentemente a um processo inflamatório exacerbado (Figura 1B) (ELIAS et al., 2008; BIEBER et al., 2008; DHARMAGE et al., 2014).

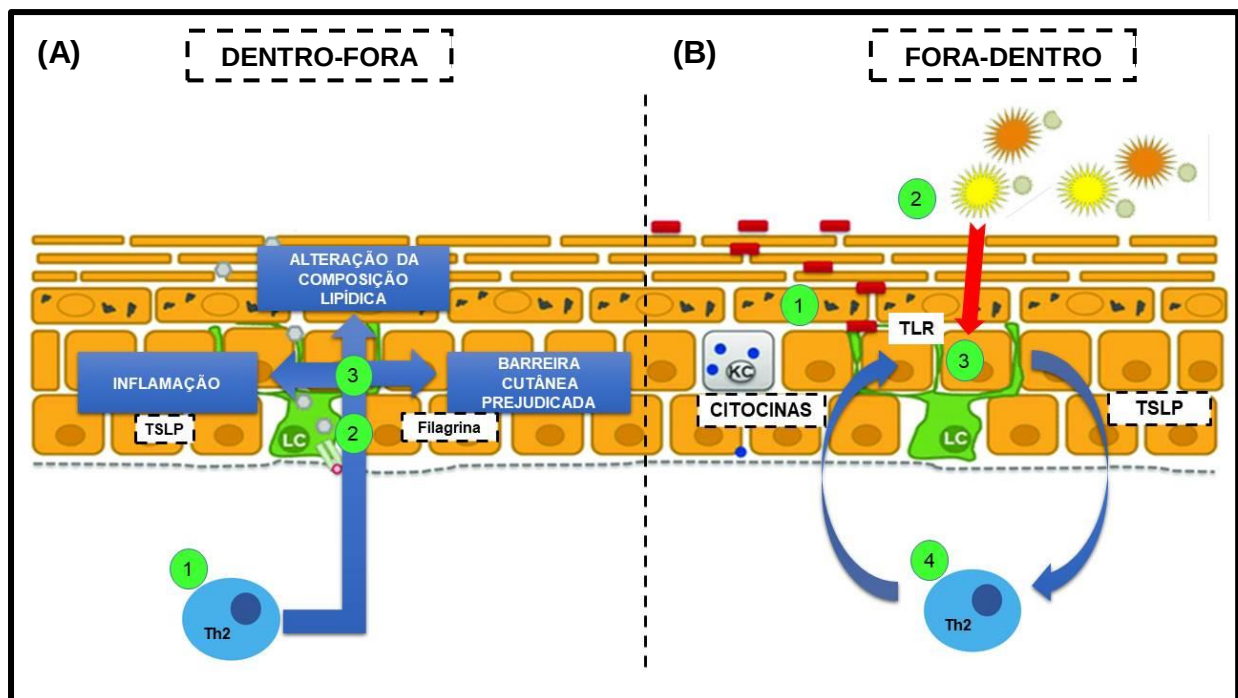


Figura 1. Representação esquemática das hipóteses *Inside-outside* e *Outside-Inside*. **(A)** (1) O ambiente pró-inflamatório está ligado à produção de citocinas Th2 pelas células do sistema imunológico. (2) O impacto das citocinas Th2 na epiderme e principalmente nos queratinócitos. (3) A indução da secreção da

citocina linfopoietina estromal tímica (TSLP) pelos queratinócitos, defeito da epiderme com alteração da organização e composição dos lipídios e alteração da diferenciação proteica. **(B)** (1) Defeito da epiderme com defeitos de filagrina, loricrina, involucrina, queratina e alteração da composição lipídica. (2) Um aumento da penetração do fator exógeno. (3) Estimulação de queratinócitos (especialmente por TLR) levando à secreção de TSLP e ativação de células dendríticas. (4) Indução da inflamação com estimulação de citocinas Th2. Th1: linfócito auxiliar do tipo 1, Th2: linfócito auxiliar tipo 2, TLR: receptores do tipo Toll, KC: queratinócitos, LC: células de Langerhans, TSLP: linfopoietina estromal tímica (Adaptado de Huet et al., 2018).

A pele atua como uma barreira físico-química, protegendo o organismo de agentes externos (microrganismos, alérgenos) e impedindo a perda excessiva de água, a qual garante a manutenção do estado de hidratação, além de possuir um papel importante a nível sensorial e imunogênico (ENGEBRETSEN et al., 2016). Nesse contexto, vários motivos levam ao comprometimento da barreira cutânea, como a composição lipídica e a expressão de proteínas no envelope cornificado (involucrina e loricrina) alteradas, bem como o desequilíbrio nas proteínas estruturais da epiderme (COOKSON et al., 2004; PROKSCH et al., 2008). Recentemente, mutações genéticas de filagrina (FLG) na barreira epidérmica e atopia foram mencionadas como fatores consideráveis no desenvolvimento da DA e sensibilização (MARENHOLZ et al., 2006; IRVINE et al., 2011; KIM et al., 2018).

A FLG é uma proteína polifuncional, presente na epiderme, que incorpora um complexo proteolítico que atua no final da diferenciação dos queratinócitos, ou seja, ao nível da descamação, estando assim envolvida, entre outras funções, na coesão entre as células da epiderme e na formação do estrato córneo. Em vista disso, a hipótese atual aponta que em indivíduos sem defeitos da barreira cutânea, a epiderme está em um estado normal de integridade, sem perda de água transepidérmica (PATE) e proteção adequada contra microrganismos e alérgenos ambientais (PLÖTZ et al., 2014).

A DA apresenta uma desorganização na estrutura e função da pele (LEUNG et al., 2013). Dessa maneira, a quebra ou perda da função da barreira

cutânea, por mutações genéticas da FLG, resulta em defeito na sua permeabilidade, aumentando a PATE, reduzindo a hidratação da pele e consequentemente aumentando a sensibilização a alérgenos, decorrente da perda da função antimicrobiana, acarretando a perpetuação do estado inflamatório da pele (FLOHR et al., 2005; ZIYAB et al., 2012; TAKANO et al., 2017). De fato, a barreira cutânea atua como um mediador da sensibilização e o comprometimento da mesma é uma das causas mais evidentes da liberação de mediadores pró-inflamatórios e por este motivo causa significativo agravamento e cronicidade da DA (D'AURIA et al., 2016).

3.2.1. Envolvimento do estresse oxidativo na fisiopatologia da dermatite atópica

Evidências crescentes demonstram que o estresse oxidativo também pode ter uma função na DA (BYAMBA et al., 2010; BAEK et al., 2016; ARA et al., 2019). Essa relação, entre estresse oxidativo e DA é baseada em três pontos fundamentais. O primeiro refere-se à presença de estresse oxidativo, o segundo, o aumento do estresse oxidativo durante a exacerbação da DA e por último, a diminuição da capacidade antioxidante. O estresse oxidativo caracteriza-se por um desequilíbrio entre a produção e acúmulo de espécies reativas (ERs) nas células e tecidos e a redução da capacidade do sistema antioxidante de desintoxicar esses produtos reativos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). As ERs podem ser formadas a partir de reações metabólicas que ocorrem endogenamente ou exogenamente. Na forma endógena, a formação das ERs pode ocorrer durante o processo de ativação dos fagócitos ou das células inflamatórias, como também no processo de respiração celular, através da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Por outro lado, a formação de ERs de forma exógena decorre de poluentes, fumaça do cigarro, má alimentação, radiação ionizante (KIRKHAM e RAHMAN, 2006). Essas moléculas reativas são geradas durante o metabolismo normal e são parte integrante da função celular normal (OKAYAMA et al., 2005). No entanto, quando há uma produção exacerbada podem resultar em lesões em todos os componentes celulares, como proteínas, DNA e lipídios da membrana, que podem causar morte celular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015).

Diante disso, em condições fisiológicas, um complexo sistema de defesas antioxidantes atua no organismo auxiliando na defesa contra as ERs. Os agentes antioxidantes agem, em concentrações baixas, na redução, inibição, bem como a reparação dos danos oxidativos (DAVIES, 2000; BIRBEN et al., 2012). Esse sistema pode ser dividido em endógeno e exógeno, sendo o de origem endógena produzidos pelo organismo. As enzimas glutathione peroxidase (GPx), a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione-S-transferase (GST) constituem as defesas antioxidantes enzimáticas, enquanto que a glutathione reduzida (GSH), os peptídeos de histidina, a ubiquinona, a bilirrubina compõem as defesas antioxidantes não enzimáticas (BIANCHI e ANTUNES, 1999). Por sua vez, as vitaminas C e E, os β -carotenos, os polifenóis e o selênio são alguns exemplos de defesas antioxidantes de origem exógena (BIANCHI e ANTUNES, 1999).

A inflamação é uma característica crítica da DA e está frequentemente associada ao aumento nos níveis de ERs, como espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), assim como de outros oxidantes pela ativação de várias enzimas, levando a estresse oxidativo e dano celular (KRUK et al., 2014). De fato, as ERs são produzidas por queratinócitos e praticamente todos os tipos de células da pele em resposta a agentes oxidantes endógenos (citocinas, fatores de crescimento) e ambientais (poluentes, radiação ultravioleta) (BAEK et al., 2015). Em vista disso, na DA, a inflamação danifica diretamente as células epiteliais e induz o acúmulo de eosinófilos e mastócitos, juntamente com a secreção de citocinas pró-inflamatórias e a produção de IgE, levando a um dos principais sintomas dessa patologia, o prurido (JI et al., 2016).

Além disso, o estresse oxidativo também pode ativar as vias do fator nuclear kappa B (NF- κ B), ativando a expressão gênica e a síntese de enzimas antioxidantes. A ativação dessa via também induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-8, IL-9 e IL-33, que por sua vez aumentam o infiltrado inflamatório dérmico e a liberação de histamina na pele afetada, piorando os sintomas da DA (KRUK et al., 2014). Diante disso, vários estudos revelaram que o estresse oxidativo está intimamente relacionado a DA (TSUKAHARA et al., 2002; CHUNG et al., 2009; SIVARANJANI et al., 2013; BAEK et al., 2016) (Figura 2).

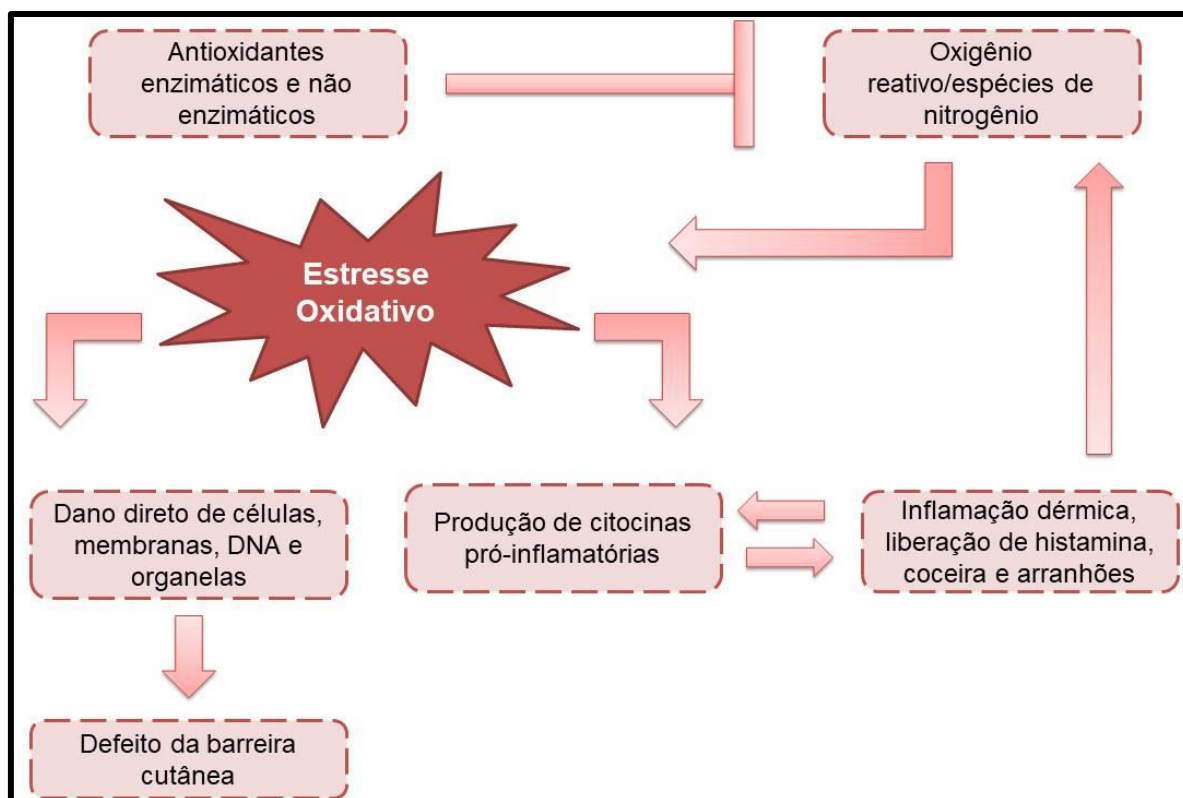


Figura 2. Representação esquemática da interação entre estresse oxidativo, defeito da barreira cutânea e inflamação na dermatite atópica (Adaptado de Ji et al., 2016).

3.2.2. Ação do sistema Imunológico na fisiopatologia da dermatite atópica

Imunologicamente, muitas células e fatores estão fortemente envolvidos na DA, como linfócitos T, células de Langerhans, eosinófilos, mastócitos, queratinócitos, citocinas pró-inflamatórias e IgE (LEUNG, 2000; BEYER et al., 2002). Nessa patologia há uma tendência para respostas imunológicas mediadas pelas células Th2. Estas células produzem um conjunto de interleucinas (IL) - IL-4, IL-5 e IL-13, que têm um papel de grande importância nas respostas inflamatórias da pele que caracterizam a doença. Em vista disso, a DA foi classificada em dois subtipos: a DA extrínseca e intrínseca (Figura 3). A extrínseca, classificada também como alérgica ou clássica, caracteriza-se por eosinofilia, níveis elevados de IgE total e específica, IL-4, IL-5 e IL-13, quando expostos a alérgenos alimentares e aeroalérgenos, predominando em 70 a 80% dos pacientes.

Por sua vez, a DA intrínseca, considerada não alérgica, apresenta fenótipo clínico similar, eosinofilia e ausência de anticorpos específicos para sensibilizações alérgicas, como por exemplo, IL-4 e IL-13. As diferenças em relação às ativações imunológicas entre as duas formas de DA são controversas (LEUNG, 2004; TANEI et al., 2013; ORFALI et al., 2013) (Figura 3). As células de Langerhans, na epiderme, e as células dendríticas desempenham um papel importante de apresentação de antígenos às células Th2 que, por sua vez, estimulam os linfócitos B a produzirem anticorpos do tipo IgE (PLÖTZ et al., 2014). Consequentemente, o desequilíbrio das respostas mediadas pelas células T na DA e o aumento da liberação de IL-4 e IL-13, aumenta a produção das IgE. Assim, o reconhecimento de antígenos pelas IgE é facilitado, sendo esta uma das características relevantes da patogênese da DA, ocasionando uma doença de hipersensibilidade (WOLLENBERG et al., 2013).

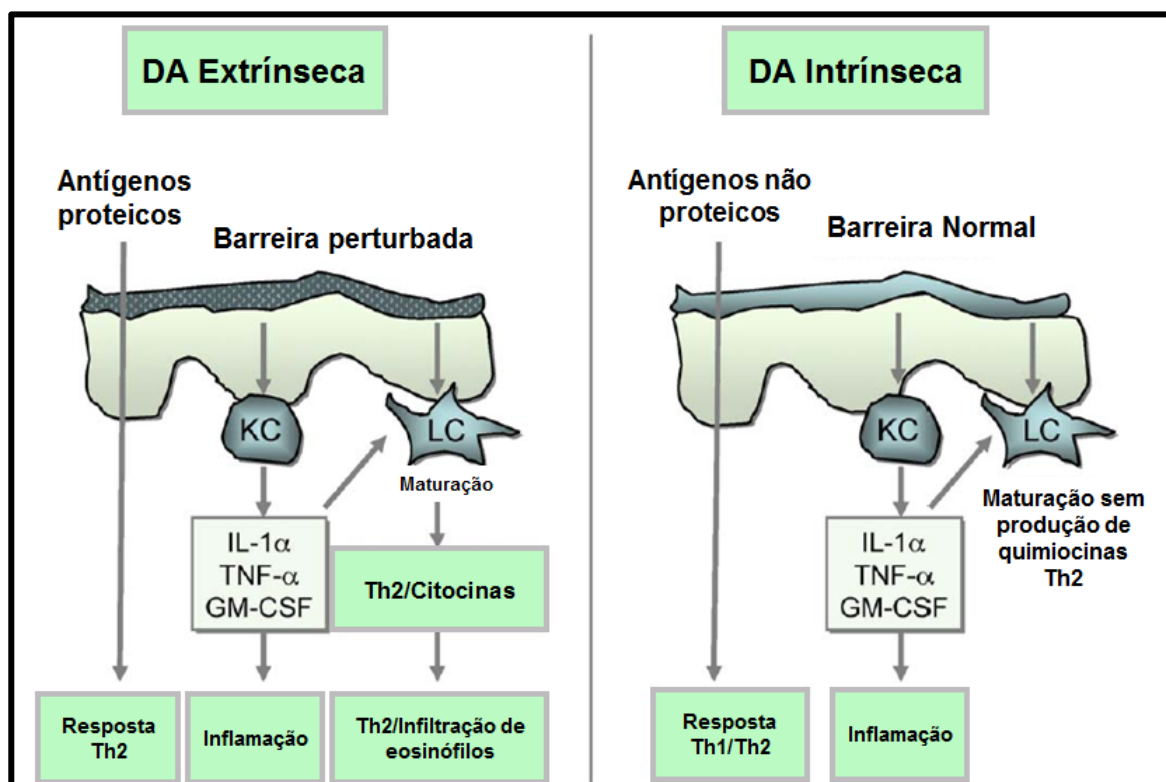


Figura 3. Representação esquemática dos subtipos da dermatite atópica. KC: queratinócitos, LC: células de Langerhans, IL-1- α : interleucina 1- α , TNF- α : fator de necrose tumoral, GM-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos e

macrófagos, Th1: linfócito auxiliar do tipo 1, Th2: linfócito auxiliar tipo 2 (Adaptado de Tokura, 2010).

De fato, na fase aguda da DA, citocinas Th2, incluindo IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-31 e IL-33, induzem a proliferação de linfócitos B produtores de IgE, que levam ao aumento da IgE e à diminuição dos níveis de interferon- γ (INF- γ) no plasma (LEUNG e SOTER, 2001; HOMEY et al., 2006). Por outro lado, na fase tardia ou crônica da DA ocorre a secreção predominante de células linfocitárias Th1 e são observadas altas concentrações de IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-18, granulócitos e macrófagos. Segundo Kosaka et al. (2008), essas citocinas estão envolvidas em disfunções da barreira cutânea, incluindo espessamento dérmico e infiltração de células imunes na derme. Choi et al. (2019) e Song et al. (2019) demonstraram que os pacientes com DA apresentam elevações significativas dessas citocinas no soro e na pele (Figura 4).

Diante do exposto, outro fator relevante no desenvolvimento e manutenção da DA decorre da propensão da pele atópica a infecções secundárias. O desequilíbrio do sistema imunitário e a ineficácia da barreira cutânea, assim como a existência de uma expressão anormal de peptídeos antimicrobianos, auxiliam no aparecimento dessas infecções. A progressão das infecções cutâneas está muitas vezes associada ao agravamento da doença (TOLLEFSON et al., 2014; WOLLENBERG et al., 2014). O *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) é um dos principais agentes responsáveis pelas infecções. Essa bactéria encontra-se presente de forma transitória na pele saudável e de forma permanente na pele de portadores da DA, agravando as lesões presentes (WEIDINGER E NOVAK, 2015). *S. aureus* é encontrado em 90% das lesões de pele de pacientes com DA.

hipófise-adrenal (HPA) fundamentais (SARTORIUS et al., 2010). O eixo HPA consiste em uma das redes neuroendócrinas do corpo, responsivas ao estresse e a fatores inflamatórios, e está implicado na fisiopatologia da ansiedade, depressão e no funcionamento cognitivo (MORRIS et al., 2012; CHENG et al., 2015; KELLER et. al., 2016). Acredita-se que a correlação entre esses transtornos mentais e a DA decorra de fatores genéticos e ambientais, e que a desregulação desse eixo contribui para a relação entre esses sintomas e a resposta imune na DA (LIM et al., 2016).

O hormônio liberador de corticotropina (CRH) é o principal componente do eixo HPA, atuando como regulador primário da resposta ao estresse e da homeostase sistêmica e cutânea (SLOMINSKI et al., 2013). Esse hormônio é secretado pelo hipotálamo, que estimula a liberação do hormônio adrenocorticotrópico hipofisário (ACTH) no sangue. O ACTH estimula a liberação de glicocorticóides do córtex adrenal, sendo o cortisol em humanos e a corticosterona (CORT) em roedores (BORNSTEIN et al., 2008; FLANDREAU et al., 2012) (Figura 5).

Nesse contexto, vários estudos relataram altos níveis de estresse em pacientes com DA e consequentemente um aumento significativo dos transtornos de ansiedade e depressão (CHENG et al., 2015; LI et al., 2016; PARK e KIM, 2016). A ansiedade é definida como uma emoção básica que resulta em uma resposta adaptativa ao estresse ou situações estressantes, facilitando a sobrevivência de riscos potenciais (LANG et al., 1998). Essa desordem é caracterizada por um desequilíbrio de humor e emoções, assim como, por anormalidades das estruturas cerebrais. Por outro lado, a depressão é definida como um transtorno mental comum, caracterizada por tristeza, perda de interesse, ausência de prazer, oscilações entre sentimento de culpa e baixa autoestima, além de distúrbios do sono ou do apetite. A depressão pode ser de longa duração ou recorrente. Na sua forma mais grave, pode levar ao suicídio (WHO, 2017).

Além disso, o estresse psicológico crônico, o qual é um dos fatores predominantes na DA, resulta no rompimento da barreira epidérmica e induz alterações imunológicas relacionadas à atopia, como aumento dos níveis de IgE, secreção de citocinas pró-inflamatórias e promoção do estresse oxidativo, agravando a sintomatologia da DA, como prurido cutâneo (SLOMINSKI et al.,

2000; BUSKE-KIRSCHBAUM et al., 2004; KIM et al., 2014; BUSKE-KIRSCHBAUM et al., 2010; PARK et al., 2016). Diante disso, a combinação de prurido, estresse psicológico, isolamento social, depressão e ansiedade resulta em um ciclo vicioso em pacientes com DA (GARG et al., 2001; WRIGHT et al., 2005; OH et al., 2010). Além disso, essa associação também pode estar ligada a vias neuroinflamatórias (SANNA et al., 2014).

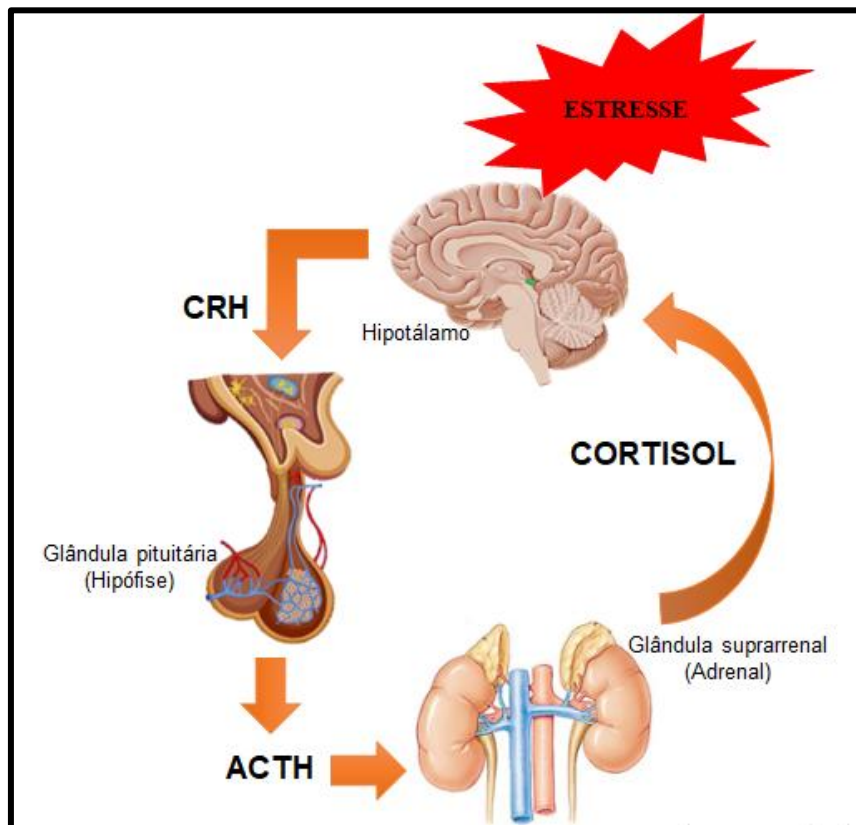


Figura 5. Representação esquemática da influência do estresse sobre o eixo HPA. CRH: hormônio liberador de corticotrofina, ACTH: hormônio adrenocorticotrófico (Adaptado de Jurena et al., 2004).

3.4. Modelos animais de dermatite atópica

3.4.1. Dermatite atópica induzida por haptenos

Haptenos como a oxazolona (Ox), 2,4-Dinitroclorobenzeno (DNCB) e trinitroclorobenzeno (TNCB) são comumente usados para induzir DA. No entanto, dentre esses modelos o mais utilizado para o estudo dessa patologia é

a aplicação tópica do DNCB (KIM et al., 2015). A indução pelo DNCB promove hipersensibilidade ao contato com a pele e causa um processo inflamatório envolvido no desenvolvimento e manutenção da DA, imitando os sintomas clínicos dessa patologia (FANG et al., 2015). Além disso, esse modelo também é utilizado porque exibe fenótipos mistos das respostas Th1 e Th2 (JUNG et al., 2017). Frente a isso, para induzir lesões cutâneas do tipo DA, a pele dorsal dos camundongos (BALB/c) é raspada e removida para posterior aplicação do DNCB. Dessa forma, a pele dorsal dos camundongos é sensibilizada nos dias 1-3 através da aplicação tópica de DNCB (200 µL) na concentração de 0,5%. O DNCB é diluído em acetona/azeite de oliva (3:1). Posteriormente, os camundongos são desafiados com 20 µL de DNCB na concentração de 1% na orelha e 200 µL na pele dorsal nos dias 14, 17, 20, 23, 26 e 29 do protocolo experimental.

De forma semelhante, o modelo de indução com Ox utiliza camundongos fêmeas sem pelos (hr/hr). Os animais são sensibilizados por aplicação tópica de Ox (10 mL) na concentração de 5%. Após uma semana, os animais do grupo induzido recebem, novamente por aplicação tópica, 60 mL de Ox a 0,1%, uma vez a cada dois dias, em um período de duas semanas (MAN et al., 2008). Dessa forma, os desafios repetidos com Ox causam uma inflamação crônica da pele semelhante a Th2. A inflamação é caracterizada por infiltração dérmica de linfócitos, mastócitos e eosinófilos, aumento da expressão de IL-4 na derme e níveis elevados de IgE. Além disso, é observado um aumento da hiperplasia epidérmica, diminuição da expressão das proteínas de diferenciação da pele filagrina, loricrina e involucrina, redução da hidratação do estrato córneo, aumento da PATE e diminuição da secreção do corpo lamelar. Ainda, como na DA humana, a atividade da serina protease epidérmica no estrato córneo aumenta e a expressão de peptídeos antimicrobianos derivados do corpo lamelar, como o peptídeo antimicrobiano relacionado à catelina (CRAMP) diminui após os desafios do Ox, paralelamente à diminuição de seus homólogos humanos nas lesões de pele da DA. Frente a isso, esses modelos de indução podem ser bastante úteis para avaliar mecanismos patogênicos e possíveis terapias para a DA, visto que possui boa reprodutibilidade, previsibilidade, baixo custo e rapidez relativa.

3.4.2. Dermatite atópica induzida pela sensibilização epicutânea com ovalbumina (OVA)

A indução de DA pela sensibilização epicutânea repetida com ovalbumina (OVA) é um dos principais modelos utilizados uma vez que induz IgE específica para OVA e lesões eczematosas semelhantes às da DA. Na DA, células dendríticas inflamatórias da pele e as células de Langerhans, que possuem um receptor para IgE, levam à apresentação de antígenos. Dessa forma, por meio da IgE ligada ao receptor, essas células podem absorver alérgenos que causam respostas mediadas por IgE do tipo prompt e melhorar as respostas mediadas por células T do tipo tardio (NOVAK, 2012). A IgE específica para antígeno desempenha um papel essencial como estrutura de reconhecimento de alérgenos nos mastócitos (BIEBER, 2008). Frente a isso, a sensibilização mediada por IgE causa degranulação de mastócitos, e os grânulos liberados contribuem para sintomas alérgicos (NAKAMURA et al., 2013).

Diante disso, esse modelo de indução pode operar em diferentes linhagens de camundongos, como por exemplo, as linhagens BALB/c e C57BL/6 (SPERGEL et al., 1999). A pele dorsal dos animais é raspada e removida para fixar a fita adesiva com OVA, simulando dessa forma as lesões cutâneas como observados em pacientes com DA. Em vista disso, nesse modelo experimental, os animais recebem uma fita adesiva, fixada à pele com um curativo biooclusivo transparente, contendo 100 mg de OVA. Esse procedimento garante que o antígeno não seja acessível para lamber. Dessa forma, cada animal possui um total de três exposições em uma semana no mesmo local, sendo que as exposições são separadas por intervalos de duas semanas. Os camundongos sensibilizados apresentam aumento no comportamento de coçar e a pele apresenta lesões caracterizadas por espessamento epidérmico e dérmico, infiltração de linfócito T auxiliar (CD4) e eosinófilos. Ainda, é observada a expressão aumentada de citocinas Th2, como a IL-4, IL-5 e IL-13, com pouca ou nenhuma alteração na expressão IFN- γ .

3.4.3. Dermatite atópica induzida por superantígenos

Colonização ou infecção por *S. aureus* é uma das causas mais comuns de DA exacerbada. De fato, está bem evidenciado que as células Th1 e Th2 contribuem para a infecção bacteriana e conseqüentemente para as lesões de DA. Citocinas Th1 desempenham um papel importante na imunidade mediada por células e na inflamação crônica, em particular a expressão induzida por INF- γ das moléculas de MHC Classe I e II, as quais ativam monócitos e macrófagos, que desempenham papéis importantes na depuração bacteriana. Por sua vez, as citocinas Th2 têm um papel crítico no início da resposta alérgica na dermatite alérgica associada ao *S. aureus*, como a IL-4 que desempenha um papel importante como indutor da produção de IgE e como inibidor da depuração bacteriana (PENE et al., 1988; HULTGREN et al., 1998).

Estudos mostram que 90% dos pacientes com DA é colonizada por cepas de *S. aureus*, as quais produzem superantígenos, enquanto que apenas 5 a 10% dos indivíduos saudáveis são portadores desse microorganismo (ALY et al., 1977; MICHIE et al., 1996; BREUER et al., 2000). *S. aureus* pode desencadear inflamação alérgica produzindo exotoxinas com propriedades superantigênicas, como por exemplo, a enterotoxina estafilocócica A (SEA), enterotoxina estafilocócica B (SEB), enterotoxina estafilocócica C (SEC) e a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST) (BUNIKOWSKI et al., 1999; 2000; SKOV et al., 2000).

Em vista disso, no estudo de Lu et al., (2017), os autores induziram DA por meio da aplicação tópica de OVA e SEB em camundongos fêmeas da raça BALB/c. Dessa forma, a pele dorsal dos animais é raspada e removida sob anestesia de hidrato de cloral e posteriormente sensibilizada (24 horas após). Os camundongos recebem o curativo contendo OVA/SEB, nas doses de 1,25 μ g, 50 μ g, respectivamente. O adesivo cutâneo é trocado consecutivamente a cada dois dias por um total de oito vezes durante um período experimental de 15 dias. Os animais sensibilizados apresentaram acúmulo de células inflamatórias, aumento da espessura epidérmica e dos níveis séricos de IgE, bem como de citocinas associadas às células Th1 (INF- γ , TNF- α), citocinas associadas às células Th2 (IL-4, IL-31) e fator de crescimento nervoso associado ao prurido.

3.4.4. Dermatite atópica induzida pela aplicação de alérgeno de ácaro da poeira doméstica

Estudos clínicos demonstraram que o alérgeno do ácaro da poeira doméstica está associado à DA (KIMURA et al., 1998). De fato, a DA é uma doença inflamatória crônica da pele mediada por células T associada à hiper-reatividade cutânea a agentes ambientais que são inócuos para indivíduos não atópicos normais (HENNINO et al., 2007). Pacientes com DA desenvolvem células T e IgE específicas para aeroalérgenos (BIEBER e LEUNG, 2002). As lesões cutâneas na forma alérgica da DA são induzidas por células T específicas do alérgeno que se infiltram na pele no local da exposição ao alérgeno. Dessa forma, os ácaros da poeira doméstica *Dermatophagoides farinae* (Der f) e *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) são aeroalérgenos importantes na fisiopatologia da DA, uma vez que, 75% dos pacientes com DA apresentam reatividade ao teste de picada na pele e/ou IgE específica.

Frente a isso, esse modelo de indução pode ser aplicado em camundongos machos ou fêmeas de diferentes linhagens como, por exemplo, em camundongos machos NC/Nga ou camundongos fêmeas C57BL/6. O protocolo experimental pode variar dependendo da linhagem ou espécie dos animais. Diante disso, o protocolo experimental utilizando camundongos machos NC/Nga, de acordo com Hwang et al. (2019) ocorre da seguinte forma. Em um primeiro momento a pele dorsal dos animais é raspada e em seguida, uma solução dodecil sulfato de sódio a 4% (p/v) é aplicada na área raspada com o intuito de romper a barreira cutânea. Após 30 minutos as lesões cutâneas tipo DA são induzidas pela aplicação tópica de Biostir-DA, uma pomada à base de petrolato hidrofílico contendo extrato de ácaro da poeira doméstica. A pomada é aplicada duas vezes por semana durante um período de quatro semanas. Nesse estudo os animais induzidos aumentaram os escores das lesões de dermatite e apresentaram perda de água transepidérmica (TEWL).

Além disso, outros trabalhos revelaram que a aplicação epicutânea do extrato de ácaro da poeira doméstica pelo teste de atopia na pele provoca eczema em 30 a 50% desses pacientes com DA (LEUNG, 2000; BIEBER e LEUNG, 2002). Células T isoladas de lesões da pele de DA e locais de teste com adesivos de alérgenos respondem seletivamente a Der p, corroborando

com o conceito de que as respostas imunes na pele da DA são mediadas por células T específicas de alérgenos e podem ser ocasionadas por aeroalérgenos ambientais (SAMOCHOCKI et al., 2006).

Ainda, Hennino et al. (2007) avaliaram o papel dos linfócitos T citotóxico (CD8) e auxiliar (CD4) no desenvolvimento de lesões de pele com DA em um modelo animal de DA induzida por alérgenos. Os camundongos sensibilizados receberam uma solução de alérgeno protéico do extrato de ácaro da poeira doméstica Der f. Os autores observaram que as células T CD8 são recrutadas de forma rápida e transitoriamente para o local exposto ao alérgeno e iniciam o processo inflamatório que leva à infiltração da pele com eosinófilos e células produtoras de Th1/Th2, revelando que essas células são necessárias para o desenvolvimento de lesões semelhantes a DA em camundongos.

3.4.5. Dermatite atópica induzida por modelo animal geneticamente modificado/Camundongos transgênicos TSLP

A TSLP é uma proteína pertencente à família das citocinas, produzida principalmente por células epiteliais, incluindo queratinócitos epidérmicos. Essa citocina está altamente expressa nas lesões cutâneas de pacientes com DA, a qual está associada à ativação e migração de células dendríticas na derme (SOUMELIS et al., 2002). Dessa forma, uma das maneiras de caracterizar seu papel neste processo da doença, estudos vem sendo realizados no desenvolvimento de camundongos transgênicos que superexpressam TSLP. Os camundongos transgênicos demonstram que a TSLP pode iniciar uma cascata de inflamação alérgica na pele e fornece um modelo animal valioso para estudos desta patologia.

Diante disso, o protocolo experimental desse modelo é complexo e exige uma série de etapas. Primeiramente, TSLP de camundongos com codificação de cDNA é clonado em um vetor contendo um operador de tetraciclina heptamérica, promotor mínimo de CMV e íntron de β -globina de coelho. A inserção de tetO-TSLP é isolada e micro injetada em ovócitos. Posteriormente, os camundongos filhotes são avaliados quanto à incorporação de vetores através da amplificação por PCR do DNA genômico processado a partir de fragmentos de cauda. Seguidamente, os camundongos tetO-TSLP são

cruzados com camundongos K5-rtTA para gerar camundongos transgênicos TSLP específicos da pele induzíveis por tetraciclina (K5-rtTA/tetO-TSLP). Os camundongos K5-rtTA contêm o transativador reverso de tetraciclina (rtTA) sob o controle do promotor de queratina 5 (K5). Dessa forma, os filhotes são rastreados quanto à presença de K5-rtTA usando primers específicos.

Após o desmame, os animais contendo ambos os transgenes (referidos como K5-TSLP) são tratados com o análogo da tetraciclina, a doxíciclina (dox) a uma concentração de 1 mg/mL na água potável para induzir a transativação de rtTA do transgene TSLP. Os camundongos não-transgênicos e tetO-TSLP são incluídos no grupo controle. Transcorrido essas etapas, os camundongos são mantidos sob condições específicas, livres de patógenos, sem manipulação e submetidos a eutanásia 2 a 5 semanas de tratamentos com o dox (YOO et al., 2005).

Os camundongos K5-TSLP desenvolvem lesões de pele a partir de 2–3 semanas de tratamento com dox. As lesões consistem em eritema leve nas duas primeiras semanas, com progressão para alterações mais graves, como eritema, crostas e erosões, em 3 a 4 semanas. Além disso, por meio da análise histológica é possível observar alterações semelhantes às observadas na DA humana, incluindo acantose, espongiose, hiperqueratose e infiltração dérmica, caracterizadas por predominância de linfócitos, macrófagos e abundância de mastócitos e eosinófilos. Ainda, as lesões cutâneas desse modelo exibem um perfil de células Th2 com a regulação positiva de IL-4, IL-5 e TNF- α e níveis elevados de IgE e IgG1 e diminuição de IgG2 α .

3.5. Tratamentos farmacológicos

A DA tem um impacto significativo na qualidade de vida dos portadores, bem como de sua família ou naqueles que o rodeiam e, por isso, deve ser tratada de forma contínua para garantir e proporcionar o alívio da sintomatologia e das suas diversas manifestações (LIO et al., 2014). Atualmente a DA é uma doença sem cura e o tratamento consiste em melhorar os sintomas e controlar a doença a longo prazo, com base em linhas orientadoras e em planos de tratamento especializado e individualizado (EICHENFIELD et al., 2014; WEIDINGER et al., 2015). Frente a isso, as

terapias atuais visam controlar quatro pontos principais da patologia: reparação da barreira cutânea; supressão da resposta inflamatória; prevenção de fatores desencadeantes; ação em situações mais graves ou de insucesso às terapêuticas de base. Dentre os fármacos mais utilizados estão os corticosteroides tópicos e orais, anti-histamínicos e os imunossupressores (KIM et al., 2014; BIUME-PEYTAVI e METZ, 2012; ALEXANDER et al., 2019).

3.5.1. Corticosteroides tópicos e orais

Geralmente, o primeiro tratamento realizado pelo paciente para controlar as lesões causadas pela DA é o uso de corticosteroides de uso tópico. Os corticosteroides são considerados a primeira linha de tratamento no combate à inflamação na DA. O seu efeito anti-inflamatório verifica-se através da sua ação sobre as células do sistema imunitário (linfócitos T, monócitos, macrófagos, células dendríticas), o que influencia o processamento de antígenos e diminui a liberação de citocinas pro-inflamatórias (EICHENFIELD et al., 2014). Esses medicamentos proporcionam um alívio rápido do prurido, da inflamação e diminuem o risco de colonização por *S. aureus* (LYONS et al., 2015). Atualmente, os corticosteroides são categorizados em sete grupos, de acordo com a sua potência anti-inflamatória. O grupo I inclui os corticosteroides de potência mais elevada enquanto que o grupo VII os de potência mais baixa. Dessa maneira, a escolha do fármaco se baseia na severidade da doença, sendo os de potência elevada direcionados para as situações clínicas mais grave (BERKE et al., 2012).

Embora eficazes na DA, os corticosteroides devem ser criteriosamente escolhidos e utilizados com cuidado uma vez que apresentam inúmeros efeitos secundários quando empregados incorretamente. A incidência dos efeitos secundários relaciona-se com a potência do corticosteroide. De fato, os corticosteroides potentes, quando aplicados em áreas extensas ou por um tempo prolongado, podem ser absorvidos para a corrente sanguínea e ocasionar, rachaduras, sangramentos, reabsorção óssea e renal e inibição da função das glândulas suprarrenais (TAN e GONZALES, 2010; MANUAL MERCK, 2011; TOLLEFSON et al., 2014; LYONS et al., 2015).

3.5.2. Imunossupressores

Os fármacos imunossupressores administrados por via oral são necessários quando as exacerbações da doença são recorrentes e quando a qualidade de vida do indivíduo se encontra seriamente afetada com risco elevado de desenvolver efeitos secundários. Os imunossupressores inibem a ação das células T impedindo a liberação de citocinas pro-inflamatórias, sendo considerados de segunda linha no tratamento da DA (TOLLEFSON et al., 2014; LIO et al., 2014). A ciclosporina é um dos fármacos mais estudados para a DA moderada a severa e ocupa a 1ª linha na medicação sistêmica para a doença, quando anti-histamínicos orais não aliviam os sintomas. Esse fármaco inibe a produção de IL-2 e a proliferação de linfócitos T, impedindo o fenômeno inflamatório. Como a janela terapêutica deste fármaco é muito estreita, é requerido um monitoramento mais próximo da evolução clínica do indivíduo, devido aos efeitos adversos que possam advir como hipertensão arterial, nefrotoxicidade/insuficiência renal, cefaleias e alterações gastrointestinais (NOTARO et al., 2015; WOLLENBERG et al., 2016; MEGNA et al., 2017). Além da ciclosporina, ensaios clínicos de curto e longo prazo demonstraram que os medicamentos tacrolímus e o pimecrolímus são eficazes e seguros para o tratamento da DA, uma vez que diminuem a inflamação e o prurido associado às lesões eczematosas (TOLLEFSON et al., 2014; LIONS et al., 2015). No entanto, indícios relacionam o seu uso com um aumento da incidência de neoplasias quando os indivíduos são expostos à radiação ultravioleta (BERKE et al., 2012).

3.5.3. Anti-histamínicos

O prurido representa um dos sintomas clínicos mais importantes e recorrentes da DA e por este motivo leva ao agravamento das lesões e perpetua a inflamação cutânea (TOLLEFSON et al., 2014; LYONS et al., 2015). Dessa forma, pode ser acrescida terapia sistêmica adjuvante, por meio do uso dos anti-histamínicos orais (WOLLENBERG et al., 2014). Tem-se verificado um aumento da sua prescrição na DA, contudo estudos recentes e controlados encontram poucas evidências para a eficácia destes medicamentos como parte do tratamento da DA, talvez porque a histamina não é a única citocina

envolvida no prurido associado à doença. Assim, este tipo de fármacos, principalmente os do tipo sedativo são pretendidos apenas para uso esporádico e a curto prazo dirigido ao alívio do prurido intenso que afeta a qualidade do sono do indivíduo com DA (NOTARO et al., 2015; EICHENFIELD et al., 2017).

3.5.4. Anticorpos monoclonais

Os anticorpos monoclonais produzidos por tecnologia de DNA recombinante, são responsáveis por bloquear a função da IgE (omalizumab) (KIM et al., 2014). No ano de 2017, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) aprovou no Brasil uma terapia inédita para a DA, o dupilumab, o qual é um anticorpo monoclonal totalmente humano dirigido contra a subunidade α (IL-4R α) do receptor IL-4 que inibe a sinalização de IL-4 e IL-13. Embora outros produtos biológicos, como o omalizumab (anticorpo monoclonal anti-IgE), ustekinumab (anticorpo monoclonal anti-IL-12/IL-23), mepolizumab (anticorpo monoclonal anti-IL-5), BMS-981164 (anticorpo monoclonal anti-IL-31), lebrikizumab (anticorpo monoclonal anti-IL-13) e CIM331 (anticorpo monoclonal anti-IL-31) foram ou estão atualmente sendo investigados para DA, o dupilumab é o único até à data que avançou para estudos clínicos de fase III para o tratamento da DA (HAMILTON et al., 2015).

3.6. Novas estratégias terapêuticas para a dermatite atópica e comorbidades associadas

O desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento de inflamação tem se intensificado nos últimos anos. De fato, o restabelecimento da barreira cutânea, a inibição da resposta inflamatória e o decréscimo do prurido são fatores chaves para o controle da doença. Em vista disso, nosso grupo de pesquisa tem dedicado esforços na busca de novas moléculas para o tratamento da DA (ALVES et al., 2016; VOSS et al., 2018; WEBER et al., 2018; GULARTE et al., 2019). Frente a isso, os compostos derivados de piridina e orgânicos de selênio tem atraído a atenção no desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que estes revelam diferentes atividades biológicas.

Desde o início do século XX, os derivados de piridina têm sido comercialmente importantes, pois esses compostos estão presentes em

diversos produtos agrícolas, como herbicidas, inseticidas, fungicidas e em polímeros (SCRIVEN et al., 2005). Além disso, os derivados de piridina tornaram-se um alvo interessante em 1930 para o tratamento de dermatites e demências (HENRY et al., 2004). Em vista disso, o estudo destas moléculas se intensificou nos últimos anos e atualmente os compostos de piridina apresentam ações anti-inflamatórias (MÁRQUEZ-FLORES et al., 2011), antitumorais (XI et al., 2017), antimicrobiana (NAGENDER et al., 2014), antioxidante (WORACHARTCHEEWAN et al., 2012), entre outras (CHALLA et al., 2014; LEE et al., 2017; UMEI et al., 2017).

Por sua vez, os compostos orgânicos de selênio vêm sendo largamente estudados, tanto pela síntese orgânica quanto em sistemas biológicos. Vários motivos levam ao estudo dessas moléculas, seja pelas diversas propriedades farmacológicas apresentadas ou pela maior biodisponibilidade e comumente menor toxicidade frente a sua forma inorgânica (NOGUEIRA e ROCHA, 2011; KIM e MAHAN, 2001). O elemento essencial selênio (Se) é de fundamental importância para o organismo, uma vez que desempenha um papel importante nos processos inflamatórios e na imunidade (HUANG et al., 2012). A literatura aponta inúmeras evidências dos efeitos de moléculas contendo selênio. Em estudos com modelos animais, os compostos orgânicos de selênio revelaram ações anti-inflamatória, antinociceptiva (CHAGAS et al., 2014; PINZ et al., 2017; SILVA et al., 2017, VOSS et al., 2018), antioxidante (WILHELM et al., 2017, VOGT et al., 2018a) e comportamento ansiolítico em camundongos (REIS et al., 2017).

Em vista disso, uma pesquisa bibliográfica indica que apenas poucas publicações mencionam a incorporação de um átomo de selênio no núcleo da piridina (LUCHESE et al., 2012; KUMAR et al., 2016; ROSA et al., 2018). Consequentemente, a síntese e a triagem biológica de derivados da selenopiridina podem ser consideradas uma área de pesquisa relevante. Nesse sentido, a síntese do composto BAPD, um derivado de piridina contendo selênio revelou ser uma substância com grande potencial farmacológico (Figura 6). Em ensaios biológicos preliminares, o BAPD inibiu significativamente a atividade da acetilcolinesterase (AChE) no córtex cerebral. Além disso, este composto apresentou atividade eliminadora de radicais ABTS,

sugerindo que o BAPD tem um potencial importante para agir contra o estresse oxidativo e como um inibidor da atividade da AChE (PEGLOW et al., 2017).

Recentemente, Reis et al. (2019) demonstraram que o BAPD exibiu efeitos antinociceptivos e anti-hiperalgésicos e não alterou a atividade locomotora nem induziu toxicidade. Além disso, foi estabelecido que os efeitos da BAPD parecem dever-se às ações antioxidantes e anti-inflamatórias e à modulação dos sistemas opióide e glutamatérgico. Ainda, o BAPD apresentou ação anti-inflamatória através da redução dos níveis de expressão ciclooxigenase-2 (COX-2) e INF- γ e na melhora dos parâmetros histológicos em camundongos. Diante deste contexto e do nosso interesse na busca de novas alternativas de tratamento para a DA, esse composto parece ser um importante alvo de estudo e pode representar uma importante estratégia terapêutica para o tratamento da DA e comorbidades associadas a essa patologia. De fato, os tratamentos utilizados na DA visam somente tratar as lesões cutâneas ocasionadas pela doença. Esses tratamentos são utilizados normalmente por via tópica e não visam tratar as comorbidades associadas a esta patologia, como por exemplo, a ansiedade e depressão.

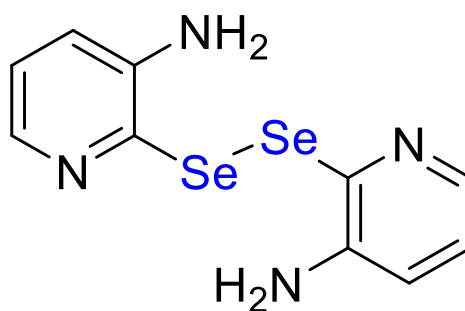


Figura 6. Estrutura química do BAPD.

4. Manuscrito científico

Os resultados que fazem parte dessa dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito científico. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências, encontram-se estruturados de acordo com as normas do periódico *Clinical immunology*. O presente manuscrito encontra-se submetido a esta revista científica.

Bis-(3-amino-2-pyridine) diselenide improves psychiatric disorders – atopic dermatitis comorbidity by regulating inflammatory and oxidative status

Caren A. R. da Fonseca^a, Angélica S. dos Reis^a, Mikaela P. Pinz^a, Thiago J. Peglow^b,
Ricardo F. Schumacher^b, Gelson Perin^b, Amanda W. S. Martins^c, William B.
Domingues^c, Vinicius F. Campos^c, Mauro P. Soares^d, Cristiane Luchese^{a*}, Ethel A.
Wilhelm^{a*}

^a Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Laboratório de Pesquisa em Farmacologia Bioquímica (LaFarBio), Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia (GPN), Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, CEP 96010-900, RS, Brasil. ^b Programa de Pós-graduação em Química, Laboratório de Síntese Orgânica Limpa - LASOL - CCQFA - Universidade Federal de Pelotas, UFPel - CEP - 96010-900, Pelotas, RS, Brasil. ^c Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Laboratório de Genômica Estrutural do Centro de Desenvolvimento Tecnológico - CDTec - Universidade Federal de Pelotas, UFPel - CEP - 96010-900, Pelotas, RS, Brasil. ^d Laboratório Regional de Diagnóstico, Faculdade de Veterinária - Universidade Federal de Pelotas, UFPel - CEP - 96010-900, Pelotas, RS, Brasil.

* Address for correspondence

Ethel Antunes Wilhelm - Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção, CCQFA, UFPel, Campus Capão do Leão, Pelotas, CEP 96010-900, RS, Brasil; E-mail: ethelwilhelm@yahoo.com.br; Phone: 55-53-32757360.

Cristiane Luchese - Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção, CCQFA, UFPel, Campus Capão do Leão, Pelotas, CEP 96010-900, RS, Brasil; E-mail: cristiane_luchese@yahoo.com.br; Phone: 55-53-32757360.

Abstract

Atopic dermatitis (AD) is a complex and multifactorial pathology that negatively impacts the physical and mental health of carriers. Here, the suppressive effect of bis (3-amino-2-pyridine) diselenide (BAPD) on an AD model in BALB/c mice was investigated. To sensitize the animals, 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) was applied to their dorsal skin on days 1–3. Mice were challenged with DNCB on their ears and dorsal skin on days 14, 17, 20, 23, 26, and 29. BAPD (1 or 5 mg/kg) and Dexamethasone (5 mg/kg) were orally administered to the animals, from days 14 to 29, and skin severity scores and behavioral tests (scratching behavior, elevated plus-maze and tail suspension tests) were determined on day 30. Oxidative stress and inflammatory parameters were evaluated on the dorsal skin of mice. Na^+ , K^+ -ATPase activity and corticosterone levels were determined in hippocampus /cerebral cortex and plasma of mice, respectively. DNCB increased the severity of skin lesions, scratching behavior, inflammation and oxidative stress. BAPD improved cutaneous damage, scratching behavior, inflammatory (ear edema, cytokine levels, myeloperoxidase activity and histopathological alterations) and oxidative stress (reactive species, thiobarbituric acid reactive species and non-protein thiol levels, and superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione S-transferase activities) markers. BAPD showed anxiolytic- and antidepressant-like effects and restored Na^+ , K^+ -ATPase activity and corticosterone levels in mice exposed to DNCB. The efficacy of BAPD was similar, or superior, to Dexamethasone in the parameters evaluated. Our data demonstrated the suppressive effect of BAPD on psychiatric disorders – AD comorbidity by regulating inflammatory and oxidative status in mice.

Keywords: Inflammation; Oxidative stress; Depression; Anxiety; 2,4-Dinitrochlorobenzene.

Abbreviations: BAPD, bis(3-amino-2-pyridine) diselenide; AD, Atopic dermatitis; DNCB, 2,4 Dinitrochlorobenzene; AChE, acetylcholinesterase; MPO, myeloperoxidase; ROS, reactive oxygen species; RS, reactive species; TBARS, thiobarbituric acid reactive species; GST, glutathione S-transferase; SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase; GPx, glutathione peroxidase; GR, glutathione reductase; NPSH, non-protein thiol; COX-2, cyclooxygenase-2; OFT, open-field test; EPM, elevated plus-maze test; TST, tail suspension test; TNF α , tumor necrosis factor; INF- γ , interferon- γ ; Interleukin 33, IL-33; Interleukin 18, IL-18; Interleukin 1 β , IL-1 β ; Interleukin 10, IL-10.

1. Introduction

Atopic dermatitis (AD) is the most common kind of skin allergy, clinically manifested by itching and scratching, dry skin, patchy eczema especially flexural, exudation, and skin thickening [1]. The prevalence of atopic diseases is increasing significantly especially in developed countries, with a female preponderance [2]. AD has an early onset, usually in infancy or early childhood, and it can regress spontaneously after puberty in some patients, but persist lifelong in others [3]. Indeed, since 2013 the high incidence of AD in children and adults has made it one of the most onerous skin disorders globally [4]. Given the prevalence and complexity of AD, little attention has been given to the risk of non-allergic comorbidities of AD, such as neuropsychiatric conditions. AD is associated with a poor quality of life, and comorbidities secondary to severe itch [5]. The incidence of psychiatric disorders among dermatological patients is approximately between 30% and 40% [6].

The exact etiology of the disease remains undefined; however, it is accepted that AD is a multifactorial and complex pathology that manifests an overactive immune response. Genetic susceptibility, environmental factors, epithelial barrier dysfunction, immunologic response deregulation, inflammation and oxidative stress have been implicated in AD pathogenesis [7, 8]. For years the mainstay of treatment for AD has been the use of topical anti-inflammatory agents such as glucocorticoids, cyclosporin and dexamethasone [9]. However, the success rate is very low. These drugs do not completely relieve symptoms and comorbidities associated with AD and they can lead to several adverse effects, such as nephrotoxicity, hypertension, osteoporosis and diabetes [10]. In this sense greater understanding is required to help elucidate how psychiatric disorders – AD comorbidity occurs and aids in the development of novel therapeutic agents.

Thus, in this scenario, we highlight the bis (3-amino-2-pyridine) diselenide (BAPD), an organoselenium compound obtained by simple and environmentally benign protocols, since it has shown great pharmacological potential for the treatment of oxidative stress- and inflammatory-related diseases [11, 12]. Results obtained after preliminary biological assays showed that BAPD has an important potential to act against oxidative stress and as an inhibitor of acetylcholinesterase activity [11]. Importantly, we have recently demonstrated that the modulation of cyclooxygenase-2, interferon- γ , glutamatergic and opioid systems contributes to antinociceptive, anti-inflammatory and anti-hyperalgesic effects of BAPD [12]. In addition, BAPD did not cause death or elicit any sign of acute toxicity in mice [12]. Therefore, considering the beneficial properties of BAPD, and the lack of effective treatments for AD and its comorbidities, we examined the hypothesis that BAPD would show suppressive effects on AD-like skin lesions induced by 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) in mice, improving the associated anxiety and depression by reducing inflammatory of inflammatory and oxidative status.

2. Materials and methods

2.1. Animals and ethical approval

The experiments were carried using female BALB/c mice (6-8 weeks old). Studies have shown that females have a higher prevalence of eczema or AD compared with men [13]. Animals were kept in a separate animal room, in a 12/12 h light/dark cycle (with lights on at 6:00 a.m.), at a room temperature of $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, with free access to food and water. The behavioral assays were conducted according to the institutional and national guidelines for the care and use of animals. The present experimental study

was approved by the Ethical Research Committee of the Federal University of Pelotas (CEEA 23357-2018) and all efforts were taken to minimize the mice suffering.

2.2. Chemicals and drugs

DNCB was obtained commercially from Sigma (St. Louis, MO) and it was used as an inductor of AD. BAPD (Figure 1A) was prepared and characterized in our laboratory and analysis of the ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra showed analytical and spectroscopic data in full agreement with its assigned structure. The chemical purity of BAPD (99.9 %) was determined by GC/MS [11]. Dexamethasone was obtained commercially, and it was used as a reference drug. BAPD was dissolved in canola oil, while Dexamethasone was dissolved in 0.9% saline solution. Mice received oral (p.o.) treatment of BAPD, Dexamethasone or canola oil by intragastric gavage.

2.3. Experimental design

The experimental protocol was realized according to the method described by Chan et al. [14]. AD-like skin lesions in mice were induced by DNCB. Mice were shaved of dorsal hair and 200 μL of 0.5 v/v-% DNCB in acetone/olive oil (3:1 ratio) was applied in the shaved area on experimental days 1-3 for sensitization. Mice were challenged with 20 μL of 1 v/v-% DNCB on the ear and 200 μL on the dorsal skin on days 14, 17, 20, 23, 26, and 29 (Figure 1B). Mice were randomly divided into five groups (n = 7 animals/group): normal control mice (control group) were sensitized and challenged with acetone/olive oil (3:1) and treated with canola oil; sensitized control mice (DNCB group) were sensitized and challenged with DNCB and treated with canola oil; and experimental mice were sensitized and challenged with DNCB and received the treatment with BAPD, at the doses of 1 mg/kg or 5 mg/kg, or

Dexamethasone, at dose of 5 mg/kg, (groups designated as Control; DNCB; DNCB + BAPD 1 mg/kg; DNCB + BAPD 5 mg/kg; DNCB + Dexa 5 mg/kg). The BAPD and Dexamethasone were administered by gavage, daily, from days 14 to 29. To compare with the BAPD effect, Dexamethasone was tested at the dose of 5 mg/kg.

2.4. Clinical symptoms of AD

2.4.1. Clinical skin severity scores

On day 30, the skin was photographed and severity scores were determined according to Park et al. [15]. The five signs of skin lesions were: (1) pruritus/itching, (2) erythema/hemorrhage, (3) edema, (4) excoriation/erosion, and (5) scaling/dryness. The above-mentioned symptoms were graded as follows: 0 (no symptoms), 1 (mild), 2 (moderate), and 3 (severe).

2.4.2. Scratching behavior

To evaluate AD-like behavioral changes, the scratching behavior was evaluated on day 30. During 20 min, the time that mice spent rubbing their nose, ears, and dorsal skin with their hind paws was recorded. The results obtained were expressed in seconds (s) [16].

2.5. Comorbidities associated with AD

2.5.1. Open-field test (OFT)

The OFT evaluated the locomotor and exploratory behaviors of mice. This test was carried out to excluding sedative effect or motor abnormality after treatments with DNCB, BAPD, and Dexamethasone, which can lead to unspecific results in the tests. The open-field was made of plywood and surrounded by 30 cm-high walls. The floor of

the open-field, 45 cm long and 45 cm wide, was divided by masking tape markers into 9 squares (3 rows of 3). Each animal was placed individually at the center of the apparatus and observed for 4 min period to record the locomotor (number of segments crossed with the four paws) and exploratory (expressed by the number of time rearing on the hind limbs) activities. The arena was cleaned with 20-30% ethanol after each session and individual mice were tested only once [17].

2.5.2. Elevated plus-maze test (EPM)

Described by Pellow et al. [18], the EPM test was realized on day 30, to measure anxiety in rodents. The EPM apparatus consists of two opposed open arms (16 cm x 5 cm) and two opposed closed arms (16 cm x 5 cm x 10 cm) mounted at an angle of 90, all facing a central platform (5 cm x 5 cm) elevated 50 cm from the floor. Each animal was placed individually at the center of the apparatus facing one of the open arms. The number of entries into either open or closed arms and the time spent in the open arms were measured for 5 min. The anxiolytic effect is proved by an increased in the parameters of the open arms.

2.5.3. Tail suspension test (TST)

The TST was accomplished as described by Steru et al. [19], with some modifications. Mice were suspended 50 cm above the ground by an adhesive tape placed approximately 1 cm from the tip of the animal's tail. Mice were considered immobile only when they hung passively and completely motionless. Immobility time was manually recorded during a 6 min period by an experienced observer. A decrease in the duration of immobility is an indicative of antidepressant-like effect.

2.6. *Ex vivo* assays

After the behavioral tests, on day 30, mice were euthanized by inhalation of isoflurane anesthetic. Ears samples were collected to determine ear swelling and myeloperoxidase (MPO) activity. Dorsal skin samples were collected to determine MPO activity, histological analysis and tumor necrosis factor (TNF α), interferon- γ (INF- γ), interleukin (IL)-33, IL-18, IL-1 β and IL-10 expression. Furthermore, the oxidative stress markers, such as reactive species (RS), thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and non-protein thiol (NPSH) levels, and superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione S-transferase (GST) activities were evaluated. Additionally, the Na⁺, K⁺-ATPase activity (in hippocampus and cerebral cortex) and corticosterone levels (in plasma) were determined.

In this sense, for analyses of oxidative stress parameters and Na⁺, K⁺-ATPase activity, dorsal skin, hippocampus and cerebral cortex samples were homogenized in 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1:10 (w/v). The homogenate was centrifuged at 2000 rotation per minute (rpm) for 10 min to yield a supernatant (S1). For measuring MPO activity the ears and dorsal skin fraction were minced, pooled and homogenized in PBS (20 mmol/L, pH 7.4) containing ethylenediaminetetraacetic acid (0.1 mmol/L). The homogenates were centrifuged at 2000 rpm for 10 min at 4°C (fraction S1). Then, the S1 fraction was centrifuged again at 14000 rpm at 4°C for 15 min to yield a final pellet (P2) that was resuspended in medium containing potassium phosphate buffer (50 mmol/L, pH 6.0) and hexadecyltrimethyl ammonium bromide (0.5 wt/v-%). Samples were finally frozen and thawed three times prior to the posterior enzymatic assay. Specifically, for the measuring of corticosterone levels, blood plasma were collected by

cardiac puncture. The heparin was used as an anticoagulant. For plasma separation, the blood was centrifuged at 4000 rpm for 10 min at 4°C.

2.6.1. Inflammatory parameters

2.6.1.1. Ear swelling

The ear swelling was evaluated on day 30, after behavioral tests. For this, the mice were euthanized and both ears were cut at the base and the weight difference between the samples of the control ear (left) and the DNCB-treated ear (right) was established on an analytical balance. The results obtained were represented in weight (mg). Subsequently, ears were used to determine the MPO activity.

2.6.1.2. MPO assay

MPO activity was assayed according to the method previously described with some modifications [20]. For the MPO activity measurement, an aliquot of resuspended P2 (100 µL) was added to a medium containing the medium of resuspension and N,N,N',N'-tetramethylbenzidine (1.5 mmol/l). The kinetic analysis of MPO was started after the addition of H₂O₂ (0.01 v/v %), and the color reaction was measured at 655 nm at 37°C. Results were expressed as optic density (OD)/mg protein/min.

2.6.1.3. Histological analysis

Dorsal skin fragments were collected and fixed in 10% buffered formalin solution. Minor fragments were routinely processed, embedded in paraffin, cut into sections of 3-4 µm, stained with hematoxylin-eosin (HE) and examined under an optical microscope.

2.6.1.4. RNA extraction and expression of TNF- α , IFN- γ , IL-33, IL-18, IL-10, IL-1b by real-time PCR

Total mRNA was extracted from thawed samples of back skin weighing between 50-70 mg using TRIzol reagent (Invitrogen™, Carlsbad, USA) followed by DNase treatment with DNase I Amplification Grade (Invitrogen™, Carlsbad, USA) in order to ensure minimum DNA contamination of the samples. The total RNA isolated was quantified and its purity (260/280 and 260/230 ratios) was examined by spectrophotometer NanoVue (GE, Fairfield, CT, USA).

The cDNA synthesis was performed using High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (AppliedBiosystems™, UK) according to the manufacturer's protocol. For reverse transcription, 2 μ g of total RNA was used in a reaction volume of 20 μ L. The amplification was made with GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI) using the Agilent Mx3005P qPCR System (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA) and the sequence of primers used are indicated in Table 1. The qPCR conditions were as follows: 10 min at 95°C to activate the hot-start Taq polymerase, followed by 35 cycles of denaturation for 15s at 95°C, primer annealing for 60s at 60°C, and extension for 30s at 72°C (fluorescence signals were detected at the end of every cycle). Baseline and threshold values were automatically set by the Stratagene MxPro software.

The number of PCR cycles required to reach the fluorescence threshold in each sample was defined as the Ct value, and each sample was analyzed in duplicate to obtain an average Ct for each sample. The $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method was used to normalize the fold change in gene expressions, using the Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as housekeeping gene [21-28].

2.6.2. Oxidative stress parameters

2.6.2.1. RS levels

The RS levels in the back were determined using a spectrofluorimetric method, using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCHF-DA) assay according to Loetchutinat et al. [29], with some changes. S1 (50 μ L) was incubated with 20 μ L of DCHF-DA (1 mM) and 2430 μ L of 10 mM Tris-HCl pH 7.4. The oxidation of DCHF-DA to fluorescent dichlorofluorescein (DCF) was measured for the detection of intracellular RS. The DCF fluorescence intensity emission (EM) was recorded at 525 nm (with 488 nm excitation (EX)), 30 min after the addition of DCHF-DA to the medium. RS levels were expressed as arbitrary units of fluorescence (UF).

2.6.2.2. TBARS levels

TBARS levels, which measure of lipid peroxidation, were determined as described by Ohkawa et al. [30]. An aliquot (200 μ L) of S1 was incubated with 0.8% thiobarbituric acid, acetic acid buffer pH 3.4 and 8.1% sodium dodecyl sulfate at 95 °C for 2 h. The color reaction was measured at 532 nm. TBARS levels were expressed as nmol MDA/mg protein.

2.6.2.3. NPSH levels

NPSH levels were determined by the method of Ellman [31]. A sample of S1 was mixed (1:1, v/v) with 10% trichloroacetic acid. The samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 min. After the centrifugation, the protein pellet was discarded and free-thiol groups were determined in the clear supernatant. An aliquot of supernatant (200 μ L) was added in 1 M potassium phosphate buffer pH 7.4 and 10 mM 5,5'-dithiol-bis

(2-nitrobenzoic acid). The color reaction was measured at 412 nm. NPSH levels were expressed as $\mu\text{mol NPSH/g tissue}$.

2.6.2.4. SOD activity

This method is based on the capacity of SOD in inhibiting autoxidation of epinephrine. The SOD activity was spectrophotometrically determined as described by Misra and Fridovich [32] and the color reaction was measured at 480 nm. The S1 (6, 12 or 18 μL) was added in a 50 mM Na_2CO_3 buffer pH 10.3. Enzymatic reaction was started by adding epinephrine (30 μL). One unit of the enzyme was defined as the amount of enzyme required to inhibit the rate of epinephrine autoxidation by 50% at 26°C. The enzymatic activity was expressed as U/mg protein.

2.6.2.5. CAT activity

The CAT activity was spectrophotometrically determined by the method of Aebi [33], which involves monitoring the disappearance of hydrogen peroxide (H_2O_2) in the homogenate presence at 240 nm. The enzymatic reaction was initiated by adding an aliquot of S1 (100 μL) and the substrate (H_2O_2 , 105 μL) to a concentration of 0.3 mM in a medium containing 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0. The enzymatic activity was expressed as U CAT/mg protein (1 U decomposes 1 μmol of H_2O_2 per minute at pH 7.0 and 25°C).

2.6.2.6. GPx activity

GPx activity was determined through the system composed by reduced glutathione (GSH), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), and glutathione reductase (GR), by the dismutation of H_2O_2 . The activity was

spectrophotometrically measured at 340 nm, according to with method of Wendel [34]. S1 (50 μ L) was added in GSH/NADPH/GR system and the enzymatic reaction was initiated by adding H_2O_2 (100 μ L). In this assay, the enzyme activity is indirectly measured through NADPH decay. H_2O_2 is decomposed, generating oxidized glutathione (GSSG) from GSH. GSSG is regenerated back to GSH by GR present in the assay media at the expense of NADPH. The enzymatic activity was expressed as nmol/min/mg protein.

2.6.2.7. GR activity

The GR activity was measured as described by Carlberg and Mannervik [35]. In this assay, GSSG is reduced by GR at the expense of NADPH consumption, which is recorded at 340 nm. GR activity is proportional to NADPH decay. The enzymatic activity was expressed as nmol/min/mg protein.

2.6.2.8. GST activity

The GST activity was assayed by the methodology described by Habig et al. [36]. This method is based on the principle that the GST enzyme catalyzes the conjugation of DNCB with GSH, originating a thioether, which was quantified spectrophotometrically at 340 nm. An aliquot of S1 was added in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.4, with DNCB, as substrate, and 50 mM GSH. The enzymatic activity was expressed as nmol DNCB conjugated/min/mg protein.

2.6.3. Corticosterone levels in plasma

The determination of the plasmatic corticosterone levels was performed according to method Zenker [37]. Aliquots of plasma were incubated with chloroform

and centrifuged for 5 min at 2500 rpm, followed by the addition of 0.1 M NaOH and another round of centrifugation. Then, was the addition of the fluorescence reagent (H_2SO_4 and ethanol 50%) and samples were centrifuged again (5 min at 2500 rpm) and incubated at room temperature for 2h. Fluorescence intensity emission (EM), corresponding to plasma corticosterone levels, was recorded at 540 nm (with 247 nm excitation (EX)). Corticosterone levels were expressed as ng/mL.

2.6.4. Na^+ , K^+ -ATPase activity

For the Na^+ , K^+ -ATPase activity assay in the hippocampus and cerebral cortex, a reaction mixture was used containing S1, 3 mM MgCl, 125 mM NaCl, 20 mM KCl and 50 mM Tris/HCl, pH 7.4, in a final volume of 500 μL . The reaction was initiated by the addition of 3 mM ATP. Control samples were carried out under the same conditions with the addition of 0.1 mM ouabain. The samples were incubated at 37°C for 30 min and incubation was stopped by adding trichloroacetic acid (10%) with 10 mM HgCl_2 . Na^+ , K^+ -ATPase activity was calculated by the difference between the two assays. Released inorganic phosphate (Pi) was measured according to the method described by Fiske and Subbarow [38]. The color reaction was assayed spectrophotometrically at 650 nm. Results were expressed as nmol Pi/mg protein/min.

2.6.5. Protein determination

The protein concentration was measured by the method of Bradford [39], using bovine serum albumin as the standard.

3. Statistical analysis

The normality of data was evaluated by the D'Agostino and Pearson omnibus normality test. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5.0. Data were analysed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test when appropriated for parametric data. Data from the experiments were expressed as means $\pm$ standard error medium (S.E.M.). Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1. BAPD reduces the clinical symptoms of AD induced by DNCB

DNCB exposure produced AD-like symptoms in BALB/c mice (ANOVA: $F_{(4, 30)} = 31.45$, $p < 0.0001$) (Figures 2A and 2B) and increased the scratching time of animals (554%) (ANOVA: $F_{(4, 30)} = 33.50$, $p < 0.0001$) (Figure 2C). BAPD treatment, at the doses evaluated, was effective in reducing the severity of skin lesions induced by DNCB (Figure 2B). In turn, Dexamethasone, at the dose of 5 mg/kg, did not alter the severity of lesions induced by DNCB (Figure 2B). In addition, a reduction was found in the scratching time of mice after the BAPD (1 and 5 mg/kg) or Dexamethasone (5 mg/kg) treatment. (Figure 2C). The protective effect of the BAPD on scratching time was similar to that of Dexamethasone.

3.2. BAPD improves the neuropsychiatric disorders associated with AD by regulating corticosterone levels and Na^+ , K^+ -ATPase activity

The results of the present study revealed that DNCB changed the behavioral parameters in the EPM and TST in mice. In the EPM test, DNCB decreased the number of entries (Figure 3A) and the time spent in the open arms (Figure 3B) when compared with the control group. BAPD (1 and 5 mg/kg) and Dexamethasone (5 mg/kg) increased

the number of open arm entries when compared with the DNCB group (ANOVA: $F_{(4, 30)} = 10.01, p < 0.0001$) (Figure 3A). In addition, analysis of the results indicated that BAPD, (1 and 5 mg/kg) and Dexamethasone (5 mg/kg), increased the time in the open arms when compared with the DNCB group (ANOVA: $F_{(4, 30)} = 6.15, p < 0.001$) (Figure 3B). Figure 3C showed that the immobility time of mice in the TST was decreased by BAPD (1 and 5 mg/kg), when compared with the DNCB group (ANOVA: $F_{(4, 30)} = 12.94, p < 0.0001$). Dexamethasone (5 mg/kg) treatment decreased the immobility time when compared with the DNCB group (Figure 3C). The protective effect of BAPD was similar to that of Dexamethasone (Figures 3A, 3B and 3C).

OFT results are illustrated in Figures 3D and 3E. The data analysis of the OFT revealed that the treatments did not produce any change in the number of crossings (ANOVA: $F_{(4, 30)} = 2.63, p > 0.05$) or rearings (ANOVA: $F_{(4, 30)} = 1.74, p > 0.05$) (Figures 3D and 3E).

Plasma corticosterone levels were determined to identify the mechanisms that could contribute to psychiatric disorders in AD-like skin lesions induced by DNCB. Increased levels of corticosterone were detected in the plasma of mice exposed to DNCB, when compared with the control group (ANOVA: $F_{(4, 30)} = 4.62, p < 0.01$). According to the results, the treatment with BAPD, at the dose of 5 mg/kg, reversed the increase in corticosterone levels by 41%. No alteration of plasma corticosterone levels of mice exposed to DNCB and treated with BAPD (1 mg/kg) or Dexamethasone (5 mg/kg) was observed (Figure 3F).

Data examination revealed an inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase activity in the hippocampus and cerebral cortex of the mice exposed to DNCB, when compared with the control group (Figures 3G and 3H). In the hippocampus, none of the treatments was able to prevent the inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase activity induced by DNCB (ANOVA:

$F_{(4, 30)} = 3.39, p > 0.05$) (Figure 3G). Results displayed in Figure 3H demonstrated that BAPD (1 and 5 mg/kg) treatment restored the Na^+, K^+ -ATPase activity in the cerebral cortex of mice, when compared with the DNCB group (ANOVA: $F_{(4, 30)} = 4.70, p < 0.01$). The protective effect of BAPD was similar to that of Dexamethasone (Figure 3H).

3.3. Anti-inflammatory effect of BAPD contributes to its suppressive effect on AD-like skin lesions

Figure 4A illustrates the effects of BAPD treatment on ear swelling in mice (ANOVA: $F_{(4, 30)} = 29.01, p < 0.0001$). DNCB substantially increased (700 %) right-ear swelling when compared with the control group. BAPD (1 and 5 mg/kg) or Dexamethasone (5 mg/kg) treatment partially reduced the ear swelling induced by DNCB. The protective effect of BAPD (5 mg/kg) was similar to that of Dexamethasone.

Effects of BAPD oral administration on the MPO activity in the ear and on the dorsal skin of mice were demonstrated in Figures 4B and 4C (ANOVA: $F_{(4, 30)} = 12.13, p < 0.0001$ (ear); ANOVA: $F_{(4, 30)} = 4.44, p < 0.01$ (back)). One-way ANOVA demonstrated that DNCB significantly increased the MPO activity in ear and dorsal skin of mice, when compared with the control group (Figures 4B and 4C). Analysis of the data revealed that treatment with BAPD (1 and 5 mg/kg) or Dexamethasone (5 mg/kg) restored ear MPO activity (Figure 4B). The effect of BAPD on ear MPO activity was similar to that of Dexamethasone.

Figure 4C showed that treatment with BAPD (1 and 5 mg/kg) protected against the increase in MPO activity on dorsal skin exposed to DNCB. The animals that received BAPD presented a reduction (88%) of the inflammation induced by DNCB.

However, Dexamethasone (5 mg/kg) treatment did not protect against increased MPO activity on the dorsal skin of mice DNCB exposed (Figure 4C).

Results depicted in Figures 5A to 5F displayed effects of oral administration of BAPD on the dorsal skin mRNA expression levels of TNF- α (ANOVA: $F_{(4, 30)} = 47.98, p < 0.0001$), IFN- γ (ANOVA: $F_{(4, 30)} = 28.84, p < 0.0001$), IL-33 (ANOVA: $F_{(4, 30)} = 32.53, p < 0.0001$), IL-18 (ANOVA: $F_{(4, 30)} = 7.28, p < 0.001$), IL-10 (ANOVA: $F_{(4, 30)} = 47.22, p < 0.0001$) and IL-1 β (ANOVA: $F_{(4, 30)} = 84.16, p < 0.0001$). DNCB significantly increased the mRNA expression levels of TNF- α , IFN- γ , IL-33, IL-18, IL-10 and IL-1 β , when compared with the control group. The statistical analysis of data revealed that BAPD (1 and 5 mg/kg) and Dexamethasone (5 mg/kg) reduced the mRNA expression levels of TNF- α , IFN- γ , IL-33 and IL-1 β , when compared with the DNCB group (Figures 5A, 5B, 5C and 5F). Treatment with BAPD (5 mg/kg) was more effective in reducing IFN- γ and IL-33 expression than Dexamethasone (5 mg/kg). BAPD (1 and 5 mg/kg) protected against the increase in IL-18 expression induced by DNCB (Figure 5D), whilst Dexamethasone did not. Interestingly, as displayed in Figure 5E, all treatments increased the IL-10 expression levels when compared with the DNCB group.

The severity of the morphological alterations to the dorsal skin caused by exposure to the various treatments is shown in Figure 6. The normal histological architecture was observed for the dorsal skin of the control animals (Figure 6A). The DNCB-exposed animals exhibited non-ulcerated skin with subepidermal (Figure 6B) and intraepidermal pustule formation on a hyperplastic epidermis together with mild parakeratotic hyperkeratosis (Figure 6C). The dermis of the skin was thickened, edematous, contained abundant inflammatory infiltrates of macrophages, lymphocytes, and neutrophils, congested blood vessels, dilated lymphatic vessels and presented the

formation of a crust (Figure 6B, 6D). The animals treated with Dexamethasone presented non-ulcerated skin with several regions with intraepidermal and subepidermal pustules (Figure 6E, 6F). The formation of crust with bacterial colonies was observed on the surface dermises, along with macrophage, neutrophil, and lymphocyte infiltration, vascular congestion, edema, and dilated lymphatic vessels (Figure 6G and 6H).

Treatment with BAPD (1 mg/kg) presented non-ulcerated dorsal skin with mild parakeratotic hyperkeratosis, presence of intraepidermal pustules and some foci of crust formation (Figure 6I). The dermis presented inflammatory neutrophil infiltrate (Figures 6J, 6K). Taking into account the mice treated with BAPD (5 mg/kg), the histological analysis revealed that the animals presented crust formation and several regions with intraepidermal pustules containing a large amount of degenerated neutrophils (Figure 6L). In some regions folliculitis was observed (Figure 6M). The superficial dermis exhibited a discrete inflammatory response (Figure 6N), while the deep dermis showed a poorly expressive or nonexistent inflammatory response (Figure 6O).

3.4. BAPD reduces the oxidative stress on DNCB-induced AD in mice

To confirm the contribution of oxidative stress on DNCB-induced AD, RS and TBARS levels, the activity of antioxidant enzymes (SOD, CAT, GPx, GR, GST) and NPSH levels was evaluated on the dorsal skin of animals. Increased levels of RS and TBARS were detected on the dorsal skin of mice exposed to DNCB, when compared with control group mice. Data revealed that treatment with BAPD (1 and 5 mg/kg) or Dexamethasone (5 mg/kg) decreased the RS levels in the dorsal skin of mice to control levels (ANOVA: $F_{(4, 30)} = 6.83$, $p < 0.001$) (Figure 7A). BAPD (1 mg/kg) or Dexamethasone (5 mg/kg) reduced the dorsal skin TBARS levels to control levels,

whilst BAPD (5 mg/kg) was partially effective (ANOVA: $F_{(4, 30)} = 26.70$, $p < 0.0001$) (Figure 7B).

Figure 7C summarizes the results obtained regarding NPSH levels. DNCB exposure significantly decreased NPSH levels, when compared with the control group. BAPD (1 and 5 mg/kg) protected against the decrease of NPSH levels induced by DNCB (Figure 7C), whilst Dexamethasone did not (ANOVA: $F_{(4, 30)} = 4.99$, $p < 0.01$).

Figure 7 (D to H) illustrates the effects of treatments on SOD, CAT, GPx, GR and GST activities. Animals exposed to DNCB presented an inhibition of dorsal skin SOD (ANOVA: $F_{(4, 30)} = 11.53$, $p < 0.0001$), CAT ($F_{(4, 30)} = 10.82$, $p < 0.0001$), GPx (ANOVA: $F_{(4, 30)} = 5.10$, $p < 0.01$) and GR (ANOVA: $F_{(4, 30)} = 6.91$, $p < 0.001$) activities when compared with the control group. On the other hand, DNCB increased the GST activity on the dorsal skin of mice, when compared with the control group (ANOVA: $F_{(4, 30)} = 7.05$, $p < 0.001$). BAPD (1 and 5 mg/kg) restored the SOD, CAT and GST activities to control levels (Figures 7D, 7E, 7H). The effect of BAPD was better than Dexamethasone. In addition, all treatments were effective in restoring GPx and GR activities on the dorsal skin of mice exposed to DNCB (Figures 7F and 7G).

4. Discussion

Considering the different known pharmacological activities of BAPD, we provided evidence for the effect the compound on the signs of skin injury, inflammatory parameters and oxidative stress induced by DNCB exposure. In addition, the actions of BAPD on anxiety and depression induced by DNCB and its involvement with Na^+ , K^+ -ATPase activity and corticosterone levels were shown. In this case, one of the commonly used models for studying AD is the topical application of DNCB [40]. Induction by DNCB promotes hypersensitivity on skin contact and causes an

inflammatory process involved in the development and maintenance of AD, mimicking the clinical symptoms of this pathology [41]. Besides that, this model is also used because it exhibits mixed phenotypes of Th1 and Th2 responses [42].

Therefore, in the present study DNCB was able to develop AD-like lesions in all exposed animals. DNCB exposure increased the severity of skin lesions, ear edema, cytokine levels and MPO activity. Our data indicated that BAPD attenuated signs of skin lesions and reduced the inflammatory response induced by DNCB exposure. It is particularly important that the efficacy of BAPD treatment in these parameters was similar or better than dexamethasone. Oral corticosteroids, such as dexamethasone, are widely used for short-term therapy of AD [9]. In addition, another important finding of this study is that BAPD treatment reduced the time of itching in the animals exposed to DNCB. Pruritus is one of the most important diagnostic signs of AD. Studies have reported that in 90% of patients with mild or moderate AD the severity of the disease is related to the intensity of pruritus [43]. Thus, these findings revealed a potent anti-inflammatory action of BAPD. The reduction of itching protects against the worsening of the cutaneous lesion in pruritic diseases, improving the quality of life of the carriers.

The pathophysiology of AD is very complex and there are both a strong genetic predisposition and environmental triggers. It is well established that when the skin barrier is damaged this causes a Th2 inflammatory response, inducing mast cell activation and neutrophils, eosinophils and macrophage infiltration into the tissue, causing an allergic reaction [44]. The barrier rupture by excessive itching and release of neutrophil chemotactic factors may be a contributing factor for neutrophilia [45]. In view of this, BAPD treatment improved the changes in inflammatory status induced by DNCB, which can be evidenced by histopathological analyses, MPO activity and cytokine levels. As expected, the use of corticosteroids, such as dexamethasone, caused

an abundant inflammatory infiltrate of neutrophils, crust formation, vascular congestion, edema, and dilated lymphatic vessels. Indeed, the corticosteroids could lead to the weakening of the skin, cracks and bleeding [9]. These drugs inhibit vascular neoformation and fibroblast proliferation, reducing collagen synthesis [46]. Consequently, there is no granulation tissue formation, collagen deposition, wound contraction and capillary proliferation [47]. Hence, BAPD presented another advantage when compared with dexamethasone, since it reduced the inflammatory process causing an improvement in tissue healing from a histological point of view. In addition, these results corroborate data already published in the literature [12].

Immunologically, Th1 and Th2 cytokines play an important role in the etiology of AD. It is well established that at the onset of AD, systemic Th2 cytokines, including IL-10 and IL-33, induce the proliferation of Immunoglobulin (IgE)-producing B-lymphocytes, which lead to an increase in the IgE and decrease in the INF- γ levels in plasma [48]. On the other hand, in the late or chronic phase of AD there are predominant secretion of Th1 lymphocytic cells and high concentrations of IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-18, granulocyte, and macrophage. According to Kosaka et al. [49], these cytokines are involved in skin barrier dysfunctions, including dermal thickening and infiltration of immune cells into the dermis. In this sense, our findings revealed an increase of cytokine levels, confirming its involvement in the physiopathology of AD. Indeed, patients with AD exhibit significant elevations of these cytokines in serum and skin [50]. Given this, BAPD was able to decrease the levels of TNF- α , IFN- γ , IL-33, IL-18 and IL-1 β induced by DNCB. In addition, our results demonstrated that the compound BAPD was more effective in reducing the inflammatory process than dexamethasone. Thus, we can suggest that BAPD suppresses the development of DNCB-induced AD in BALB/c mice, probably by down-regulating various Th2 and

Th1-associated factors. In fact, neutralization of IL-33 led to the reduction of cutaneous lesions, ear swelling, scratching behavior and inhibited skin thickness and infiltration of eosinophils in BALB/c mice DNCB-induced AD [51].

To explore other mechanisms involved in DNCB-induced AD, we evaluated possible changes in markers of oxidative stress on the dorsal skin of mice. Inflammation is a critical feature of AD and it is often associated with increased production of RS [52]. As expected, repeated DNCB challenges significantly increased RS and TBARS levels on the dorsal skin of mice. RS of skin cells can cause the formation of reactive lipid species, disrupting the redox balance of the cell and leading to high levels of lipid peroxidation products. Lipid peroxidation acts as an endogenous danger signal that might be responsible for AD pathogenesis [53]. Based on the evidence from the present study, it is believed that the corresponding increase in RS and TBARS levels is mediated by inflammation that directly damages epithelial cells and induces eosinophil and mast cell accumulation, together with secretion of pro-inflammatory cytokines, which leads to itching and scratching. In view this, in chronically inflamed tissues, the cell antioxidant systems attempt to reinstate a redox balance that promotes cellular repair and limits RS induction and its inflammation. The induction and inactivation of RS, as well as inflammatory processes are tightly regulated by these systems [54]. SOD, CAT and GPx constitute the first endogenous defense against neutralization of RS. GR catalyzes the reduction of GSSG (oxidized glutathione) to GSH, and it is responsible for preserving the metabolic cycle of GSH. In its turn, the GST has a critical role in detoxifying RS. Its protective role is absolutely dependent on an adequate supply of GSH. In this sense, here we observed that DNCB inhibited the activity of the antioxidant enzymes SOD, CAT, GPx, GR and reduced the NPSH levels on the back of mice. In line with our results, it is important to highlight that other studies have shown

that excessive oxidative stress causes damage to enzymes, resulting in the loss of antioxidant defenses [54]. Hence, a hypothesis to explain the reduction in the SOD, CAT, GPx, GR activity and NPSH levels is the burden of RS production. In addition, GSH is the most important non-protein thiol source quantified in the NPSH test that plays an essential role in the maintenance of cellular redox status and antioxidant defense. The fall or depletion of their levels is indicative of oxidative damage [55]. Importantly, GSH balances Th1 and Th2 cells, and the reduction of the production of IgE and IgG4 by B cells [56]. Given this, the findings indicated, for the first time, that BAPD, which has already been characterized as a promising compound with anti-inflammatory and antioxidant effects, decreased RS and TBARS levels and restored NPSH levels and SOD, CAT, GPx and GR activities after DNCB exposure. In the current study, increased GST activity could be a response to detoxification of the burden of RS production. Based on the findings, it is believed that BAPD improves this detoxification by increasing the activity of this phase-2 enzyme.

Chronic inflammatory skin diseases, such as AD, are characterized by stigmatization due to visible skin lesions [57]. In this sense, these issues have a profoundly negative impact on the psychological well-being of these patients [58]. Our results demonstrated that induction with DNCB caused anxious and depressive behavior in the animals, revealed by reducing number, entries and time spent in the open arms and by increasing their immobility time in the behavioral tests. Indeed, the literature shows an increased prevalence of depression and anxiety in both children and adults with AD [59]. However, few studies have shown this relationship in rodents. Recently, Yeom et al. [60] determined that AD has been associated with negative emotional problems in rodents. As expected, we verified that depressive-like and anxiogenic-like behavior was prevented by BAPD treatment. Surprisingly, our findings revealed that

dexamethasone has also been shown to be effective in reducing the anxious and depressive behavior induced by DNCB. Based on these data, we believe that the anti-inflammatory action of both BAPD and dexamethasone is responsible for reducing the inflammatory status and consequently the oxidative stress shown in this study. It consequently prevents the development of these neuropsychiatric changes.

The corticosterone levels and Na^+ , K^+ -ATPase activity were determined in an attempt to link the anxiolytic and antidepressant effects of BAPD with hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) and ionic gradient modulation. In an attempt to link the anxiolytic and antidepressant effects of BAPD with hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) and ionic gradient modulation, the corticosterone levels and Na^+ , K^+ -ATPase activity were determined. The nervous system and the skin interact through the actions of the HPA axis [60]. The HPA axis consists of one of the body's neuroendocrine networks responsive to stress and inflammatory factors, and hyperactivity of this axis is the most common alteration found in patients with anxiety and depression [61]. Similarly, impairment of Na^+ , K^+ -ATPase activity and/or genetic changes in its subunits resulting in decreased activity of this enzyme negatively affect neurotransmitter release and can trigger depression, anxiety and bipolar disorder [62]. In this study, we found that the development of AD-like skin lesions by repeated topical application with DNCB caused an increase of plasma corticosterone levels and inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase activity in the hippocampus and cerebral cortex of the animals. Based on these findings, the ability of BAPD to modulate hyperactivity of the HPA axis and enzymatic activity of Na^+ , K^+ -ATPase could play a role in its antidepressant and anxiolytic properties. Indeed, our results indicated that mice with AD, anxiety, and depression are in a high state of stress, as confirmed by elevated levels of corticosterone and inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase activity. It is believed that stressors exert their effects on the skin

mainly through the HPA axis and corticosterone production [63]. Similarly, studies in humans and animal models confirmed that changes in Na^+ , K^+ -ATPase activity can cause psychiatric disorders [62, 64].

5. Conclusion

In summary, our data demonstrated the suppressive effect of BAPD on psychiatric disorders – AD comorbidity by regulating inflammatory and oxidative status in mice. Thus, our results suggest that BAPD may be a good prototype for the development of more effective and/or more potent agents for the treatment of inflammation and associated comorbidities of AD.

Funding

This project was funded Brazilian agencies CNPq, FAPERGS and CAPES. Additionally, this work was supported and funded by University Federal de Pelotas.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

We are grateful to UFPel, CAPES (Financial code 001), CNPq (429859/2018-0), L'ORÉAL-UNESCO-ABC “Para Mulheres na Ciência”, and FAPERGS (PqG 17/2551-0001013-2,) for financial support. CNPq is also acknowledged for the fellowship to C.L., G.P., V.F.C., and E.A.W.

Authors' contributions

Da Fonseca C.A.R., Wilhelm E.A. and Luchese C. planned the study, wrote the article and revised the manuscript. Da Fonseca C.A.R., Reis A.S., and Pinz M.P. carried out the experiments, analyzed the experimental data. Peglow T.J., Schumacher R.F., and Perin G. performed the synthesis of the compound. Domingues W.B. and Campo V.F. performed the expression of the cytokines. Soares M.P. carried out the histological analysis. Wilhelm E.A. and Luchese C. corrected the work and granted final approval of the manuscript version to be published.

References

- [1] Ji H., Li X.K. Oxidative Stress in Atopic Dermatitis. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:2721469.
- [2] Mortz C.G., Andersen K.E., Poulsen L.K., Kjaer H.F., Broesby-Olsen S., Bindslev-Jensen C. Atopic diseases and type I sensitization from adolescence to adulthood in an unselected population (TOACS) with focus on predictors for allergic rhinitis. *Allergy*. 2019;74:308-317.
- [3] Guo Y., Zhang H., Liu Q., Wei F., Tang J., Li P., Han X., Zou X., Xu G., Xu Z., Zong W., Ran Q., Xiao F., Mu Z., Mao X., Ran N., Cheng R., Li M., Li C., Luo Y., Meng C., Zhang X., Xu H., Li J., Tang P., Xiang J., Shen C., Niu H., Li H., Shen J., Ni C., Zhang J., Wang H., Ma L., Bieber T., Yao Z. Phenotypic analysis of atopic dermatitis in children aged 1-12 months: elaboration of novel diagnostic criteria for infants in China and estimation of prevalence. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2019;33:1569-1576.
- [4] Vos, T., Abajobir, A. A., Abate, K. H., Abbafati, C., Abbas, K. M., Abd-Allah, F., Abera, S. F. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet*. 2017;390:211-1259.
- [5] Brunner P.M., Silverberg J.I., Guttman-Yassky E., Paller A.S., Kabashima K., Amagai M., Luger T.A., Deleuran M., Werfel T., Eyerich K., Stingl G. Increasing Comorbidities Suggest that Atopic Dermatitis Is a Systemic Disorder. *J Invest Dermatol*. 2017;137:18-25.
- [6] Kovabel H., Dudek D., Jaworek A., Wojas-Pelc A. Psychodermatology: Psychological and psychiatric aspects of dermatology. *Przegl Lek* 2008;65:244-8.

- [7] Kulthanan K., Chularojanamontri L., Manapajon A., Nuchkull P. Prevalence and clinical characteristics of adult-onset atopic dermatitis with positive skin prick testing to mites. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2011;29:318-26.
- [8] Baek J., Lee M.G. Oxidative stress and antioxidant strategies in dermatology. *Redox Rep.* 2016;21:164-169.
- [9] Megna M., Napolitano M., Patruno C., Villani A., Balato A., Monfrecola G., Ayala F., Balato N. Systemic Treatment of Adult Atopic Dermatitis: A Review. *Dermatol Ther.* 2017;7:1-23.
- [10] Hwang J.L., Weiss R.E. Steroid-induced diabetes: a clinical and molecular approach to understanding and treatment. *Diabetes Metab Res Rev.* 2014;30:96-102.
- [11] Peglow T.J., Schumacher R.F., Cargnelutti R., Reis A.S. ; Luchese C., Wilhelm E.A., Perin G. Preparation of bis(2-pyridyl) diselenide derivatives: Synthesis of selenazolo[5,4- b]pyridines and unsymmetrical diorganyl selenides, and evaluation of antioxidant and anticholinesterasic activities. *Tetrahedron Lett.* 2017;58:3734-3738.
- [12] Reis A.S., Vogt A.G., Pinz M.P., Voss G.T., da Fonseca C.A.R., Paltian J.J., Peglow T.J., Vaucher R.A., Echenique J.V.Z., Soares M.P., Schumacher R.F., Perin G., Luchese C., Wilhelm E.A. Modulation of COX-2, INF- γ , glutamatergic and opioid systems contributes to antinociceptive, anti-inflammatory and anti-hyperalgesic effects of bis(3-amino-2-pyridine) diselenide. *Chem Biol Interact.* 2019;311:108790.
- [13] Chiesa Fuxench Z.C., Block J.K., Boguniewicz M., Boyle J., Fonacier L., Gelfand J.M., Grayson M.H., Margolis D.J., Mitchell L., Silverberg J.I., Schwartz L., Simpson E.L., Ong P.Y. Atopic Dermatitis in America Study: A Cross-Sectional Study Examining the Prevalence and Disease Burden of Atopic Dermatitis in the US Adult Population. *J Invest Dermatol.* 2019;139:583-590.

- [14] Chan C.C., Liou C.J., Xu P.Y., Shen J.J., Kuo M.L., Len W.B., Chang L.E., Huang W.C.. Effect of dehydroepiandrosterone on atopic dermatitis-like skin lesions induced by 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in mouse, *J Dermatol Sci*. 2013;72:149-157.
- [15] Park G., Oh M.S., Inhibitory effects of *Juglans mandshurica* leaf on allergic dermatitis-like skin lesions-induced by 2,4-dinitrochlorobenzene in mice, *Exp Toxicol Pathol*. 2014;66:97-101.
- [16] Kim H., Kim J.R., Kang H., Choi J., Yang H., Lee P., Kim J., Lee K.W., 7,8,4'-Trihydroxyisoflavone attenuates DNCB-induced atopic dermatitis-like symptoms in NC/Nga mice. *PLoS One*. 2014;9:e104938.
- [17] Walsh R.N., Cummins R.A. The open-field test: a critical review. *Psychol Bull*. 1976;83:482-504.
- [18] Pellow S., Chopin P., File S.E., Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*. 1985;14:149e167.
- [19] Steru L., Chermat R., Thierry B., Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*. 1985;85:367-370.
- [20] Suzuki K., Ota H., Sasagawa S., Sakatani T., Fujikura T. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem*. 1983;132:345-352.
- [21] Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *Methods*. 2001;25:402-408.
- [22] Zhao B., Ren B., Guo R., Zhang W., Ma S., Yao Y., Yuan T., Liu Z., Liu X. Supplementation of lycopene attenuates oxidative stress induced neuroinflammation and cognitive impairment via Nrf2/NF-κB transcriptional pathway. *Food Chem Toxicol*. 2017;109:505-516.

- [23] Mori K., Kobayashi S., Inobe M., Jia W.Y., Tamakoshi M., Miyazaki T., Uede T. In vivo cytokine gene expression in various T cell subsets of the autoimmune MRL/Mp-lpr/lpr mouse. *Autoimmunity*. 1994;17:49-57.
- [24] Kurow O., Frey B., Schuster L., Schmitt V., Adam S., Hahn M., Gilchrist D., McInnes I.B., Wirtz S., Gaipf U.S., Krönke G., Schett G., Frey S., Hueber A.J. Full Length Interleukin 33 Aggravates Radiation-Induced Skin Reaction. *Front Immunol*. 2017;28:8:722.
- [25] Abu Elhija, M., Lunenfeld, E., Huleihel M. LPS increases the expression levels of IL-18, ICE and IL-18 R in mouse testes. *Am J Reprod Immunol*. 2008; 60:361-371.
- [26] Villalta S.A., Rinaldi C., Deng B., Liu G., Fedor B., Tidball J.G. Interleukin-10 reduces the pathology of mdx muscular dystrophy by deactivating M1 macrophages and modulating macrophage phenotype. *Hum Mol Genet*. 2010;20:790-805.
- [27] Silverman H.A., Dancho M., Regnier-Golanov A., Nasim M., Ochani M., Olofsson P.S., Ahmed M., Miller E.J., Chavan S.S., Golanov E., Metz C.N., Tracey K.J., Pavlov V.A. Brain region-specific alterations in the gene expression of cytokines, immune cell markers and cholinergic system components during peripheral endotoxin-induced inflammation. *Mol Med*. 2014;20:601-611.
- [28] Bruckert G., Vivien D., Docagne F., Roussel B,D. Normalization of Reverse Transcription Quantitative PCR Data During Ageing in Distinct Cerebral Structures. *Mol Neurobiol*. 2016;53:1540-1550.
- [29] Loetchutinat C., Kothan S., Dechsupa S., Meesungnoen J., Jay-Gerin J., Mankhetkorn S. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. *Radiat Phys Chem*. 2005;72:323-331.

- [30] Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1976;95:351-358.
- [31] Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem.* 1959;82:70-77.
- [32] Misra H.P., Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and simple assay for superoxide. *J Biol Chem.* 1972;247:3170-3175.
- [33] Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-126.
- [34] Wendel A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1981;77:325-333.
- [35] Carlberg I., Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* 1985;113:484-489.
- [36] Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. Glutathione S-transferases, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 1974;249:7130-7139.
- [37] Zenker N., Bernstein D.E. The estimation of small amounts of corticosterone in rat plasma. *J Biol Chem.* 1958;231:695-701.
- [38] Fiske C.H., Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem.* 1925; 66:375-400.
- [39] Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-254.
- [40] Kim C.G., Kang M., Lee Y.H., Min W.G., Kim Y.H., Kang S.J., Song C.H., Park S.J., Park J.H., Han C.H., Lee Y.J., Ku S.K., Bathing effects of various seawaters on allergic (atopic) dermatitis-like skin lesions induced by 2,4-dinitrochlorobenzene in hairless mice, *Evid. Based Complement. Alternat Med.* 2015;2015:25.
- [41] Fang L.W., Cheng C.C., Hwang T.S., Huang W.C., Liou C.J., Chen W.C., Wu S.J. Danggui Buxue Tang Inhibits 2,4-Dinitrochlorobenzene: Induced Atopic Dermatitis in Mice. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015;10:1-10.

- [42] Jung K.H., Baek H., Kang M., Kim N., Lee S.Y., Bae H. Bee Venom Phospholipase A2 Ameliorates House Dust Mite Extract Induced Atopic Dermatitis Like Skin Lesions in Mice. *Toxins*. 2017;9:68.
- [43] Arkwright P.D., Motala C., Subramanian H., Spergel J., Schneider L.C., Wollenberg A. Management of difficult-to-treat atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2013;1:142-151.
- [44] Eyerich K., Novak N. Immunology of atopic eczema: overcoming the Th1/Th2 paradigm. *Allergy*. 2013;68:974-982.
- [45] Choy D.F., Hsu D.K., Seshasayee D., Fung M.A., Modrusan Z., Martin F., Liu F.T., Arron J.R. Comparative transcriptomic analyses of atopic dermatitis and psoriasis reveal shared neutrophilic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130:1335-1343.
- [46] Cohen I.K., Diegelmann R.F., Johnson M.L. Effect of corticosteroids on collagen synthesis. *Surgery*. 1977;82:15-20.
- [47] Howe M.L. Treatment of endotoxic shock: glucocorticoids, azaroids, and nonsteroidals. *The Veterinary Clinics of North America*. 1998;28:249-266.
- [48] Brandt E.B., Sivaprasad U. Th2 cytokines and atopic dermatitis. *J Clin Cell Immunol*. 2011;2:1-25.
- [49] Kosaka H., Yoshimoto T., Yoshimoto T., Fujimoto J., Nakanishi K. Interferon-gamma is a therapeutic target molecule for prevention of postoperative adhesion formation. *Nat Med*. 2008;14:437-441.
- [50] Song H.Y., Kim W.S., Mushtaq S., Park J.M., Choi S.H., Cho J.W., Lim S.T., Byun E.B. A novel chrysin derivative produced by gamma irradiation attenuates 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis-like skin lesions in Balb/c mice. *Food Chem Toxicol*. 2019;128:223-232.

- [51] Peng, G., Mu, Z., Cui, L., Liu, P., Wang, Y., Wu, W., Han, X. Anti-IL-33 Antibody Has a Therapeutic Effect in an Atopic Dermatitis Murine Model Induced by 2, 4-Dinitrochlorobenzene. *Inflammation*. 2017;41:154-163.
- [52] Chung J., Oh Se-Young, Shin You-Kyung. Association of glutathione-S-transferase polymorphisms with atopic dermatitis risk in preschool age children. *Clin Chem Lab Med*. 2009;47:1475-1481.
- [53] Ramana K.V., Srivastava S., Singhal S.S. Lipid Peroxidation Products in Human Health and Disease 2016. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:2163285.
- [54] Ara J., Bajgai J., Sajo M.E.J., Fadrique A., Kim S.C., Kim S.K. Lee K.J. The immunological and oxidative stress regulation of non-thermal plasma-aided water on atopic dermatitis-like lesion in dinitrochlorobenzene-induced SKH-1 hairless mice. *Mol Cell Toxicol*. 2019;15:199-208.
- [55] Halliwell B., Gutteridge J.M. Free radicals in biology and medicine. 5th ed. Oxford Univ. Press. 2015.
- [56] Bengtsson A., Lundberg M., Avila-Cariño J., Jacobsson G., Holmgren A., Scheynius A. Thiols decrease cytokine levels and down-regulate the expression of CD30 on human allergen-specific T helper (Th) 0 and Th2 cells. *Clin Exp Immunol*. 2001;123:350-360.
- [57] Yu S.H., Attarian H., Zee P., Silverberg J.I. Burden of Sleep and Fatigue in US Adults With Atopic Dermatitis. *Dermatitis*. 2016;27:50-58.
- [58] Kitagaki H., Hiyama H., Kitazawa T., Shiohara T. Psychological stress with long-standing allergic dermatitis causes psychodermatological conditions in mice. *J Invest Dermatol*. 2014;134:1561-1569.
- [59] Wu Z., Fang Y. Comorbidity of depressive and anxiety disorders: challenges in diagnosis and assessment. 2014;26:227-231.

- [60] Yeom M., Ahn S., Oh J.Y., Kim S.Y., Lee H., Hahm D.H., Park H.J. Atopic dermatitis induces anxiety- and depressive-like behaviors with concomitant neuronal adaptations in brain reward circuits in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2020;98:109818.
- [61] Sartorius K., Emtestam L., Lapins J., Johansson O. Cutaneous PGP 9.5 distribution patterns in hidradenitis suppurativa. *Arch Dermatol Res*. 2010;302:461-468.
- [62] Keller J., Gomez R., Williams G., Lembke A., Lazzeroni L., Murphy G.M., Schatzberg A.F. HPA axis in major depression: cortisol, clinical symptomatology and genetic variation predict cognition. *Mol Psychiatr*. 2016;22: 527-536.
- [63] Kirshenbaum G.S., Saltzman K., Rose B., Petersen J., Vilsen B., Roder J.C. Decreased neuronal Na⁺, K⁺ -ATPase activity in Atp1a3 heterozygous mice increases susceptibility to depression-like endophenotypes by chronic variable stress. *Genes Brain Behav*. 2011;10:542-50.
- [64] Crema L., Schlabit M., Tagliari B., Cunha A., Simao F., Krolow R., Pettenuzzo L., Salbego C., Vendite D., Wyse A.T., Dalmaz C. Na(+), K (+) ATPase activity is reduced in amygdala of rats with chronic stress-induced anxiety-like behavior. *Neurochem Res*. 2010;35:1787-1795.

Table

Table 1. Primers used for quantitative real-time polymerase chain reaction. Listed are the forward and reverse primer sequences used to amplify each target gene as well as the GAPDH endogenous control.

Primer Name	Sequence	Reference
TNF- α Forward	5' CCCTCACACTCAGATCATCTTCT 3'	[32]
TNF- α Reverse	5' CTACGACGTGGGCTACAG 3'	
IFN- γ Forward	5' AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGTAG 3'	[33]
IFN- γ Reverse	5' GTCACAGTTTTTCAGCTGTATAGGG 3'	
IL-33 Forward	5' CTGCAAGTCAATCAGGCGAC 3'	[34]
IL-33 Reverse	5' TGCAGCCAGATGTCTGTGTC 3'	
IL- 18 Forward	5' CAACTCAGGAGTCTTGCTCAACA 3'	[35]
IL-18 Reverse	5' CAGGCCTGACATCTTCTGCAA 3'	
IL-10 Forward	5' CAAGGAGCATTGGAATTCCC 3'	[36]
IL-10 Reverse	5' GGCCTTGTAGACACCTTGGTC 3'	
IL-1b Forward	5' AGTTGACGGACCCCAAAAG 3'	[37]
IL-1b Reverse	5' AGCTG GATGCTCTCATCAGG 3'	
GAPDH Forward	5' TGC GACTTCAACAGCAACTC 3'	[38]
GAPDH Reverse	5' ATGTAGGCAATGAGGTCCAC 3'	

Figure Captions

Figure 1. (A) Chemical structure of Bis (3-amino-2-pyridine) diselenide (BAPD). (B) Experimental protocol design.

Figure 2. Effect of Bis (3-amino-2-pyridine) diselenide (BAPD) treatment oral on atopic dermatitis (AD)-like symptoms and scratching incidence 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)-induced in mice. (A) Images of skin and ear lesions from the groups of mice taken on the last day of the experiment (day 30). (B) Dermatitis scores. (C) Scratching time. Each column represents the mean $\pm$ S.E.M. of 7 mice in each group. (*) $p < 0.05$ compared with the control group, (#) $p < 0.05$ compared with the DNCB group, (&) $p < 0.05$ compared with the dexamethasone (Dexa) group (One-way ANOVA followed by the Tukey's test).

Figure 3. Effect of Bis (3-amino-2-pyridine) diselenide (BAPD) treatment oral on elevated plus-maze, tail suspension and open field tests, and serum corticosterone levels and Na^+ , K^+ -ATPase activity in mice exposed to 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB). (A) represents of open arms entries, (B) time spent in the open arms, (C) time of immobility, (D) number of crossing, (E) number of rearing, (F) corticosterone levels, (G) Na^+ , K^+ -ATPase activity in hippocampus and (H) Na^+ , K^+ -ATPase activity in cerebral cortex. Each column represents the mean $\pm$ S.E.M. of 7 mice in each group. (*) $p < 0.05$ compared with the control group, (#) $p < 0.05$ compared with the DNCB group, (&) $p < 0.05$ compared with the dexamethasone (Dexa) group (One-way ANOVA followed by the Tukey's test).

Figure 4. Effect of Bis (3-amino-2-pyridine) diselenide (BAPD) treatment oral on (A) ear swelling, (B) ear MPO activity and (C) dorsal skin MPO activity in mice exposed to 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB). Each column represents the mean $\pm$ S.E.M. of 7 mice in each group. (*) $p < 0.05$ compared with the control group, (#) $p < 0.05$ compared with the DNCB group, (&) $p < 0.05$ compared with the dexamethasone (Dexa) group (One-way ANOVA followed by the Tukey's test).

Figure 5. Effect of Bis (3-amino-2-pyridine) diselenide (BAPD) treatment oral on the mRNA expression levels of TNF- α (A), IFN- γ (B), IL-33 (C), IL-18 (D), IL-10 (E), IL-1 β (F) in the dorsal skin of mice exposed to 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB). Each column represents the mean $\pm$ S.E.M. of 7 mice in each group. (*) $p < 0.05$ compared with the control group, (#) $p < 0.05$ compared with the 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) group, (&) $p < 0.05$ compared with the dexamethasone (Dexa) group (One-way ANOVA followed by the Tukey's test).

Figure 6. Histological profiles of the back skin of the mice after the treatment with Bis (3-amino-2-pyridine) diselenide (BAPD) or dexamethasone using HE staining: (A) Control - normal skin. HE. 100X. (B to D) 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) - non-ulcerated skin showing formation of subepidermal pustules (arrow), dilation of lymphatic vessels (*) and a discreet degree of parakeratotic hyperkeratosis and formation of intraepidermal pustules (arrow). HE. 100X. Dermis superficial and deep dermis exhibiting abundant inflammatory infiltrate of neutrophils (arrow). HE. 200X. (E to H) Dexamethasone (Dexa) - non-ulcerated skin presenting abundant inflammatory infiltrate of neutrophils mainly along the superficial dermis (arrow). Skin showing large

intraepidermal pustules (arrow) and presenting crust formation (between arrows), discrete inflammatory response in the dermis and presence of bacterial colony (arrowhead). HE. 100X. Dermis thickened with macrophages infiltrates (white arrow), plasma cells (arrowhead) and lymphocytes, vascular congestion, edema and dilated lymphatic vessels (*). (I to K) DNCB + BAPD 1 mg/kg - non ulcerated skin with mild parakeratotic hyperkeratosis, presence of intraepidermal pustules (arrow). (L to O) DNCB + BAPD 5 mg/kg - skin presenting moderate parakeratotic hyperkeratosis, formation of large intraepidermal pustules (*), presence of folliculitis (arrow).

Figure 7. Effect of Bis (3-amino-2-pyridine) diselenide (BAPD) treatment oral on the levels of (A) RS, (B) TBARS, and (C) NPSH and on the activities of (D) SOD, (E) CAT, (F) GPx, (G) GR and (H) GST in the dorsal skin of mice. Each column represents the mean $\pm$ S.E.M. of 7 mice in each group. (*) $p < 0.05$ compared with the control group, (#) $p < 0.05$ compared with the 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) group, (&) $p < 0.05$ compared with the dexamethasone (Dexa) group (One-way ANOVA followed by the Tukey's test).

Highlights

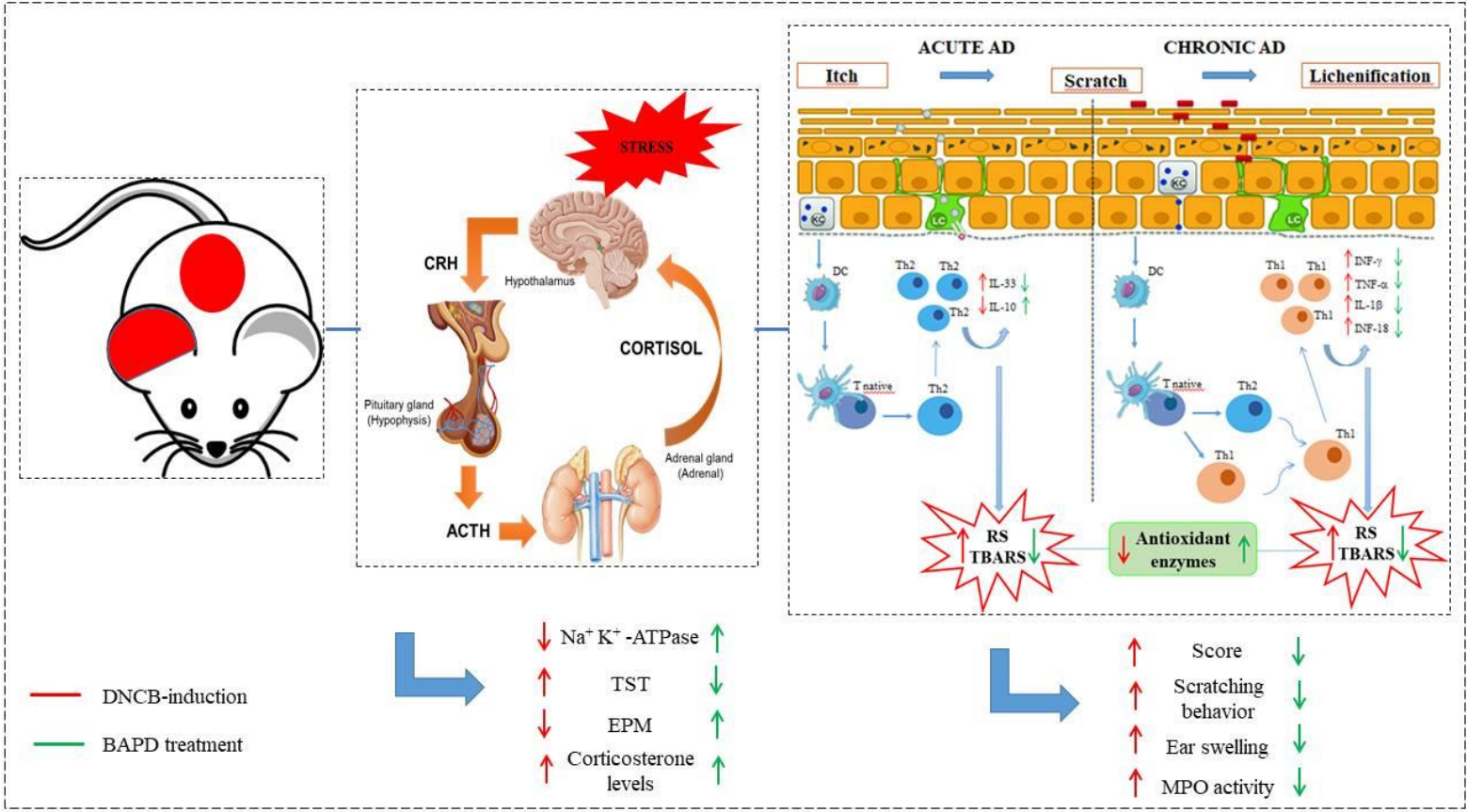
BAPD attenuated DNCB-induced AD, depressive and anxious symptoms in mice.

The treatment with BAPD improved inflammatory parameters in an AD model.

The oxidative stress induced by DNCB was reduced by BAPD.

The efficacy of BAPD was similar, or superior, to Dexamethasone.

Graphical Abstract



Figures

Figure 1.

(A)



(B)

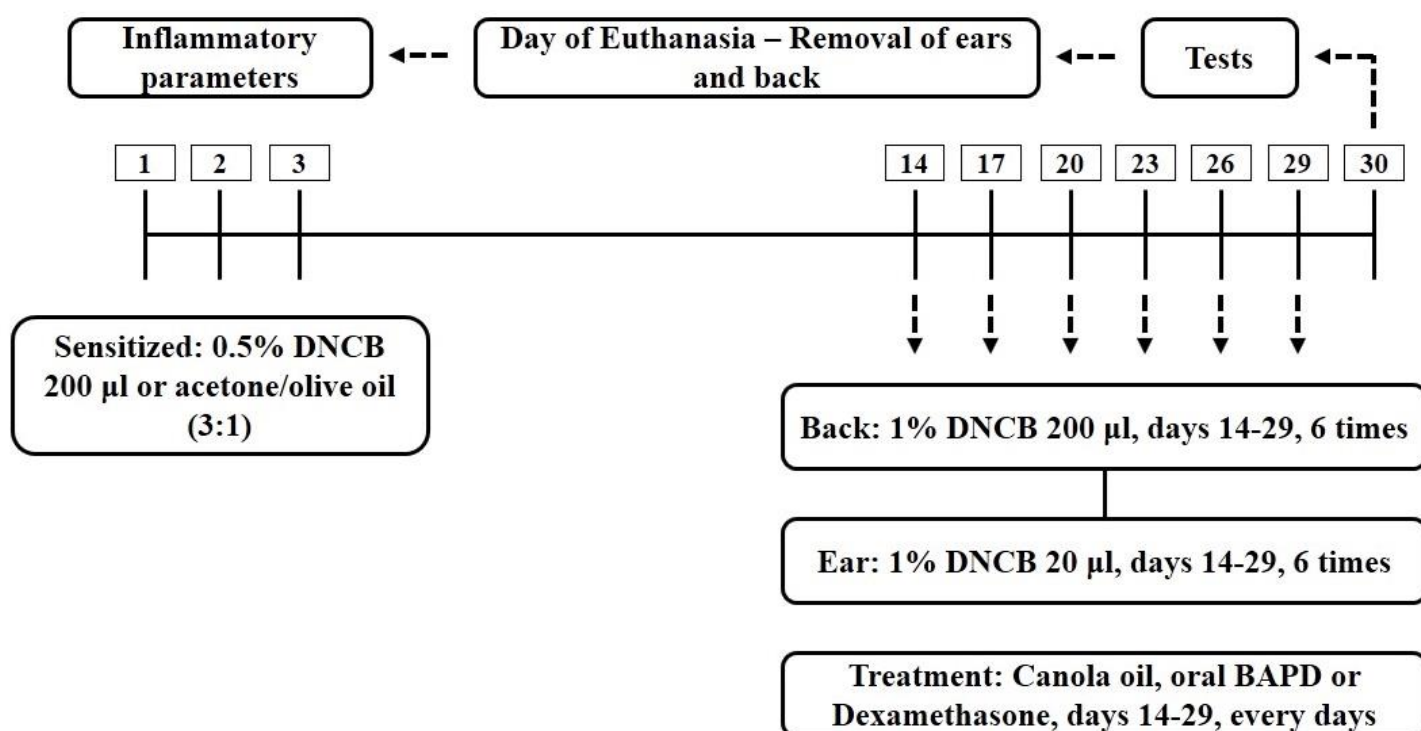
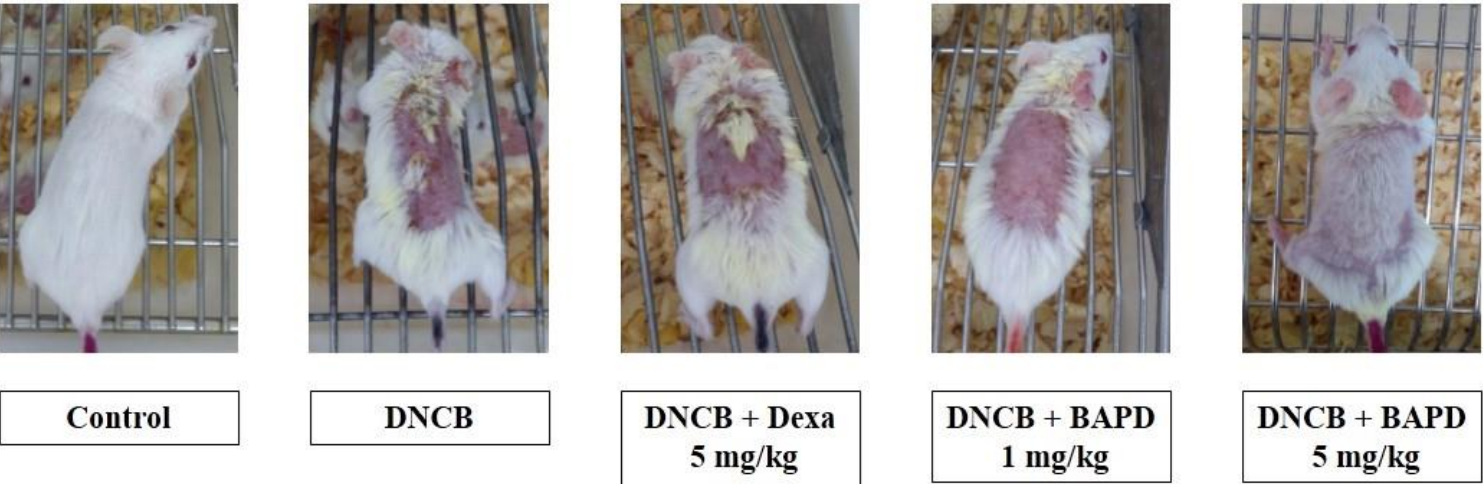
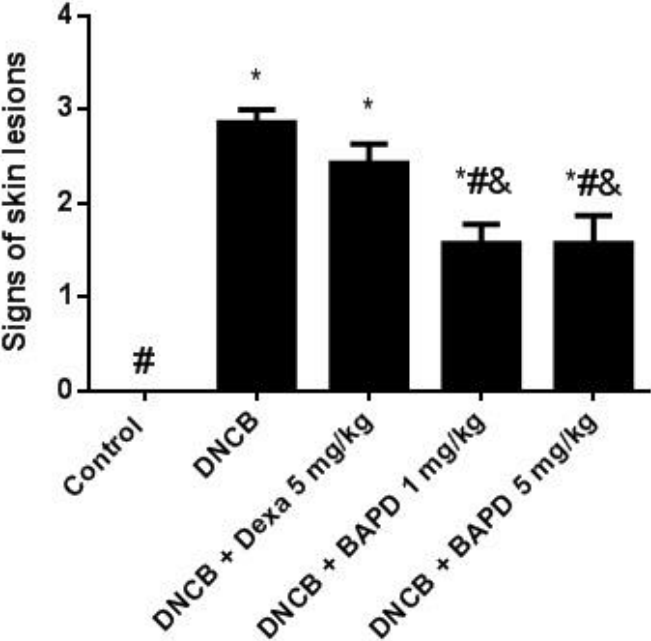


Figure 2.

(A)



(B)



(C)

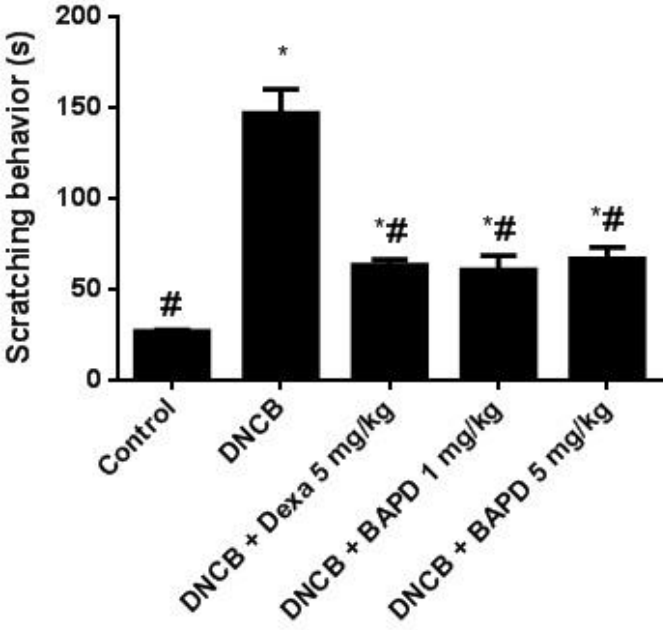


Figure 3.

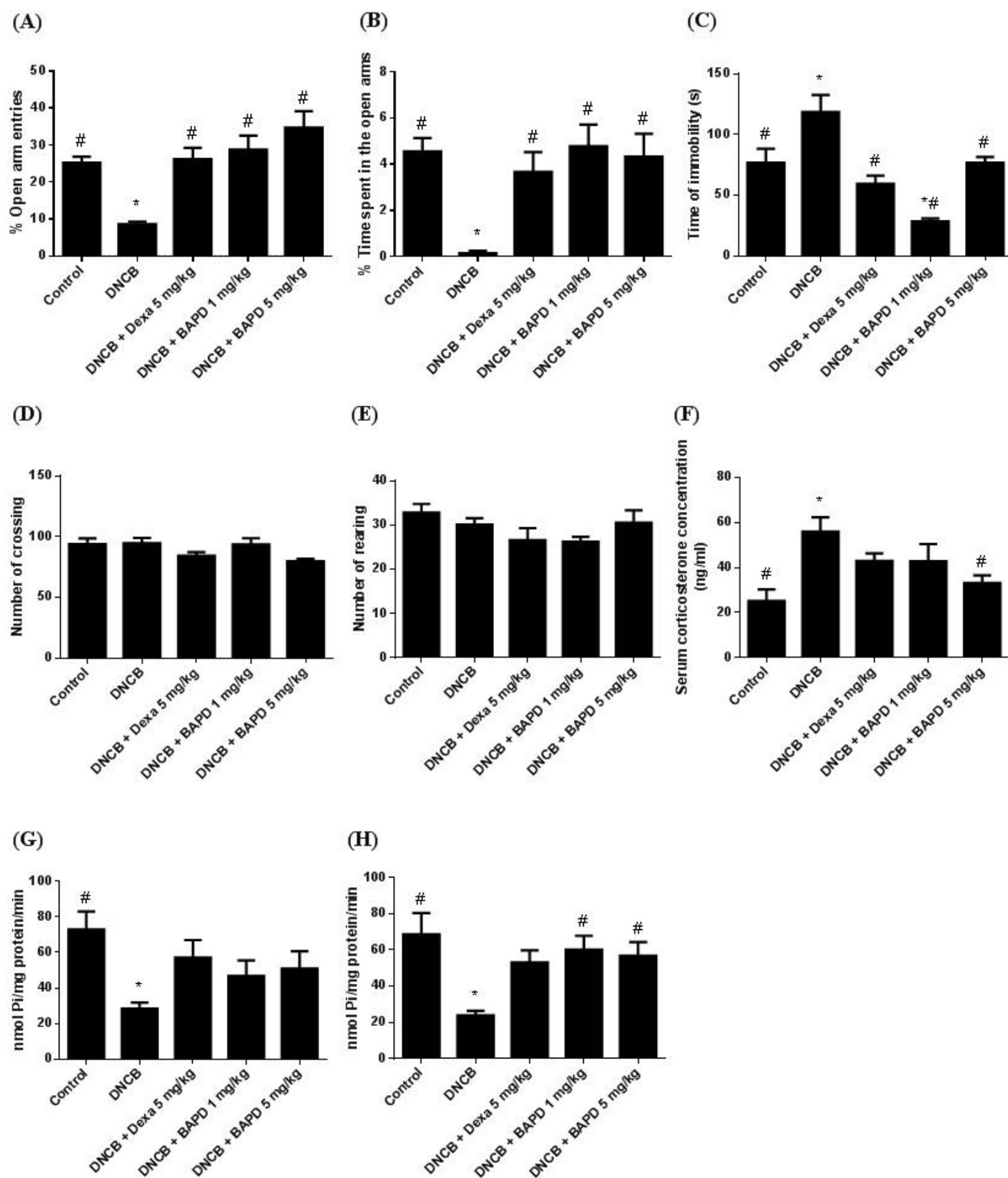


Figure 4.

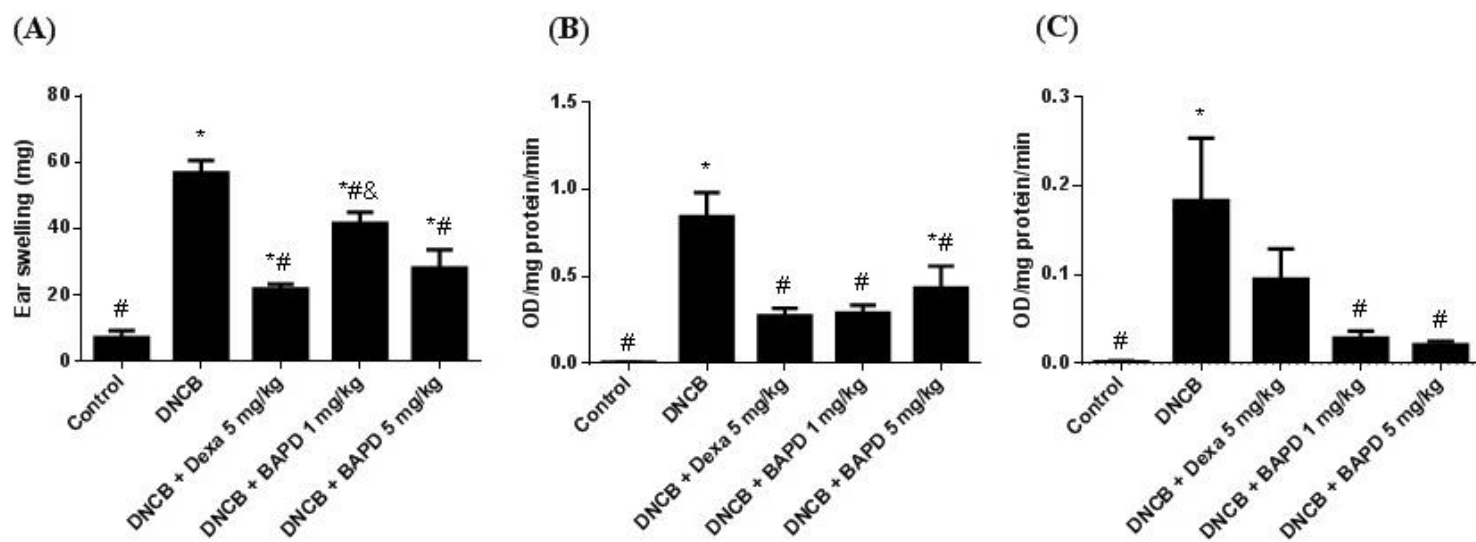


Figure 5.

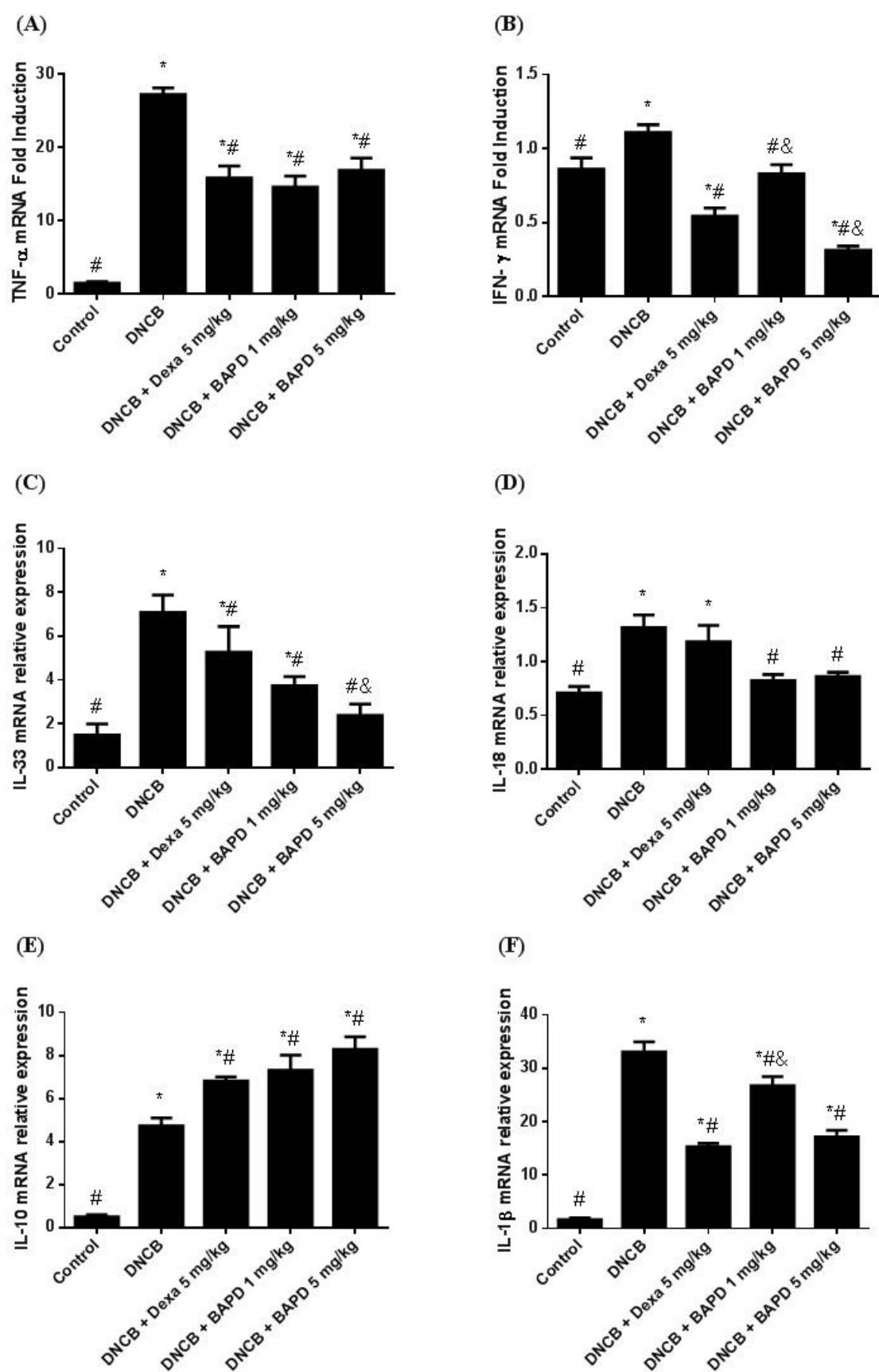


Figure 6.

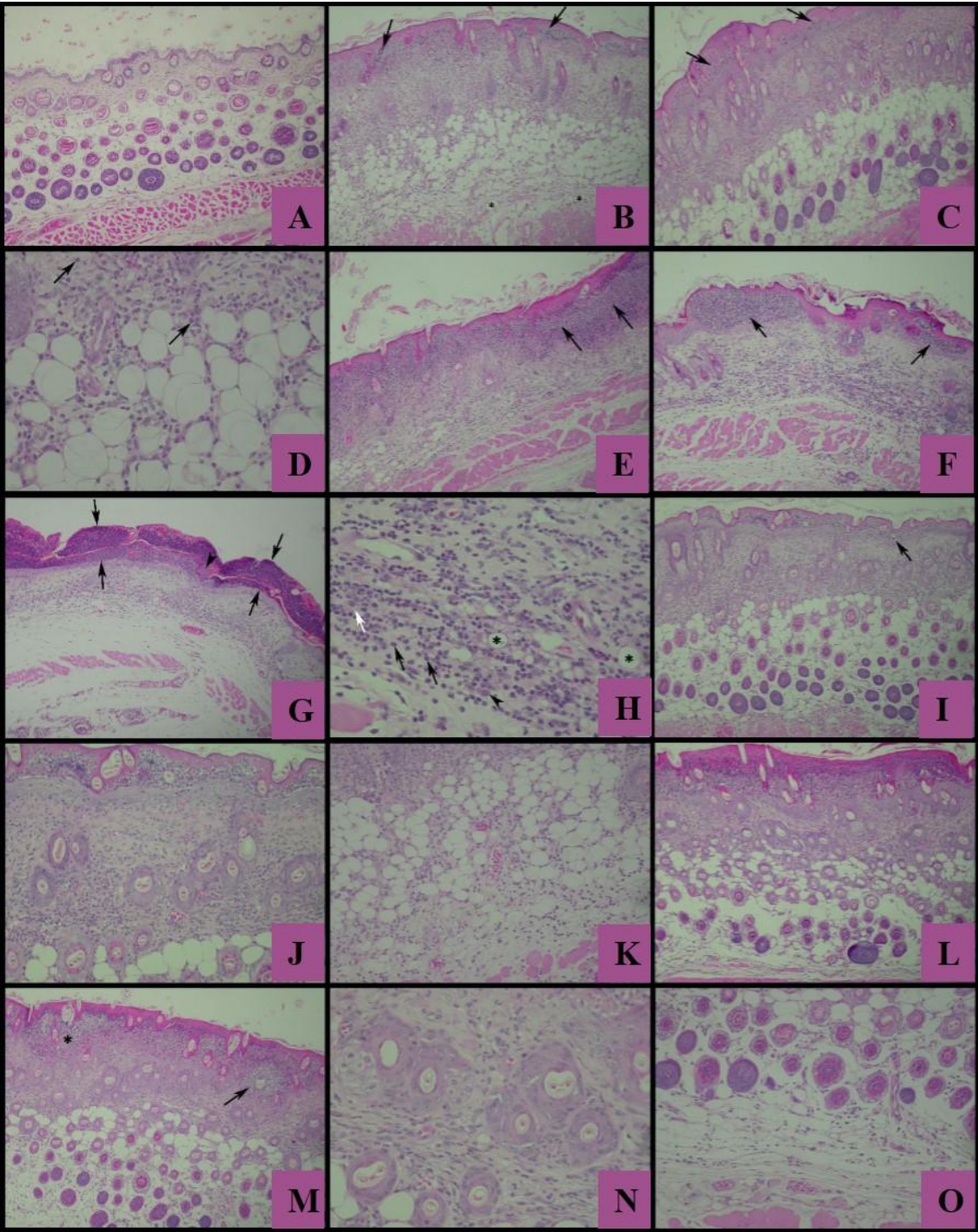
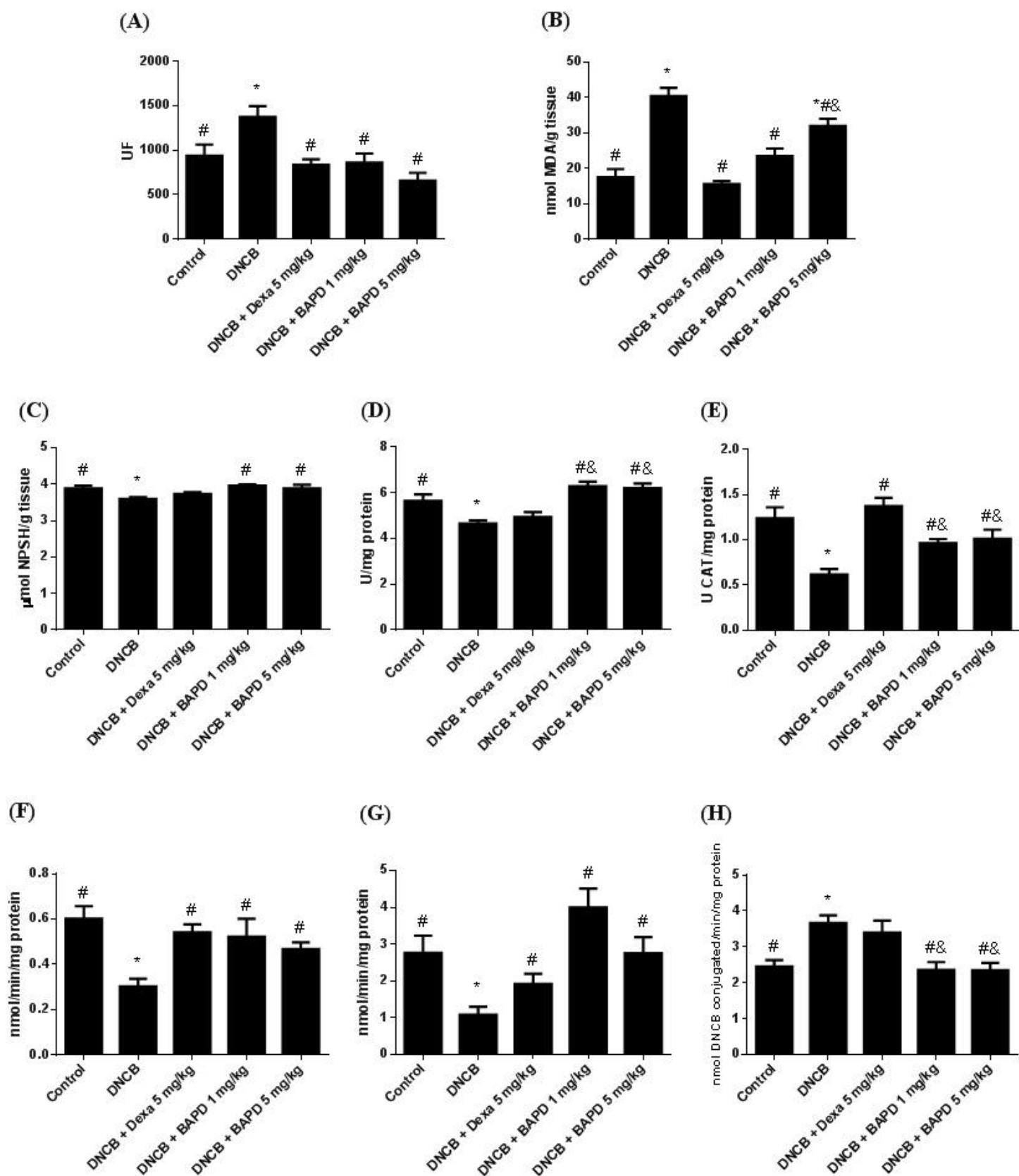


Figure 7.



5. Conclusões

Baseado nos resultados obtidos pode-se sugerir que:

- O BAPD exerceu ação anti-inflamatória em camundongos, reduzindo a gravidade das lesões cutâneas, o comportamento de coçar, a atividade da MPO, a expressão das citocinas pró-inflamatórias, assim como os danos histológicos.
- O mecanismo de ação do BAPD pode estar relacionado com a inibição do estresse oxidativo e a reconstrução da barreira cutânea.
- O BAPD apresentou promissoras ações do tipo antidepressiva e ansiolítica.
- As ações do tipo antidepressiva e ansiolíticas do BAPD podem estar relacionadas ao decréscimo da atividade da Na^+ , K^+ -ATPase e ao níveis elevados de corticosterona.
- O BAPD não causa prejuízos locomotores.

Frente a isto, os resultados inferiram que o BAPD é um composto multialvo, visto que apresentou ações anti-inflamatórias, antidepressivas e ansiolíticas por modular diferentes vias envolvidas na manutenção da DA. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar os outros mecanismos de ação e a contribuição de outros sistemas na DA.

Perspectivas futuras

Considerando os resultados obtidos e o interesse do nosso grupo de pesquisa na busca de novas moléculas para o tratamento da DA, pretende-se ampliar o conhecimento sobre outros mecanismos bioquímicos e moleculares que possam contribuir para o efeito supressor do BAPD na DA, visto que sua fisiopatologia é bastante complexa. Além disso, almeja-se investigar as ações anti-inflamatórias do composto em outras comorbidades associadas a esta patologia.

Referências

- ALEXANDER, H.; PATTON, T.; JABBAR-LOPEZ, Z.K.; MANCA, A.; FLOHR, C. Novel systemic therapies in atopic dermatitis: what do we need to fulfil the promise of a treatment revolution?. **F1000Research**. v.8, p.132, 2019.
- ALY, R., MAIBACH, H.I.; SHINEFIELD, H.R. Microbial flora of atopic dermatitis. **Archives of Dermatology**. v.113, p.780-782, 1977.
- antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, p. 123-130, 1999.
- ARA, J.; BAJGAI, J.; SAJO, M.E.J.; FADRIQUELA, A.; KIM, S.C.; KIM, S.K.; LEE, K.J. The immunological and oxidative stress regulation of non-thermal plasma-aided water on atopic dermatitis-like lesion in dinitrochlorobenzene-induced SKH-1 hairless mice. **Molecular & Cellular Toxicology**. v.15, p.199-208, 2019.
- BAEK, J.; LEE, M.G. Oxidative stress and antioxidant strategies in dermatology. **Redox Reports**. v.21, p.164-169, 2016.
- BARBAROT, S.; AUZIERE, S.; GADKARI, A.; GIROLOMONI, G.; PUIG, L.; Benefit. **American Journal of Clinical Dermatology**. v.17, p.163-169, 2016.
- BERKE, R.; SINGH, A.; GURALNICK, M. - Atopic dermatitis: An overview. **American Family Physician**. N.86, p. 35-42, 2012.
- BEYER, P.; AL-BABILI, S.; YE, X.; LUCCA, P.; SCHAUB, P.; WELSCH, R.; POTRYKUS, I. Golden Rice: Introducing the β -Carotene Biosynthesis Pathway into Rice Endosperm by Genetic Engineering to Defeat Vitamin A Deficiency. **The Journal of Nutrition**. v.132, p.506S-510S, 2002.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v.12, p.123-130, 1999.
- BIEBER, T. Atopic dermatitis. **Annals of Dermatology**. v.22, p.125-137, 2010.
- BIEBER, T. Atopic dermatitis. **The New England Journal of Medicine**. v.358, p.1483-1494, 2008.
- BIEBER, T.; D'ERME, A.M.; AKDIS, C.A.; TRAUHL-HOFFMANN, C.; LAUENER, R.; SCHÄPPI, G.; SCHMID-GRENDELMEIER, P. Clinical phenotypes and endophenotypes of atopic dermatitis: Where are we, and where should we go?.
- BIEBER, T.; LEUNG, D.Y. Atopic dermatitis. Marcel Dekker, New York, 2000.

BIEBER, T.; LEUNG, D.Y. Atopic dermatitis. Marcel Dekker, New York, 2002.

BIRBEN, E.; SAHINER, U.M.; SACKESEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**. v.5, p.9-19, 2012.

BLOME, C.; RADTKE, M.A.; EISSING, L.; AUGUSTIN, M. Quality of Life in Patients with Atopic Dermatitis: Disease Burden, Measurement, and Treatment Benefit. **American Journal of Clinical Dermatology**. v.17, p.163-169, 2016.

BLUME-PEYTAVI, U.; METZ, M. Atopic dermatitis in children: management of pruritus. **The Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**. V.26, p.2-8, 2012.

BORNSTEIN, M.H.; TAMIS-LEMONDA, C.; HAHN, C.S.; HAYNES, OM. Maternal responsiveness to young children at three ages: longitudinal analysis of a multidimensional, modular, and specific parenting construct. **Developmental Psychology Journal**. v.44, p.867-874, 2008.

BRANDT, E.B.; SIVAPRASAD, U. Th2 Cytokines and Atopic Dermatitis. **Journal of Clinical and Cellular Immunology**. v.2, p.110, 2011.

BREUER, K.; WITTMANN, M.; BOSCHE, B.; KAPP, A.; WERFEL, T. Severe atopic dermatitis is associated with sensitization to staphylococcal enterotoxin B (SEB). **Allergy**. v.55, p.551–555, 2000.

BROWN, S.J.; IRWIN MCLEAN, W.H. MCLEAN W.H.I. One remarkable molecule: Filaggrin. **Journal of Investigative Dermatology**. v.132, 751-762, 2012.

BRUNNER, P.M.; SILVERBERG, J.I.; GUTTMAN-YASSKY, E.; PALLER, A.S.; KABASHIMA, K.; AMAGAI, M.; LUGER, T.A.; DELEURAN, M.; WERFEL, T.; EYERICH, K.; STINGL, G. Increasing Comorbidities Suggest that Atopic Dermatitis Is a Systemic Disorder. **Journal of Investigative Dermatology**. v.137, p.18-25, 2017.

BUNIKOWSKI, R.; MIELKE, M.; SKARABIS, H.; HERZ, U.; BERGMANN, R.L.; WAHN, U.; RENZ, H. Prevalence and role of serum IgE antibodies to the Staphylococcus aureus-derived superantigens SEA and SEB in children with atopic dermatitis. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v.103, p.119-124, 1999.

BUNIKOWSKI, R.; MIELKE, M.E.; SKARABIS, H.; WORM, M.; ANAGNOSTOPOULOS, I.; KOLDE, G.; WAHN, U.; RENZ, H. Evidence for a disease-promoting effect of *Staphylococcus aureus*-derived exotoxins in atopic dermatitis. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v.105, p.814–819, 2000.

BUSKE-KIRSCHBAUM, A.; EBRECHT, M.; HELLHAMMER, D.H. Blunted HPA axis responsiveness to stress in atopic patients is associated with the acuity and severeness of allergic inflammation. **Brain, Behavior, and Immunity**. v.24, p.1347-1353, 2010.

BUSKE-KIRSCHBAUM, A.; FISCHBACH, S.; RAUH, W.; HANKER, J.; HELLHAMMER, D. Increased responsiveness of the hypothalamus–pituitary–adrenal (HPA) axis to stress in newborns with atopic disposition. **Psychoneuroendocrinology**. v.29, p.705-711, 2004.

BUSKE-KIRSCHBAUM, A.; GEIBEN, A.; HELLHAMMER, D. Psychobiological aspects of atopic dermatitis: an overview. **Psychotherapy and Psychosomatics**. v.70, p.6-16, 2001.

BYAMBA, D.; KIM, T.G.; KIM, D.H.; JE, J.H.; LEE, M.G. The roles of reactive oxygen species produced by contact allergens and irritants in monocyte-derived dendritic cells. **Annals of Dermatology**. v.22, p.269-278, 2010.

CHAGAS, P.M.; ROSA, S.G.; SARI, M.H.; OLIVEIRA, C.E.; CANTO, R.F.; DA LUZ, S.C.; BRAGA, A.L.; NOGUEIRA, C.W. Evaluation of the pharmacological properties of salicylic acid-derivative organoselenium: 2-hydroxy- 5-selenocyanatobenzoic acid as an anti-inflammatory and antinociceptive compound. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v.118, p.87-95, 2014.

CHENG, C.M.; HSU, J.W.; HUANG, K.L.; BAI, Y.M.; SU, T.P.; LI, C.T.; YANG, A.C.; CHANG, W.H.; CHEN, T.J.; TSAI, S.J.; CHEN, M.H. Risk of developing major depressive disorder and anxiety disorders among adolescents and adults with atopic dermatitis: a nationwide longitudinal study. **Journal of Affective Disorders**. v.178, p.60-65, 2015.

CHOI, E.J.; RYU, Y.B.; TANG, Y.; KIM, B.R.; LEE, W.S.; DEBNATH, T.; FAN, M.; KIM, E.K.; LEE, H.S. Effect of cinnamamides on atopic dermatitis through regulation of IL-4 in CD4+ cells. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**. v.34, p.613-619, 2019.

CHUNG, J.; OH, S.Y.; SHIN, Y.K. Association of glutathioneS-transferase polymorphisms with atopic dermatitis risk in preschool age children. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. v.47, p.1475-1481, 2009.

COHEN, I.R. Activation of benign autoimmunity as both tumor and autoimmune disease immunotherapy: a comprehensive review. **Journal of Autoimmunity**. v.54, p.112-117, 2014.

COOKSON, W. The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium. **Nature Reviews Immunology**. v.4, p.4: 978-988, 2004.

CUIJPERS, P.; SMIT, F. Excess Mortality in Depression: A Meta-Analysis of Community Studies. **Journal of Affective Disorders**. v.72, p.227-236, 2002.

D'AURIA, E.; BANDERALI, G.; BARBERI, S.; GUALANDRI, L.; PIETRA, B.; RIVA E.; CERRI, A. Atopic dermatitis: Recent insight on pathogenesis and novel therapeutic target. **Asian Pacific Journal Allergy Immunology**. v.34, p.98, 2016.

DANBY, S.G. Biological Variation in Skin Barrier Function: From A (Atopic Dermatitis) to X (Xerosis). **Current Problems in Dermatology**.v.49, p.51, 2016.

DAVIES, K.J. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. **IUBMB Life**. v.50, p.279-289, 2000.

DHARMAGE, S.C.; LOWE, A.J.; MATHESON, M.C.; BURGESS, J.A.; ALLEN, K.J.; ABRAMSON, M.J. Atopic dermatitis and the atopic march revisited. **Allergy**. v.69, p.17-27, 2014.

EGEBERG, A.; ANDERSEN, Y.M.; GISLASON, G.H.; SKOV, L.; THYSEN, J.P. Prevalence of comorbidity and associated risk factors in adults with atopic dermatitis. **Allergy**. v.72, p.783-791, 2016.

EICHENFIELD, L.F.; TOM, W.L.; BERGER, T.G.; KROL, A.; PALLER. A.S.; SCHWARZENBERGER, K.; BERGMAN, J.N.; CHAMLIN, S.L.; COHEN, D.E.; COOPER, K.D.; CORDORO, K.M.; DAVIS, D.M.; FELDMAN, S.R.; HANIFIN, J.M.; MARGOLIS, D.J.; SILVERMAN, R.A.; SIMPSON, E.L.; WILLIAMS, H.C.; ELMETS, C.A.; BLOCK, J.; HARROD, C.G.; SMITH BEGOLKA, W.; SIDBURY, R. Management and treatment of atopic dermatitis with topical therapies. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v.71, p.116-132, 2014.

EICHENFIELD, L.F.; TOM, W.L.; CHAMLIN, S.L.; FELDMAN, S.R.; HANIFIN, J.M.; SIMPSON, E.L.; BERGER, T.G.; BERGMAN, J.N.; COHEN, D.E.; COOPER, K.D.; CORDORO, K.M.; DAVIS, D.M.; KROL, A.; MARGOLIS, D.J.; PALLER, A.S.; SCHWARZENBERGER, K.; SILVERMAN, R.A.; WILLIAMS, H.C.; ELMETS, C.A.; BLOCK, J.; HARROD, C.G.; SMITH BEGOLKA, W.; SIDBURY, R. Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: section 1. Diagnosis and assessment of atopic dermatitis. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v.70, p.338-351, 2014.

ELIAS, P.M.; STEINHOFF, M. "Outside-to-Inside" (and Now Back to "Outside") Pathogenic Mechanisms in Atopic Dermatitis. **Journal of Investigative Dermatology**. v.128, p.1067-1070, 2008.

ELLIS, C.N.; MANCINI, A.J.; PALLER, A.S.; SIMPSON, E.L.; EICHENFIELD, L.F. Understanding and managing atopic dermatitis in adult patients. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**. v.31, p.18-22, 2012.

ENGBRETSEN, K.A. THYSSEN, J.P. Skin Barrier Function and Allergens. **Current Problems in Dermatology**. v.49, p.90-102, 2016.

EYERICH, K.; NOVAK, N. Immunology of atopic eczema: overcoming the Th1/Th2 paradigm. **Allergy**. v.49, p.90-102, 2013.

FANG, L.W.; CHENG, C.C.; HWANG, T.S.; HUANG, W.C.; LIOU, C.J.; CHEN, W.C.; WU, S.J. Danggui Buxue Tang Inhibits 2,4-Dinitrochlorobenzene: Induced Atopic Dermatitis in Mice. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. v.2015, p.1-10, 2015.

FARZANFAR, D.; DOWLATI, Y.; FRENCH, L.E.; LOWES, M.A.; ALAVI, A. Inflammation: a contributor to depressive comorbidity in inflammatory skin disease. **Skin Pharmacology and Physiology**. v.31, p.246-251, 2018.

FLANDREAU, E.I.; BOURKE, C.H.; RESSLER, K.J.; VALE, W.W.; NEMEROFF, C.B.; OWENS, M.J. Escitalopram alters gene expression and HPA axis reactivity in rats following chronic overexpression of corticotropin-releasing factor from the central amygdala. **Psychoneuroendocrinology**. v.38, p.1349-1361, 2012.

FLOHR, C.; PASCOE, D.; WILLIAMS, H.C. Atopic dermatitis and the "hygiene hypothesis: too clean to be true?". **British Journal of Dermatology**. v.152, p.202-216, 2005.

GARG, A.; CHREN, M.M.; SANDS, L.P.; MATSUI, M.S.; MARENUS, K.D.; FEINGOLD, K.R.; ELIAS, P.M. Psychological stress perturbs epidermal permeability barrier homeostasis: implications for the pathogenesis of stress-associated skin disorders. **Archives of Dermatology**. v.137, p.53-59, 2001.

GARMHAUSEN, D.; HAGEMANN, T.; BIEBER, T.; DIMITRIOU, I.; FIMMERS, R.; DIEPGEN, T.; NOVAK, N. Characterization of different courses of atopic dermatitis in adolescent and adult patients. **Allergy**. v.68, p.498-506, 2013.

GBD 2016, DALYs; HALE, Collaborators. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 333 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **Lancet**. v.390, p.1260-1344, 2017.

GHOSH, S.; BEHERE, R.V.; SHARMA, P.; SREEJAYAN, K. Psychiatric evaluation in dermatology: an overview. **Indian Journal of Dermatology**. v.58, p.39-43, 2013.

GUO, Y.; LI, P.; TANG, J.; HAN, X. Prevalence of Atopic Dermatitis in Chinese Children aged 1–7 ys. Scientific **Reports**. v.6, p.29751, 2016.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press, USA. 2015.

HAMILTON, J.D.; UNGAR, B.; GUTTMAN-YASSKY, E. Drug evaluation review: dupilumab in atopic dermatitis. **Immunotherapy**. v.7, p. 1043-1058, 2015.

HAY, R.J.; JOHNS, N.E.; WILLIAMS, H.C.; BOLLIGER, I.W.; DELLAVALLE, R.P.; MARGOLIS, D.J.; MARKS, R.; NALDI, L.; WEINSTOCK, M.A.; WULF, S.K.; MICHAUD, C.J.L.; MURRAY, C.; NAGHAVI, M. The global burden of skin disease in 2010: an analysis of the prevalence and impact of skin conditions. **Journal of Investigative Dermatology**. v.134, p.1527-1534, 2014.

HENNINO, A.; VOCANSON, M.; TOUSSAINT, Y.; RODET, K.; BENETIÈRE, J.; SCHMITT, A.M.; ARIES, M.F.; BÉRARD, F.; ROZIÈRES, A.; NICOLAS, J.F. Skin-infiltrating CD8+ T Cells Initiate Atopic Dermatitis Lesions. **Journal of Immunology**. v.178, p.5571-5577, 2007.

HOMEY, B.; STEINHOFF, M.; RUZICKA, T.; LEUNG, D.Y. Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v.118, p.178-189, 2006.

HUANG, Z.; ROSE, A.H.; HOFFMANN, P.R. The role of selenium in inflammation and immunity: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling**. v.16, p.705-743, 2012.

HULTGREN, O.; KOPF, M.; TARKOWSKI, A. *taphylococcus aureus*-Induced Septic Arthritis and Septic Death Is Decreased in IL-4-Deficient Mice: Role of IL-4 as Promoter for Bacterial Growth. **The Journal of Immunology**. v.160, p. 5082-5087, 1998.

HWANG, Y.S.; CHANG, B.Y.; KIM, T.Y.; KIM, S.Y. Ameliorative Effects of Green Tea Extract From Tannase Digests on House Dust Mite Antigen-Induced Atopic Dermatitis-Like Lesions in NC/Nga Mice. **Archives of Dermatological Research**. v.311, p.109-120, 2019.

ILLI, S.; VON MUTIUS, E.; LAU, S.; NICKEL, R.; GRÜBER, C.; NIGGEMANN, B.; WAHN, U. The natural course of atopic dermatitis from birth to age 7 years and the association with asthma. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v.113, p.925-931, 2004.

IRVINE, A.D.; MCLEAN, W.H.I.; LEUNG, D.Y.M. "Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases". **The New England Journal of Medicine**. v.365, p.1315-1327, 2011.

JI, H.; LI, X.K. Oxidative Stress in Atopic Dermatitis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v.2016, p.1-8, 2016.

JOHANSSON, S.G.O. ImmunoCAP Specific IgE test: an objective tool for research and routine allergy diagnosis. **Expert Review of Molecular Diagnostics**. v.4, p.273-279, 2004.

JUNG, K.H.; BAEK, H.; KANG, M.; KIM, N.; LEE, S.Y.; BAE, H. Bee Venom Phospholipase A2 Ameliorates House Dust Mite Extract Induced Atopic Dermatitis Like Skin Lesions in Mice. **Toxins**. v.9, p.68, 2017.

JURENA, M.F.; CLEARE, A.J.; PARIANTE, C.M. O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, a função dos receptores de glicocorticóides e sua importância na depressão. **Brazilian Journal of Psychiatric**. v.27, p.189-201, 2004.

KANCHONGKITIPHON, W.; GAFFIN, J.M.; PHIPATANAKUL, W. Child with Atopic Dermatitis. **Biophysical Chemistry**. v.114, p.3-11, 2015.

KELLER, J.; GOMEZ, R.; WILLIAMS, G.; LEMBKE, A.; LAZZERONI, L.; MURPHY, G.M.; SCHATZBERG, A.F. HPA axis in major depression: cortisol,

clinical symptomatology and genetic variation predict cognition. **Molecular Psychiatry**. v.22, p.527-536, 2016.

KIM, B.E.; LEUNG, D.Y. "Significance of skin barrier dysfunction in atopic dermatitis". **Allergy, Asthma & Immunology Research**. v.10, p.207-215, 2018.

KIM, C.G.; KANG, M.; LEE, Y.H.; MIN, W.G.; KIM, Y.H.; KANG, S.J.; SONG, C.H.; PARK, S.J.; PARK, J.H.; HAN, C.H.; LEE, Y.J.; KU, S.K. Bathing effects of various seawaters on allergic (atopic) dermatitis-like skin lesions induced by 2,4-dinitrochlorobenzene in hairless mice. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. v.2015, p.1-25, 2015.

KIM, H.; KIM J.R.; KANG H.; CHOI J.; YANG H.; LEE P.; KIM J.; LEE, K.W. 7,8,4'- Trihydroxyisoflavone attenuates DNCB-induced atopic dermatitis-like symptoms in NC/Nga mice. **PLoS One**. v.9, p,e104938, 2014.

KIMURA, M.; TSURUTA, S.; YOSHIDA, T. Correlation of house dust mite-specific lymphocyte proliferation with IL-5 production, eosinophilia, and the severity of symptoms in infants with atopic dermatites. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v.101, p.84-89, 1998.

KIRKHAM P.; RAHMAN, I. Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy. **Pharmacology & Therapeutics**. v.111, p.476-494, 2006.

KITAGAKI, H.; HIYAMA, H.; KITAZAWA, T.; SHIOHARA T. Psychological stress with long-standing allergic dermatitis causes psychodermatological conditions in mice. **Journal of Investigative Dermatology**. v.134, p.1561-1569, 2014.

KOSAKA H., YOSHIMOTO T., YOSHIMOTO T., FUJIMOTO J., NAKANISHI K. Interferon-gamma is a therapeutic target molecule for prevention of postoperative adhesion formation. **Nature Medicine**. v.14, p.437-441, 2008.

KRUK, DUCHNIK, E.; Oxidative stress and skin diseases: possible role of physical activity. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. v.15, p.561-568, 2014.

KULTHANAN, K.; CHULAROJANAMONTRI, L.; MANAPAJON, A.; NUCHKULL, P. Prevalence and clinical characteristics of adult-onset atopic dermatitis with positive skin prick testing to mites. **Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology**. v.29, p.318-326, 2011.

KUMAR, B.V.; CONNORS, T.J.; FARBER, D.L. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. **Immunity**. v.48, p.202-213, 2018.

KUMAR, S.; SHARMA, N.; MAURYA, I.K.; BHASIN, A.K.K.; WANGOO, N.; BRANDÃO, P.; FÉLIX, V.; BHASIN, K.K.; SHARMA, R.K. Facile synthesis, structural evaluation, antimicrobial activity and synergistic effects of novel imidazo[1,2-a]pyridine based organoselenium compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v.123, p.916-924, 2016.

LANG, P.J.; BRADLEY, M.M.; CUTHBERT, B.N. Emotion, motivation, and anxiety: Brain mechanisms and psychophysiology. **Biological Psychiatry**. v.44, p.1248-1263, 1998.

LEE, S.; KANG, D.W.; RYU, H.; KIM, C.; ANN, J.; LEE, H.; KIM, E.; HONG, S.; CHOI, S.; BLUMBERG, P.M.; FRANK-FOLTYN, R.; BAHRENBURG, G.; STOCKHAUSEN, H.; CHRISTOPH, T.; LEE, J. t-Butyl pyridine and phenyl C-region analogues of 2-(3-fluoro-4-methylsulfonylaminophenyl) propanamides as potent TRPV1 antagonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v.25, p.2451-2462, 2017.

LEUNG, D.Y. Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v.105, p.860-876, 2000.

LEUNG, D.Y.; SOTER, N.A. Cellular and immunologic mechanisms in atopic dermatitis. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v.44, p.S1-S12, 2001.

LEUNG, D.Y.M. New insights into atopic dermatitis: role of skin barrier and immune dysregulation. **Allergology international: official journal of the Japanese Society of Allergology**. v.62, p.151-161, 2013.

LIM, V.Z.; HO, R.C.; TEE, S.I.; HO, M.S.; PAN, J.Y.; LIM, Y.L.; TANG, M.B.; CHAN, K.L.; GIAM, Y.C. Anxiety and Depression in Patients with Atopic Dermatitis in a Southeast Asian Tertiary Dermatological Centre. **ANNALS Academy of Medicine Singapore**. v.45, p.451-455, 2016.

LIO, P.A.; LEE, M.; LEOVIDGE, J.; TIMMONS, K.G.; SCHNEIDER, L. Clinical management of atopic dermatitis: practical highlights and updates from the atopic dermatitis practice parameter 2012. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**. v.2, p. 361-369, 2014.

LOPES, C.; PINTO, L.; LEITE, C.; DELGADO, L.; MOREIRA, A.; LOURINHO, I. Personality Traits May Influence the Severity of Atopic Dermatitis in Adult Patients: A Pilot Study. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**. v.26, p.198-199, 2016.

LU, J.; CHEN, M.; XIANG, Y.; CHENG, Q.; LIANG, Y.; HUANG, J.; HUANG, J.; CHEN, J.; GAO, L. Epicutaneous Sensitization with Ovalbumin, *Staphylococcal* Enterotoxin B and Vitamin D Analogue Induced Atopic Dermatitis in Mice. **Clinical & Experimental Dermatology and Therapies**. v.2017, p.1-6, 2017.

LUCHESI, C.; BRANDÃO, R.; ACKER, C.I.; NOGUEIRA, C.W. 2,2'-dipyridyl diselenide is a better antioxidant than other disubstituted diaryl diselenides. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v.367, p.153-163, 2012.

LYONS, J. J.; MILNER, J. D.; STONE, K. D. Atopic Dermatitis in Children. **Immunology and Allergy Clinics of North America**. v.35, p.161-183, 2015.

MAN, M.Q.; HATANO, Y.; LEE, S.H.; MAN, M.; CHANG, S.; FEINGOLD, K.R.; LEUNG, D.Y.M.; HOLLERAN, W.; UCHIDA, Y.; ELIAS, P.M. Characterization of a Hapten-Induced, Murine Model with Multiple Features of Atopic Dermatitis: Structural, Immunologic, and Biochemical Changes following Single Versus Multiple Oxazolone Challenges. **Journal of Investigative Dermatology**. v.128, p.79-86, 2008.

MARENHOLZ, I.; NICKEL, R.; RUSCHENDORF, F.; SCHULZ, F.; ESPARZA-GORDILLO, J.; KERSCHER, T.; GRÜBER, C.; LAU, S.; WORM, M.; KEIL, T.; KUREK, M.; ZALUGA, E.; WAHN, U.; LEE, Y. Filaggrin loss-of-function mutations predispose to phenotypes involved in the atopic march. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v.118, p. 866-871, 2006.

MARGOLIS, J.S.; ABUABARA, K.; BILKER, W.; HOFFSTAD, O.; MARGOLIS, D.J. Persistence of mild to moderate atopic dermatitis. **JAMA Dermatology**. v.150, p.593-600, 2014.

MÁRQUEZ-FLORES, Y.K.; CAMPOS-ALDRETE, M.E.; SALGADO-ZAMORA, H.; CORREA-BASURTO, J.; MELÉNDEZ-CAMARGO, M.E. Docking simulations, synthesis, and anti-inflammatory activity evaluation of 2-(N-alkyl)amino-3-nitroimidazo[1,2-a]pyridines. **Medicinal Chemistry Research**. v.21, p.775-782, 2011.

MEGNA, M.; NAPOLITANO, M.; PATRUNO, C.; VILLANI, A.; BALATO, A.; MONFRECOLA, G.; , AYALA, F.; BALATO, N. Systemic Treatment of Adult Atopic Dermatitis: A Review. *Dermatology and Therapy*. v.7, p.1-23, 2017.

MILLER, W.; GRIFFIN C.; CAMPBELL, K. (2013). K. Muller & Kirk's Small Animal Dermatology. 7th. ed. Missouri: Mosby, Elsevier. p.1–70.

MICHIE, C.A.; DAVIS, T. Atopic dermatitis and staphylococcal superantigens. **Lancet**. v.347, p.324-325, 1996.

MILOYAN, B.; BULLEY, A.; BANDEEN-ROCHE, K.; EATON, W.W.; GONÇALVES-BRADLEY, D.C. Anxiety disorders and all-cause mortality: systematic review and meta-analysis. **Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology**. v.51, p.1467-75, 2016.

MORRIS, M.C.; COMPAS, B.E. GARBER, J. Relations among posttraumatic stress disorder, comorbid major depression, and HPA function: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Psychology Review**. v.32, p.301-315, 2012.

MU, Z.; ZHAO, Y.; LIU, X.; CHANG, C.; ZHANG, J. Molecular biology of atopic dermatitis. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**. v.47, p.193-218, 2014.

NICHOLAS, M.N.; GOODERHAM, M.J. Atopic dermatitis, depression, and suicidality. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**. v.21, p.237-242, 2017.

NAGENDER, P.; MALLA, R.G.; NARESH, K.R.; POORNACHANDRA, Y.; GANESH, K.C.; NARSAIAH, B. Synthesis, cytotoxicity, antimicrobial and anti-biofilm activities of novel pyrazolo[3,4-b]pyridine and pyrimidine functionalized 1,2,3-triazole derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v.24, p.2905-2908, 2014.

NAKAMURA, Y.; OSCHERWITZ, J.; CEASE, K.B.; CHAN, S.M.; MUÑOZ-PLANILLO, R.; HASEGAWA, M.; VILLARUZ, A.E.; CHEUNG, G.Y.C.; Staphylococcus delta-toxin induces allergic skin disease by activating mast cells. **Nature**. v.503, p.397-401, 2013.

NOGUEIRA, C.; ROCHA, J. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. **Archives of Toxicology**. v.85, p.1313-1359, 2011.

NOTARO, E.R.; SIDBURY, R. Systemic Agents for Severe Atopic Dermatitis in Children. **Pediatric Drugs**. v.17, p.449-457, 2015.

NOVAK, N. An update on the role of human dendritic cells in patients with atopic dermatitis. **The Journal of allergy and clinical immunology**. v.129, p.879-886, 2012.

OH, S.H.; BAE, B.G.; PARK, C.O.; NOH, J.Y.; PARK, I.H.; WU, W.H.; LEE, K.H. Association of stress with symptoms of atopic dermatitis. **Acta Dermato-Venereologica**. v.90, p.582-588, 2010.

OKAYAMA, Y. Oxidative stress in allergic and inflammatory skin diseases. **Current Drug Targets Inflammation & Allergy**. v.4, p.517-519, 2005.

ORFALI, R.L.; SHIMIZU, M.M.; TAKAOKA, R.; ZANIBONI, M.C.; ISHIZAKI, A.S.; COSTA, A.; TIBA, A.P.L.; SATO, M.N.; AOKI, V. Atopic dermatitis in adults: clinical and epidemiological considerations. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v.59; p.270-275, 2013.

OSZUKOWSKA M, MICHALAK I, GUTFREUND K, BIENIAS W, MATYCH M, SZEWCZYK A. Role of primary and secondary prevention in atopic dermatitis. **Advances in Dermatology and Allergology**. v.32, p.409-420, 2015.

OTANI, N.; AKIMOTO, T.; YAMAZAKI, T.; HONMA, S.; NAGATA, D. Atopic dermatitis, cyclosporine, and nephrotoxicity. **CEN Case Reports**. v.4, p.117-118, 2015.

PARK, H.; Kim, K. Association of Perceived Stress with Atopic Dermatitis in Adults: A Population-Based Study in Korea. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. v.13, p.760, 2016.

PARK, S.C.; KIM, J.M.; JUN, T.Y.; LEE, M.S.; KIM, J.B.; YIM, H.W.; PARK, Y.C. How many different symptom combinations fulfil the diagnostic criteria for major depressive disorder? Results from the CRESCEND study. **Nordic Journal of Psychiatry**. v.71, p.217-222, 2016.

PEGLOW, T.J.; SCHUMACHER, R.F.; CARGNELUTTI, R.; REIS, A.S.; LUCHESE C.; WILHELM, E.A.; PERIN G. Preparation of bis(2-pyridyl) diselenide derivatives: Synthesis of selenazolo[5,4- b]pyridines and unsymmetrical diorganyl selenides, and evaluation of antioxidant and anticholinesterasic activities. **Tetrahedron Letters**. v.58, p.3734-3738, 2017.

PHILLIPS, A.C.; BATTY, G.D.; GALE, C.R.; DEARY, I.J.; OSBORN, D.;

MACINTYRE, K.; CARROLL, D. Generalised anxiety disorder, major depressive disorder, and their comorbidity as predictors of all-cause and cardiovascular mortality: the Vietnam Experience Study. **Psychosomatic Medicine**. v.71, p.395-403, 2009.

PENE, J.; ROUSSET, F.; BRIÈRE, F.; CHRÉTIEN, I.; BONNEFOY, J.Y.; SPITS, H.; YOKOTA, T.; ARAI, N.; ARAI, K.; BANCHEREAU, J. IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons gamma and alpha and prostaglandin E2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.85, p.6880-6884, 1988.

PINZ, M.; REIS, A.S.; DUARTE, V.; DA ROCHA, M.J.; GOLDANI, B.S.; ALVES, D.; SAVEGNAGO, L.; LUCHESE, C.; WILHELM, E.A. 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline, a new quinoline derivative containing selenium, has potential antinociceptive and anti-inflammatory actions. **European Journal of Pharmacology**. v.780, p.122-128, 2016.

PINZ, M.; REIS, A.S.; LEIVAS, R.; VOSS, G. T.; VOGT, A. G.; DO SACRAMENTO, M.; ROEHRS, J.A.; ALVES, D.; LUCHESE, C.; WILHELM, E.A. 7-Chloro-4-phenylsulfonyl quinoline, a new antinociceptive and anti-inflammatory molecule: Structural improvement of a quinoline derivate with pharmacological activity. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v.90, p.72-77, 2017.

PLÖTZ, S.G.; WIESENDER, M.; TODOROVA, A.; RING, J. What is new in atopic dermatitis/eczema?. **Expert opinion on emerging drugs**. v.19, p.441-458, 2014.

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

REIS A.S., VOGT A.G., PINZ M.P., VOSS G.T., DA FONSECA C.A.R., PALTIAN J.J., PEGLOW T.J., VAUCHER R.A., ECHENIQUE J.V.Z., SOARES M.P., SCHUMACHER R.F., PERIN G., LUCHESE C., WILHELM E.A. Modulation of COX-2, INF- γ , glutamatergic and opioid systems contributes to antinociceptive, anti-inflammatory and anti-hyperalgesic effects of bis(3-amino-2-pyridine) diselenide. **Chemico-Biological Interactions**. v.311, p.108790, 2017.

ROSA, S.G.; BRÜNING, C.A.; PESARICO, A.P.; SOUZA, A.C.G.; NOGUEIRA, C.W. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of 2,2'-dipyridyl diselenide through reduction of inducible nitric oxide synthase, nuclear factor-kappa B and c-Jun N-terminal kinase phosphorylation levels in the mouse spinal cord. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. v.48,p.38-45, 2018.

SACOTTE, R.; SILVERBERG, J.I. Epidemiology of adult atopic dermatitis. **Clinics in Dermatology**. v.36, p.595-605, 2018.

SALAZAR-ESPINOSA, J. The Atopic March. A Literature Review. **International Journal of Medical Students**. v.2, p.119-124, 2014.

SAMOCHOCKI, Z.; OWCZAREK, W.; ZABIELSKI, S. Can atopy patch tests with aeroallergens be an additional diagnostic criterion for atopic dermatitis? **European Journal of Dermatology**. v.16, p.151-154, 2006.

SANDERS, K.M.; AKIYAMA T. The vicious cycle of itch and anxiety. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. v.87, p.17-26, 2018.

SANNA, L.; STUART, A.L.; PASCO J.A.; JACKA, F.; BERK, M.; MAES, M.; O'NEIL, A.; GIRARDI, P.; WILLIAMS, L.J. Atopic disorders and depression: findings from a large, population-based study. **Journal of Affective Disorders**. V.155, p.261-265, 2014.

SARTORIUS, K.; EMTESTAM, L.; LAPINS, J.; JOHANSSON, O. Cutaneous PGP 9.5 distribution patterns in hidradenitis suppurativa. **Archives of Dermatological Research**. v.302, p.461-468, 2010.

SCRIVEN, E.F.V.; MURUGAN, R. Pyridine and Pyridine Derivatives. Scriven, E. F. V., & Murugan, R. (2005). Pyridine and Pyridine Derivatives. **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**. v.20, p.1-33, 2000.

selenium, has potential antinociceptive and anti-inflammatory actions. **European Journal of Pharmacology**. v.780, p.122-128, 2016.

SERRA-BALDRICH, E.; DE FRUTOS, J.O.; JÁUREGUI, I.; ARMARIO-HITA, J.C.; SILVESTRE, J.F.; HERRAEZ, L.; MARTÍN-SANTIAGO, A.; VALERO, A.; SASTRE, J. Changing perspectives in atopic dermatitis. **Allergologia Immunopathologia**. v.46, p.397-412, 2017.

SIDBURY, R.; DAVIS, D.M.; COHEN, D.E.; CORDORO, K.M.; BERGER, T.G.; BERGMAN, J.N.; CHAMLIN, S.L.; COOPER, K.D.; FELDMAN, S.R.; HANIFIN, J.M.; KROL, A.; MARGOLIS, D.J.; PALLER, A.S.; SCHWARZENBERGER, K.;

SILVERMAN, R.A.; SIMPSON, E.L.; TOM, W.L.; WILLIAMS, H.C.; ELMETS, C.A.; BLOCK, J.; HARROD, C.G.; BEGOLKA, W.S.; EICHENFIELD, L.F. Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: section 3. Management and treatment with phototherapy and systemic agents. **American Academy of Dermatology**. v.71; p.327-349, 2014.

SILVA, V. D.; REIS, A. S.; PINZ, M.; DA FONSECA, C. A.; DUARTE, L. F. B; ROEHRS, J. A.; ALVES, D.; LUCHESE, C.; WILHELM, E. A. Further analysis of acute antinociceptive and anti-inflammatory actions of 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**. 2017.

SIMPSON, E.L.; MARGOLIS, D.J.; DE BRUIN-WELLER. M.; ECKERT, L. Epidemiology of atopic dermatitis in adults: Results from an international survey. **Allergy**. v.73, p.1284-1293, 2018.

SKOV, L.; OLSEN, J.V.; GIORNO, R.; SCHLIEVERT, P.M.; BAADSGAARD, O.; LEUNG, D.Y. Application of staphylococcal enterotoxin B on normal and atopic skin induces up-regulation of T cells by a superantigen-mediated mechanism. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v.105, p.820-826, 2000.

SLOMINSKI, A.T.; ZMIJEWSKI, M.A.; SKOBOWIAT, C.; ZBYTEK, B.; SLOMINSKI, R.M.; STEKETEE, J.D. Sensing the environment: regulation of local and global homeostasis by the skin's neuroendocrine system. **Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology**. v.212, p.1-115, 2012.

SONG H.Y., KIM W.S., MUSHTAQ S., PARK J.M., CHOI S.H., CHO J.W., LIM S.T., BYUN E.B. A novel chrysin derivative produced by gamma irradiation attenuates 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis-like skin lesions in Balb/c mice. **Food and Chemical Toxicology**. v.128, p.223-232, 2019.

SOUMELIS, V.; RECHE, P.A.; KANZLER, H.; YUAN, W.; EDWARD, G.; HOMEY, B.; GILLIET, M.; HO, S.; ANTONENKO, S.A.; LAUERMA, A.; SMITH, K.; GORMAN, D.; ZURAWSKI, S.; ABRAMS, J.T.; MENON, S.S.; MCCLANAHAN, T.; WAAL-MALEFYT, R.; BAZÁN, F.; KASTELEIN, R.A.; LIU, Y. Human epithelial cells trigger dendritic cell-mediated allergic inflammation by producing TSLP. **Nature Immunology**. v.3, p.673-680. 2002.

SPERGEL, J.M.; MIZOGUCHI, E.; OETTGEN, H.; BHAN, A.K.; GEHA, R.S. Roles of TH1 and TH2 Cytokines in a Murine Model of Allergic Dermatitis. **Journal of Clinical Investigation**. v.103, p.1103-1111, 1999.

TAKANO, H.; INOUE, K.I. Environmental pollution and allergies. **Journal of Toxicologic Pathology**. v.30, p.193-199, 2017.

TANEI, R.; HASEGAWA, Y.; SAWABE, M. Abundant immunoglobulin E-positive cells in skin lesions support an allergic etiology of atopic dermatitis in the elderly. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**. v.27, p.952-960, 2013.

TOKURA, Y. Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis. **Journal of Dermatological Science**. v.58, p.1-7, 2010.

TOLLEFSON, M.M.; BRUCKNER, A.L. Atopic dermatitis: skin-directed management. **Pediatrics**. v.134, p.e1735-1744, 2014.

TSUKAHARA, H.; SHIBATA, R.; OHSHIMA, Y.; TODOROKI, Y.; SATO, S.; OHTA, N.; HIRAOKA, M.; YOSHIDA, A.; NISHIMA, S.; MAYUMI, M. Oxidative stress and altered antioxidant defenses in children with acute exacerbation of atopic dermatitis. **Life Sciences**. V.72, p.2509-2516, 2003.

TURNER, M. J.; TRAVERS, J. B.; KAPLAN, M. H. T helper cell subsets in the development of atopic dermatitis. **Journal of Drugs in Dermatology**. v.11, p.1174-1178, 2012.

UMEI, K.; NISHIGAYA, Y.; KONDO, A.; TATANI, K.; TANAKA, N.; KOHNO, Y.; SETO, S. Novel pyrazolo [1, 5-a] pyridines as orally active EP 1 receptor antagonists: Synthesis, structure-activity relationship studies, and biological evaluation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v.25, p.2635-2642, 2017.

VOGT, A.G.; VOSS, G.T.; DE OLIVEIRA, R.L.; PALTIAN, J.J.; DUARTE, L.F.B.; ALVES, D.; JESSE, C.R. ROMAN, S.S.; ROEHRS, J.A.; WILHELM, E.A.; LUCHESE, C. Organoselenium group is critical for antioxidant activity of 7-chloro-4-phenylselenyl-quinoline. **Chemico-Biological Interactions**. v.25, p.282-287, 2018.

VOS, T.; ABAJOBIR, A.A.; Abate, K.H.; Abbafati, C.; Abbas, K.M.; Abd-Allah, F.; Abera, S.F. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016:

a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet**. v.390, p.211-1259, 2017.

VOSS, G.T.; OLIVEIRA, R.L.; DE SOUZA, J.F.; DUARTE, L.F.B.; FAJARDO, A.R.; ALVES, D.; LUCHESE, C.; WILHELM, E. Therapeutic and technological potential of 7-chloro-4-phenylselanyl quinoline for the treatment of atopic dermatitis-like skin lesions in mice. **Materials Science and Engineering C**. v.84, p.90-98, 2018.

WEBER, D.M.; VOSS, G.T.; DE OLIVEIRA, R.L.; DA FONSECA, C.A.R.; PALTIAN, J.J.; RODRIGUES, K.C.; IANISKI, F.R.; VAUCHER, R.A.; LUCHESE, C.; WILHELM, E.A. Topic application of meloxicam-loaded polymeric nanocapsules as a technological alternative for treatment of the atopic dermatitis in mice. **Journal of Applied Biomedicine**. v.16, p.337-343, 2018.

WEIDINGER, S.; NOVAK, N. Atopic dermatitis. **Lancet**. v.387, p.1109-1122, 2015.

WHO- World Health Organization – Depression and other common mental disorders: global health estimates (2017). Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254610/WHO-MSD-MER-2017.2-eng.pdf>>. Acesso em: 17 de fevereiro de 2019.

WILHELM, E. A.; FERREIRA, A. T.; PINZ, M. P.; DOS REIS, A.; VOGT A.G.;STEIN, A. L.; ZENI, G.; LUCHESE, C. Antioxidant effect of quinoline derivatives containing or not selenium: Relationship with antinociceptive action quinolines are antioxidant and antinociceptive. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v.89, p.457-467, 2017.

WOLLENBERG, A.; ORANJE, A.; DELEURAN, M.; SIMON, D.; SZALAI, Z.; KUNZ, B.; SVENSSON, A.; BARBAROT, S.; VON KOBYLETZKI, L.; TAIEB, A. Eczema task force 2015 position paper on diagnosis and treatment of atopic dermatitis in adult and paediatric patients. **The Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**. v.30, p.729-747, 2016.

WOLLENBERG, A.; SEBA, A.; ANTAL, A. S. Immunological and molecular targets of atopic dermatitis treatment. **British Journal of Dermatology**. v.170, p.7-11, 2014.

WORACHARTCHEEWAN, A.; PRACHAYASITTIKUL, S.; PINGAEW, R.; NANTASENAMAT, C.; TANTIMONGCOLWAT, T.; RUCHIRAWAT, S.; PRACHAYASITTIKUL, V. Antioxidant, cytotoxicity, and QSAR study of 1 adamantylthio derivatives of 3-picoline and phenylpyridines. **Journal of Medicinal Chemistry Research**. v.21, p.1-9, 2012.

WRIGHT, R.J.; COHEN, R.T.; COHEN, S. The impact of stress on the development and expression of atopy. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**. v.5, p.23-29, 2005.

XI, J.B.; FANG, Y.F.; FRETTE, B.; ZHU, M.L.; ZHU, T.; KONG, Y.N.; GUAN, F.J.; ZHAO Y.; ZHANG, X.W.; LI, H.Y.; MA, M.L.; HU, W. Structure-based design and synthesis of imidazo[1,2-a]pyridine derivatives as novel and potent Nek2 inhibitors with in vitro and in vivo antitumor activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v.126, p.1083-1106, 2017.

YAGHMAIE, P.; KOUDELKA, C.W.; SIMPSON, E.L. Mental health comorbidity in patients with atopic dermatitis. **Journal Allergy Clinical Immunology**. v.131, p.428-433, 2013.

YOO, J.; OMORI, M.; GYARMATI, D.; ZHOU, B.; AYE, T.; BREWER, A.; COMEAU, M.R.; CAMPBELL, D.J.; ZIEGLER, S.F. Spontaneous atopic dermatitis in mice expressing an inducible thymic stromal lymphopoietin transgene specifically in the skin. **Journal of Experimental Medicine**. v.202, p.541-549, 2005.

YOSIPOVITCH, G.; PAPOIU, A.D. What causes itch in atopic dermatitis?. **Current Allergy and Asthma Reports**. v.8, p.306-311, 2008.

YU, S.H.; ATTARIAN, H.; ZEE, P.; SILVERBERG, J.I. Burden of Sleep and Fatigue in US Adults With Atopic Dermatitis. **Dermatitis**. v.27, p.50-58, 2016.

ZHENG, T.; YU, J.; OH, M.H.; ZHU, Z. The atopic march: progression from atopic dermatitis to allergic rhinitis and asthma. **Allergy, Asthma and Immunology Research**. v.3, p.67-73, 2011.

ZIYAB, A.H.; KARMAUS, W.; YOUSEFI, M.; EWART, S.; SCHAUBERGER, E.; HOLLOWAY, J.W.; ZHANG, H.; ARSHAD, S.H. Interplay of filaggrin loss-of-function variants, allergic sensitization, and eczema in a longitudinal study covering infancy to 18 years of age. **PLoS ONE**. v.7, p.e32721, 2012.

Anexo

Anexo A – Comprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal



PARECER Nº
PROCESSO Nº

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
62/2018/CEEA/REITORIA
23110.025357/2018-96

Pelotas, 14 de junho de 2018

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação do efeito de compostos sintéticos inéditos na dermatite atópica induzida por 2,4-dinitroclorobenzeno em camundongos**”, processo nº **23110.023357/2018-96**, sob a responsabilidade de **Ethel Antunes Wilhelm** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 11/06/2018.

Solicitamos que no TCLE seja assinado pelo Chefe do Biotério (fornecedor dos animais).

Finalidade	(X) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	15/07/2018 a 15/07/2023
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> Balb/c
Nº de animais	208
Idade	60 dias
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central - UFPel

Número para cadastro: **23357-2018**

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA



Documento assinado eletronicamente por **ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPELLO FELIX**, **Médico Veterinário**, em 14/06/2018, às 10:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0178016** e o código CRC **8E1D3652**.

Referência: Processo nº 23110.025357/2018-96

SEI nº 0178016