## SILVIA ABIGAIL COAVOY SÁNCHEZ

# Efeito de compostos doadores de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) na dermatite atópica experimental induzida em camundongos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo 2021

## SILVIA ABIGAIL COAVOY SÁNCHEZ

# Efeito de compostos doadores de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) na dermatite atópica experimental induzida em camundongos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará

Versão corrigida

São Paulo 2021

#### CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Coavoy Sánchez, Silvia Abigail Efeito de compostos doadores de sulfeto de hidrogênio (H2S) na dermatite atópica experimental induzida em camundongos / Silvia Abigail Coavoy Sánchez; orientador Marcelo Nicolás Muscará. -- São Paulo, 2021. 148 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Sulfeto de hidrogênio (H2S). 2. Dermatite atópica. 3. Corticosteroides. 4. Mitocôndria. 5. Estresse oxidativo. I. Muscará, Marcelo Nicolás, orientador. II. Título.

## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):	Silvia Abigail Coavoy Sánchez
Titulo da Tese:	Efeito de compostos doadores de sulfeto de hidrogênio $(H_2S)$ na dermatite atópica experimental induzida em camundongos
Orientador:	Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a ................., considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) (	) Reprovado(a)
-------------------	----------------

Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Presidente:	Assinatura: Nome: Instituição:



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000 CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

## **CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "*Efeito de compostos doadores de sulfeto de hidrogênio (H2S) na dermatite atópica experimental induzida em camundongos*", registrado sob o protocolo nº **129/2016**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, 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 e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **06/12/2016** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: Dr.(a.) Marcelo Nicolás Muscará

- Departamento: Farmacologia

- Membros da Equipe: Anderson Romério Azevedo Cerqueira (Pós-Graduando), Simone Aparecida Teixeira (Técnico de laboratório), Leandro Rodrigues (Pós-graduando), Antonio Garcia Soares Jr (Pós-Graduando), Silvia Abigail Coavoy Sánchez (Pós-graduando), Soraia Katia Pereira Costa (Pesquisador colaborador), Luciana Biagini Lopes (Pesquisador colaborador)

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico <u>www.icb.usp.br/ceua</u>. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

### CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Effect of hydrogen sulfide (H2S) donors on experimental atopic dermatitis induced in mice*", protocol nº **129/2016**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8<sup>th</sup>, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15<sup>th</sup>, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **12/6/2016** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: Dr.(a.) Marcelo Nicolás Muscará

- Team members: Anderson Romério Azevedo Cerqueira (Graduate Student), Simone Aparecida Teixeira (Laboratory Technician), Leandro Rodrigues (Graduate Student), Antonio Garcia Soares Jr (Graduate Student), Silvia Abigail Coavoy Sánchez (Graduate Student), Soraia Katia Pereira Costa (Colaborator Researcher), Luciana Biagini Lopes (Colaborator Researcher).

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Mus musculus	Balb-C	Fêmea/female	6-8 semanas/weeks	432

São Paulo, 12 de dezembro de 2016.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento Secretária CEUA-ICB/USP

Dedico esta obra:

A Deus, meu Pai de amor, Criador, Sustentador, Salvador, Consolador, minha fonte de inspiração, sabedoria, conhecimento e compreensão. Sua graça, força, sustento, misericórdia e, acima de tudo, Sua fidelidade e amor tem sido a fonte da minha força ao longo deste programa. Obrigada, meu Deus, porque todos os dias me dás mais do que peço e muito mais do que mereço.

Aos meus pais, Lidia Sánchez e Daniel Coavoy, expressão maior desse amor sábio de Deus em minha vida, que nunca mediram esforços para me proporcionar tudo que havia de melhor: a educação, os valores e ensinamentos, aos quais sempre buscarei ser fiel. Obrigada pelo amor incondicional e o apoio constante em todos os momentos de minha vida.

Às minhas irmãs Katy Araceli e Ibeth Anny que sempre me dão seu apoio, força e estímulo durante minha caminhada. Obrigada, por sonhar comigo os meus sonhos, pelo amor e paciência, que me dão alento.

Amo vocês infinitamente!

#### AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer sinceramente ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado, pela confiança e orientação paciente, pelos incentivos e conselhos que ele forneceu ao longo de meu tempo como sua aluna. Eu não posso dizer obrigado o suficiente por seu tremendo apoio e guia.

Agradeço também à Profa. Dra. Soraia Kátia Pereira Costa, pela amizade e por todo o apoio para a realização deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Giuseppe Caliendo (Università degli Studi di Napoli "Federico II", Italia) por ter cedido os derivados de dexametasona, dexametasona-TBZ e dexametasona-ADT, e ao Prof. Dr. Mathew Whiteman (University of Exeter, UK) por ter cedido os compostos AP39 e RT01 para a realização deste trabalho.

Meus profundos agradecimentos à Dra. Simone Teixeira e ao Dr. Antonio Soares, pela amizade e a incansável colaboração, ensinamento e auxilio nas técnicas utilizadas neste trabalho.

Também gostaria de agradecer ao Anderson Cerqueira e à Karla Feitosa por sua amizade e importante apoio para a realização deste trabalho.

Agradeço a todos os antigos e atuais colegas e amigos do laboratório Leandro Rodrigues, Flavia Jesus, Janaíne Prata, Mariana Correia, Carolina Lourenço, Leonardo Marques, Jorge Dallazen, Roberta Umezu, Aline Guardabassio e Larissa Gonzaga, com quem tive o maior prazer de trabalhar.

Muito obrigada aos professores do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela transmissão de conhecimento, contribuindo para minha evolução intelectual.

Meus sinceros agradecimentos ao Prof. Dr. Ricardo Martins de Oliveira Filho pela amizade, pelo carinho e pela supervisão no estagio do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE), seus conselhos e ensinamentos certamente contribuíram positivamente para a minha formação.

Muito obrigada ao meu namorado Carlos de Oliveira Sousa: esta jornada de pesquisa não teria sido possível sem você, obrigada por seu apoio incansável.

Minha mais profunda gratidão e amor a todos os membros da minha família. Palavras não podem expressar o quão grata estou pelo apoio incondicional durante todo esse tempo. Suas orações por mim foram de suma importância para me manter forte e persistente.

Agradeço ao Brasil, país acolhedor e amigável, que me deu a oportunidade inesquecível e única de realizar meus estudos de pós-graduação.

Meu agradecimento a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que este trabalho torne-se realidade, a minha gratidão e meu respeito.

Que Deus cubra de bênçãos a vida de vocês!

#### \*\*\*\*\*

À Coodernação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos no país, no primeiro ano do doutorado. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coodernação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo n° 2017/16409-6 pela concessão de bolsa de doutorado no país, por todo o financiamento recebido, pelo investimento na minha formação científica, por possibilitar minha participação em eventos científicos nacionais e internacionais, os quais sem dúvida foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da CAPES e FAPESP.

"Tudo posso naquele que me fortalece."

Filipenses 4:13

#### RESUMO

Coavoy-Sánchez SA. Efeito de compostos doadores de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) na dermatite atópica experimental induzida em camundongos. [Tese (Doutorado em Farmacologia)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2021.

A dermatite atópica (DA) é uma doença inflamatória crônica da pele caracterizada por prurido intenso e lesões eczematosas, associada a uma resposta aumentada dos linfócitos T-helper-2. Os corticosteroides são comunmente usados para terapia anti-inflamatória da DA, entretanto, seu uso a longo prazo é limitado devido a vários efeitos adversos, o que faz necessário o desenvolvimento de opções terapêuticas alternativas. O sulfeto de hidrogênio (H2S) é produzido na pele e seus efeitos benéficos no controle da inflamação e do prurido tem sido demonstrados. Neste estudo, usando um modelo murino de DA induzido por 2,4-dinitroclorobenzeno (DNCB), nós avaliamos os efeitos de compostos derivados da dexametasona liberadores de H<sub>2</sub>S (híbridos com tiobenzamida - TBZ e anetol ditioletiona – ADT) e os doadores mitocondriais de H<sub>2</sub>S AP39 e RT01. Camundongos BALB/c fêmeas foram sensibilizados topicamente com DNCB nos dias 1-3. Nos dias 15, 17, 19 e 22, os camundongos foram desafiados topicamente com DNCB na pele dorsal e na orelha direita. Nos dias 19-23 após a sensibilização, os camundongos foram tratados topicamente com 250 nmol/animal de dexametasona ou dos derivados, ou 0,2 nmol/animal de AP39 ou RT01. O tratamento tópico com dexametasona ou derivados reduziu significativamente o prurido, as lesões cutâneas, edema de orelha, eosinofilia e esplenomegalia induzidos pelo DNCB. O tratamento com dexametasona-TBZ ou dexametasona-ADT, mas não dexametasona, inibiu o aumento de IL-4, e o tratamento com dexametasona-TBZ (mas não com dexametasona ou dexametasona-ADT), aumentou a produção de H<sub>2</sub>S e a atividade de glutationa peroxidase (GPx) na pele. Ambos dexametasona-TBZ e dexametasona-ADT, mas não a dexametasona, inibiram o aumento dos marcadores de estresse oxidativo (nitrotirosina e proteinas carboniladas) induzidos pelo DNCB. Além disso, enquanto a dexametasona induziu hiperglicemia, dexametasona-TBZ e dexametasona-ADT foram desprovidos desse efeito. Por outro lado, o tratamento com TBZ ou ADT-OH diminuiu a eosinofilia, e reduziu os níveis aumentados de IL-4 e da enzima alanina aminotransferase (ALT), induzidos pelo DNCB. O tratamento

tópico com AP39 reduziu o prurido, as lesões cutâneas, edema de orelha, eosinofilia e esplenomegalia induzidos pelo DNCB. AP39 reduziu os níveis de IL-4, eotaxina-1 e proteínas carboniladas, os quais estão aumentados na pele de camundongos com DA experimental. Por outro lado, o tratamento com RT01 resultou em redução das lesões cutâneas, eosinofilia e dos níveis aumentados de IL-4. Estes resultados mostram que a presença das porções liberadoras de H<sub>2</sub>S (TBZ ou ADT) na molécula da dexametasona, não só não interfere com os efeitos benéficos do corticoide, mas apresenta benefícios sobre a molécula parental, tais como o aumento da atividade de defesas antioxidantes no tratamento da DA e a prevenção da hiperglicemia associada aos corticosteroides. Por outro lado, a entrega específica de H<sub>2</sub>S na mitocôndria pelo composto AP39, pode suprimir os sinais clínicos da DA via modulação imunológica e manutenção do equilíbrio redox. Em resumo, os compostos avaliados neste trabalho configuram interessantes estratégias de potencial aplicação terapêutica no tratamento de pacientes com DA.

**Palavras-chave:** Sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S). Dermatite atópica. Corticosteroides. Mitocôndria. Estresse oxidativo.

#### ABSTRACT

Coavoy-Sánchez SA. Effect of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) donors on experimental atopic dermatitis induced in mice. [Ph.D thesis (Pharmacology)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2021.

Atopic dermatitis (AD) is a chronic inflammatory skin disease characterized by pruritus and eczematous skin lesions, associated with enhanced T-helper-2 lymphocyte response. Corticosteroids are commonly used as anti-inflammatory therapy for AD, however, long-term treatment is limited due to several side-effects, thus making necessary the development of alternative therapies. Hydrogen sulfide  $(H_2S)$  is produced in the skin and its beneficial effects on the control of inflammation and pruritus have been demonstrated. In this study, we used a murine model of AD induced by 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) and evaluated the effects of H<sub>2</sub>Sreleasing dexamethasone derivative compounds (hybrids with thiobenzamide - TBZ and anethole dithiolethione - ADT) and the mitochondria-targeted H<sub>2</sub>S donors AP39 and RT01. Female BALB/c mice were topically sensitized with DNCB on days 1-3. On days 15, 17, 19 and 22, the mice were topically challenged with DNCB on both the dorsal skin and the right ear. On days 19-23 after sensitization, the mice were topically treated with 250 nmol/mice dexamethasone or its derivatives, or 0.2 nmol/mice AP39 or RT01. Topical treatment with dexamethasone and its derivatives significantly reduced itching, skin severity score, ear edema, eosinophilia and splenomegaly induced by DNCB. Treatment with dexamethasone-TBZ or dexamethasone-ADT, but not dexamethasone, inhibited IL-4 levels, and treatment with dexamethasone-TBZ (but not with dexamethasone or dexamethasone-ADT), increased the production of  $H_2S$  and the activity of glutathione peroxidase (GPx) in skin. Both dexamethasone-TBZ and dexamethasone-ADT, the but not dexamethasone, inhibited the increased oxidative stress markers nitrotyrosine and carbonylated proteins induced by DNCB. In addition, while dexamethasone induced hyperglycemia, dexamethasone-TBZ and dexamethasone-ADT prevented this effect. On the other hand, treatment with TBZ or ADT-OH decreased eosinophilia, and reduced the increased levels of IL-4 and the enzyme alanine aminotransferase (ALT), induced by DNCB. Topical treatment with AP39 reduced itching, skin severity score, ear edema, eosinophilia and splenomegaly induced by DNCB. AP39 reduced IL-4, eotaxin-1 and carbonylated proteins levels which are increased in the skin of the AD

mice. On the other hand, treatment with RT01 resulted in a reduction of skin severity score, eosinophilia and IL-4 levels. These results show that the presence of  $H_2S$  releasing portions (TBZ or ADT) in the dexamethasone molecule, not only does not interfere with the beneficial effects of the corticosteroid, but also adds benefits to the parental molecule, such as the increased activity of antioxidant defenses in the treatment of AD and prevention of hyperglycemia associated with corticosteroids. On the other hand, the specific delivery of  $H_2S$  in the mitochondria by the compound AP39, can suppress the clinical signs of AD via immune modulation and maintenance of redox balance. In summary, the compounds evaluated in this work configure interesting strategies for the potential therapeutic application in the treatment of patients with AD.

**Keywords:** Hydrogen sulfide ( $H_2S$ ). Atopic dermatitis. Corticosteroids. Mitochondria. Oxidative stress.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Patogênese da dermatite atópica	26
Figura 2 - Biossíntese de H <sub>2</sub> S em mamíferos	31
Figura 3 - Estruturas químicas de doadores de H <sub>2</sub> S utilizados no presente trabalho	41
Figura 4 - Diagrama esquemático do protocolo experimental	43
Figura 5 - Efeito da aplicação repetida de DNCB no dorso de camundongos	57
Figura 6 - Concentração de IgE total em plasma	58
Figura 7 - Quantificação da produção de H <sub>2</sub> S	59
Figura 8 - Expressão proteica das enzimas geradoras de H <sub>2</sub> S por Western blot	61
Figura 9 - Efeitos comparativos do tratamento tópico com dexametasona, dexametasona-TBZ ou TBZ no prurido induzido por DNCB em camundongos	64
Figura 10 - Efeitos comparativos do tratamento tópico com dexametasona, dexametasona-TBZ ou TBZ nas lesões da pele induzidas por DNCB	66
<b>Figura 11 -</b> Efeitos comparativos do tratamento tópico com dexametasona, dexametasona-TBZ ou TBZ no edema de orelha induzido por DNCB	68
Figura 12 - Efeitos comparativos do tratamento tópico com dexametasona, dexametasona-TBZ ou TBZ no número total e diferencial de leucócitos no sangue.	70
<b>Figura 13 -</b> Efeitos comparativos do tratamento tópico com dexametasona, dexametasona-TBZ ou TBZ na esplenomegalia induzida por DNCB	72
Figura 14 - Efeitos comparativos do tratamento tópico com dexametasona, dexametasona-TBZ ou TBZ no número de esplenócitos totais em camundongos c DA experimental	om 73
<b>Figura 15 -</b> Efeitos comparativos do tratamento tópico com dexametasona, dexametasona-TBZ ou TBZ nas concentrações plasmáticas de IgE total em camundongos com DA experimental	74
Figura 16 - Efeitos comparativos do tratamento tópico com dexametasona ou dexametasona-TBZ nas concentrações de citocinas em pele de camundongos con DA experimental	m 76
Figura 17 - Efeito do tratamento tópico com TBZ nas concentrações de citocinas e pele de camundongos com DA experimental	em 77
<b>Figura 18 -</b> Efeitos comparativos do tratamento tópico com dexametasona, dexametasona-TBZ ou TBZ na produção endógena de H <sub>2</sub> S em pele de camundongos com DA experimental	78

<b>Figura 19 -</b> Efeitos comparativos do tratamento tópico com dexametasona ou dexametasona-TBZ na atividade das enzimas antioxidantes em pele de camundongos com DA experimental
Figura 20 - Efeito do tratamento tópico com TBZ na atividade das enzimas antioxidantes em pele de camundongos com DA experimental
Figura 21 - Efeitos comparativos do tratamento tópico com dexametasona ou dexametasona-TBZ sobre os marcadores de estresse oxidativo de proteínas em pele de camundongos com DA experimental
<b>Figura 22 -</b> Efeito do tratamento tópico com TBZ sobre os marcadores de estresse oxidativo de proteínas em pele de camundongos com DA experimental
Figura 23 - Efeitos comparativos do tratamento tópico com dexametasona ou dexametasona-TBZ nas concentrações plasmáticas de glicose, bilirrubina e enzimas hepáticas em camundongos com DA experimental
Figura 24 - Efeito do tratamento tópico com TBZ nas concentrações plasmáticas de glicose, bilirrubina e enzimas hepáticas em camundongos com DA experimental 86
<b>Figura 25 -</b> Efeitos do tratamento tópico com o derivado dexametasona-ADT ou ADT-OH no prurido induzido por DNCB em camundongos
<b>Figura 26 -</b> Efeitos do tratamento tópico com o derivado dexametasona-ADT ou ADT-OH nas lesões da pele induzidas por DNCB em camundongos
<b>Figura 27 -</b> Efeitos do tratamento tópico com o derivado dexametasona-ADT ou ADT-OH no edema de orelha induzido por DNCB em camundongos
Figura 28 - Efeitos do tratamento tópico com o derivado dexametasona-ADT e ADT- OH no número total e diferencial de leucócitos no sangue de camundongos com DA experimental
<b>Figura 29 -</b> Efeitos do tratamento tópico com o derivado dexametasona-ADT ou ADT-OH na esplenomegalia e no número de esplenócitos totais em camundongos com DA experimental
<b>Figura 30 -</b> Efeitos do tratamento tópico com o derivado dexametasona-ADT ou ADT- OH nos níveis plasmáticos de IgE total em camundongos com DA experimental 92
<b>Figura 31 -</b> Efeitos do tratamento tópico com o derivado dexametasona-ADT ou ADT-OH nas concentrações de citocinas em pele de camundongos com DA experimental
<b>Figura 32 -</b> Efeitos do tratamento tópico com o derivado dexametasona-ADT ou ADT-OH na produção endógena de H <sub>2</sub> S em pele de camundongos com DA experimental
<b>Figura 33 -</b> Efeitos do tratamento tópico com o derivado dexametasona-ADT ou ADT-OH na atividade das enzimas antioxidantes em pele de camundongos com DA experimental

<b>Figura 34 -</b> Efeitos do tratamento tópico com o derivado dexametasona-ADT ou ADT-OH sobre os marcadores de estresse oxidativo de proteínas em pele de camundongos com DA experimental
<b>Figura 35 -</b> Efeitos do tratamento tópico com o derivado dexametasona-ADT ou ADT-OH nas concentrações plasmáticas de glicose, bilirrubina e enzimas hepáticas em camundongos com DA experimental
<b>Figura 36 -</b> Efeitos do tratamento tópico com AP39 ou RT01 no prurido induzido por DNCB em camundongos
<b>Figura 37 -</b> Efeitos do tratamento tópico com AP39 ou RT01 nas lesões da pele induzidas por DNCB em camundongos
<b>Figura 38 -</b> Efeitos do tratamento tópico com AP39 ou RT01 no edema de orelha induzido por DNCB em camundongos
<b>Figura 39 -</b> Efeitos do tratamento tópico com AP39 ou RT01 no número total e diferencial de leucócitos no sangue de camundongos com DA experimental 104
Figura 40 - Efeitos do tratamento tópico com AP39 ou RT01 na esplenomegaliainduzida por DNCB em camundongos106
<b>Figura 41 -</b> Efeitos do tratamento tópico com AP39 ou RT01 no número de esplenócitos totais em camundongos com DA experimental
<b>Figura 42 -</b> Efeitos do tratamento tópico com AP39 ou RT01 nos níveis plasmáticos de IgE total em camundongos com DA experimental
<b>Figura 43 -</b> Efeitos do tratamento tópico com AP39 nas concentrações de citocinas em pele de camundongos com DA experimental
<b>Figura 44 -</b> Efeito do tratamento tópico com RT01 nas concentrações de citocinas em pele de camundongos com DA experimental
<b>Figura 45 -</b> Efeitos do tratamento tópico com AP39 ou RT01 na produção endógena de H <sub>2</sub> S em pele de camundongos com DA experimental
<b>Figura 46 -</b> Efeitos do tratamento tópico com AP39 na atividade das enzimas antioxidantes em camundongos com DA experimental
<b>Figura 47 -</b> Efeito do tratamento tópico com RT01 na atividade das enzimas antioxidantes em pele de camundongos com DA experimental
<b>Figura 48 -</b> Efeitos do tratamento tópico com AP39 sobre os marcadores de estresse oxidativo de proteínas em pele de camundongos com DA experimental 116
<b>Figura 49 -</b> Efeito do tratamento tópico com RT01 sobre os marcadores de estresse oxidativo de proteínas em pele de camundongos com DA experimental

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b> Tratamento por via de administração tópica de Dexa, Dexa-TBZ eTBZ	42
Tabela 2 - Tratamento por via de administração tópica de Dexa-ADT e ADT-OH.	42
Tabela 3 - Tratamento por via de administração tópica de AP39 e RT01	42
Tabela 4 - Resultados do tratamento com Dexa, Dexa-TBZ, Dexa-ADT, TBZ e   ADT-OH	117
Tabela 5 - Resultados do tratamento com AP39 e RT01	117

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3MP	3-mercaptopiruvato
3MST	3-mercaptopiruvato sulfutransferase
ADT-OH	Anetol ditioletiona
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroides
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
BSA	Albumina de soro bovino
CAT	Cisteino aminotransferase
CBS	Cistationina $\beta$ -sintase
CD	Cluster diferentiation
CO	Monóxido de carbono
COX	Cicloxigenase
CSE	Cistationina γ-liase
DA	Dermatite atópica
DAO	D-amino-oxidase
DNCB	2,4-dinitroclorobenzeno
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPM	Erro padrão da média
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GGT	Gama glutamil transpeptidase
GMPc	Guanosina-3',5'-monofosfato cíclico
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa reductase
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
GST	Glutationa S-transferase
$H_2S$	Sulfeto de hidrogênio
lgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
ILC2	Células linfoides inatas do grupo 2
K <sub>ATP</sub>	Canais de potássio dependentes de ATP
K <sub>Ca</sub>	Canais de potássio ativados por cálcio

Na <sub>2</sub> S	Sulfeto de sódio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NaHS	Hidrossulfeto de sódio
NF-ĸB	Fator nuclear-ĸB
NO	Óxido nítrico
Nrf2	Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2
PAR-2	Receptor ativado por protease tipo 2
PBS	Tampão fosfato salino
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
S <sup>2-</sup>	Íon sulfeto
SH <sup>-</sup>	Íon hidrossulfeto
SOD	Superóxido dismutase
TBZ	4-hidroxi-tiobenzamida
Th	Células T- <i>helper</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TRPA1	Receptor de potencial transitório anquirina tipo 1
TRPV1	Receptor de potencial transitório vaniloide tipo 1
TSLP	Linfopoietina estromal tímica

### SUMARIO

1 INTRODUÇAO23
1.1 Dermatite atópica23
1.2 Sulfeto de hidrogênio (H <sub>2</sub> S)28
1.3 Implicações do $H_2S$ na fisiopatologia da pele e doenças dermatológicas.35
1.4 Justificativa
1.5 Objetivos
2 MATERIAL E MÉTODOS40
2.1 Animais
2.2 Drogas
2.3 Modelo experimental de dermatite atópica e aplicação do tratamento41
2.4 Avaliação dos parâmetros pruriceptivos e inflamatórios43
2.4.1 Análise do prurido em camundongos com modelo de DA43
2.4.2 Avaliação macroscópica da gravidade das lesões
2.4.3 Avaliação do edema de orelha44
2.5 Análises de sangue44
2.5.1 Quantificação de leucócitos no sangue44
2.5.2 Análises bioquímicas45
2.6 Peso do baço e número de esplenócitos45
2.7 Determinação das concentrações de citocinas e IgE45
2.7.1 Quantificação das concentrações de IgE total45
2.7.2 Quantificação das concentrações de IL-4, IL-5, IL-13 e eotaxina-146
2.8 Determinação da atividade das enzimas antioxidantes
2.8.1 Atividade das superóxido dismutase (SOD)47
2.8.2 Atividade da catalase
2.8.3 Atividade da glutationa peroxidase (GPx)
2.8.4 Atividade da glutationa reductase (GR)50
2.8.5 Atividade da glutationa S-transferase (GST)51
2.9 Analise dos marcadores de estresse oxidativo51
2.9.1 Análise da expressão de resíduos proteicos de nitrotirosina por SLOT BLOT.52
2.9.2 Determinação do conteúdo de proteínas carboniladas por SLOT BLOT52
2.10 Quantificação da produção de H <sub>2</sub> S (método do sulfeto de chumbo)53
2.11 Detecção da expressão proteica por Western Blot

2.12 Analise dos resultados55
3 RESULTADOS56
3.1 Dermatite atópica experimental induzida pela aplicação repetida de DNCB56
3.1.1 Parâmetros pruriceptivos e inflamatórios56
3.1.2 Quantificação das concentrações de IgE58
3.1.3 Quantificação da produção endógena de $H_2S$ (método do sulfeto de chumbo).59
3.1.4 Análise da expressão proteica das enzimas geradoras de H <sub>2</sub> S por Western blot60
3.2 Efeitos comparativos do tratamento tópico com dexametasona,
dexametasona-TBZ ou a porção liberadora TBZ no desenvolvimento da DA
experimental63
3.2.1 Efeitos comparativos da dexametasona, dexametasona-TBZ e TBZ no prurido em camundongos com DA experimental
3.2.2 Efeitos comparativos da dexametasona, dexametasona-TBZ e TBZ no escore de lesões cutâneas em camundongos com DA experimental
3.2.3 Efeitos comparativos da dexametasona, dexametasona-TBZ e TBZ no edema de orelha induzido em camundongos com DA experimental
3.2.4 Efeitos comparativos da dexametasona, dexametasona-TBZ e TBZ no número total e diferencial de leucócitos no sangue69
3.2.5 Efeitos comparativos da dexametasona, dexametasona-TBZ e TBZ na esplenomegalia e número de esplenócitos71
3.2.6 Efeitos comparativos da dexametasona, dexametasona-TBZ e TBZ nas concentrações plasmáticas de IgE em camundongos com DA experimental74
3.2.7 Efeitos comparativos da dexametasona, dexametasona-TBZ e TBZ nas concentrações de IL-4, IL-5, IL-13 e eotaxina-1 em pele de camundongos com DA experimental
3.2.8 Efeitos comparativos da dexametasona, dexametasona-TBZ e TBZ na produção endógena de $H_2S$ em pele de camundongos com DA experimental78
3.2.9 Efeitos comparativos da dexametasona, dexametasona-TBZ e TBZ na atividade das enzimas antioxidantes em camundongos com DA experimental79
3.2.10 Efeitos comparativos da dexametasona, dexametasona-TBZ e TBZ nos marcadores de estresse oxidativo em camundongos com DA experimental82
3.2.11 Efeitos comparativos da dexametasona, dexametasona-TBZ e TBZ nas concentrações plasmáticas de glicose, bilirrubina e enzimas hepáticas
3.3 Efeitos do tratamento tópico com dexametasona-ADT ou ADT-OH no
desenvolvimento da DA experimental87

3.3.1 Efeitos da dexametasona-ADT e ADT-OH no prurido em camundongos com DA experimental
3.3.2 Efeitos da dexametasona-ADT e ADT-OH no escore de lesões cutâneas em camundongos com DA experimental
3.3.3 Efeitos da dexametasona-ADT e ADT-OH no edema de orelha induzido em camundongos com DA experimental
3.3.4 Efeitos da dexametasona-ADT e ADT-OH no número total e diferencial de leucócitos no sangue90
3.3.5 Efeitos da dexametasona-ADT e ADT-OH na esplenomegalia e número de esplenócitos
3.3.6 Efeitos da dexametasona-ADT e ADT-OH nas concentrações plasmáticas de IgE de camundongos com DA experimental92
3.3.7 Efeitos da dexametasona-ADT e ADT-OH nas concentrações de IL-4, IL-5, IL- 13 e eotaxina-1 em pele de camundongos com DA experimental
3.3.8 Efeitos da dexametasona-ADT e ADT-OH na produção endógena de $H_2$ S em pele de camundongos com DA experimental95
3.3.9 Efeitos da dexametasona-ADT e ADT-OH na atividade das enzimas antioxidantes em camundongos com DA experimental96
3.3.10 Efeitos da dexametasona-ADT e ADT-OH nos marcadores de estresse oxidativo em camundongos com DA experimental98
3.3.11 Efeitos da dexametasona-ADT e ADT-OH nas concentrações plasmáticas de glicose, bilirrubina e enzimas hepáticas
3.4 Efeitos do tratamento tópico com AP39 ou RT01 no desenvolvimento da
DA experimental101
3.4.1 Efeitos do tratamento com AP39 ou RT01 no prurido em camundongos com DA experimental
3.4.2 Efeitos do tratamento com AP39 ou RT01 no escore de lesões cutâneas em camundongos com DA experimental102
3.4.3 Efeitos do tratamento com AP39 ou RT01 no edema de orelha induzido em camundongos com DA experimental103
3.4.4 Efeitos do tratamento com AP39 ou RT01 no número total e diferencial de leucócitos no sangue
3.4.5 Efeitos do tratamento com AP39 ou RT01 na esplenomegalia e número de esplenócitos
3.4.6 Efeitos do tratamento com AP39 ou RT01 nas concentrações plasmáticas de
IgE em camundongos com DA experimental107

3.4.8 Efeitos do tratamento com AP39 ou RT01 na produção endógena de $H_2S$	Sem
pele de camundongos com DA experimental	111
<i>Efeitos do tratamento com AP39 ou RT01 na atividade das enzimas</i> oxidantes em camundongos com DA experimental	112
3.4.10 Efeitos do tratamento com AP39 ou RT01 nos marcadores de estresse oxidativo em camundongos com DA experimental	115
4 DISCUSSÃO	118
5 CONCLUSÕES	130
REFERÊNCIAS	131

#### 1 INTRODUÇÃO

#### 1.1 Dermatite atópica

A dermatite atópica (DA) é uma doença inflamatória crônica da pele caracterizada por lesões eczematosas recorrentes e prurido intenso (Langan et al., 2020). A DA é a manifestação cutânea de uma condição sistêmica chamada "atopia", que também dá origem à asma, rinite alérgica e alergia alimentar (Leung et al., 2004). O termo "atopia" refere-se a uma tendência pessoal e/ou familiar a desenvolver uma hipersensibilidade mediada por imunoglobulina E (IgE) em resposta a alérgenos ambientais comuns (Johansson et al., 2004).

A DA é a doença dermatológica mais comum na infância, mas pode persistir ou começar na idade adulta. A sua prevalência tem crescido exponencialmente ao longo das últimas décadas em países industrializados afetando até 25% das crianças e de 7-10% dos adultos em todo o mundo (Weidinger et al., 2018). Ambos os sexos são igualmente afetados pela DA até os 6 anos de idade, sendo que depois dos 6 anos de idade a prevalência da DA é maior no sexo feminino (DaVeiga, 2012). No Brasil, de acordo com o International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC; fase 3), a prevalência da DA avaliada em 20 cidades foi de 8,2% em crianças de 6 a 7 anos e 5% em adolescentes de 13 a 14 anos (Solé et al., 2006).

A DA tem uma etiologia complexa e multifatorial, acredita-se que fatores genéticos, imunológicos e ambientais estejam interligados para produzir uma disfunção da barreira da pele, bem como desregulação do sistema imunológico (Tollefson et al., 2014), que são consideradas cruciais para a patogênese da DA (Figura 1).

A predisposição genética é evidente em indivíduos com DA, já que a concordância entre gêmeos monozigóticos é muito maior do que entre gêmeos heterozigóticos (Schultz Larsen, 1993), além do fato de que filhos de pais com DA têm maior risco de desenvolver a doença (Dold et al., 1992). Dentre os genes envolvidos, estudos mostram uma associação significativa entre o gene da filagrina e a DA, sabe-se que 20-40% dos pacientes com DA têm uma mutação de perda de função no gene que codifica a filagrina (Palmer et al., 2006; Irvine et al., 2011). A filagrina é uma proteína estrutural expressa nas camadas externas da epiderme e

desempenha um papel fundamental na diferenciação epidérmica, na função barreira cutânea, bem como na prevenção da perda de água da pele; um produto de degradação da filagrina, o fator de hidratação natural (NMF), desempenha um papel essencial na manutenção da hidratação do estrato córneo. A mutação no gene que codifica a filagrina esta associada com alteração da função barreira, o que leva a um aumento da permeabilidade da pele a substâncias exógenas, perda transepidérmica de água, aumento do pH na superfície da pele, pele seca e maior risco de infecção microbiana (Brown, McLean, 2012; Cabanillas, Novak, 2016).

A disfunção da barreira epidérmica pode ocorrer também como resultado de outros fatores como, diminuição de peptídeos antimicrobianos (como as betadefensinas e catelicidinas), expressão reduzida de proteínas de *tight junctions* (como a claudina-1), expressão diminuída de proteínas estruturais (loricrina e involucrina), redução de lipídios do estrato córneo (principalmente ceramidas), aumento no pH da pele, um padrão alterado de colonização da microbiota cutânea e danos mecânicos na pele (Peng, Novak, 2015; David Boothe et al., 2017; Nakahara et al., 2020). A disfunção da barreira da pele é um importante fator patogênico da DA, em vista de que uma barreira cutânea inadequada pode permitir a penetração de alérgenos (como por exemplo, os derivados de ácaros, mofos e pólen) e irritantes ambientais, e predispõe a infecção por patógenos microbianos tais como *Staphylococcus aureus* (que coloniza em aproximadamente 90% dos pacientes com DA), cujas proteases exógenas podem danificar ainda mais a barreira da pele; essa interação de fatores conduz a uma resposta inflamatória e às consequentes manifestações clínicas da DA (Nutten, 2015).

Estudos recentes sugerem que, a ruptura da barreira epidérmica estimula os queratinócitos a produzirem grandes quantidades de citocinas imunorreguladoras, como a linfopoietina estromal tímica (TSLP), interleucina (IL)-25 e IL-33; esses mediadores ativam as células linfoides inatas do grupo 2 (ILC2) residentes na pele e as respostas imunes mediadas por células T-*helper* (Th) do tipo 2, via sinalização OX40 (Salimi et al., 2013; Nakahara et al., 2020). As citocinas TSLP e IL-33 também atuam diretamente nos neurônios sensoriais cutâneos e medeiam o prurido, causando mais danos ao tecido (Mollanazar et al., 2016). As ILC2 ativadas produzem IL-5 e IL-13, que ativam eosinófilos e também promovem a resposta Th2 (Salimi et al., 2013).

Por outro lado, uma resposta imunológica pode, por sua vez, desencadear a ruptura da barreira epidérmica e ser responsável pelas manifestações cutâneas da DA. Na fase aguda da DA existe um predomínio de diferenciação de células Th2, caracterizada por maior produção de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-31, infiltração dérmica de células T CD4+, que são consideradas as principais causas da inflamação, bem como um número aumentado de vários subconjuntos de células dendríticas (Langan et al., 2020; Nakahara et al., 2020). As IL-4 e IL-13 induzem um aumento na síntese de IgE pelas células B, levando à ativação de mastócitos e a uma resposta exagerada a alérgenos (Brandt, 2011; Gandhi et al., 2016), e regulam negativamente a expressão de proteínas epidérmicas como a filagrina, prejudicando a função barreira cutânea (Howell et al., 2007). Por sua vez, a IL-5 produz aumento da infiltração de eosinófilos na pele (Brandt, 2011). Adicionalmente, as IL-4, IL-13 e IL-31 atuam diretamente nos nervos e causam coceira e rompimento da barreira (Oh et al., 2013; Cevikbas et al., 2014; Campion et al., 2019). Além do desvio Th2, a IL-22 produzida por células Th22 também está ligada à inflamação da pele na DA. A IL-22 induz uma inibição da diferenciação nos queratinócitos e diminuição da expressão dos complexos de diferenciação epidérmica, como filagrina, loricrina e involucrina (Boniface et al., 2005; Nograles et al., 2008; Gutowska-Owsiak et al., 2011). O papel e a ativação das respostas mediadas por células Th1 e Th17 ainda não são claras, mas as citocinas associadas parecem ser superexpressas em estágios crônicos da doença (Weidinger et al., 2018).

Embora fatores genéticos e imunológicos sejam claramente importantes na DA, o aumento da prevalência global da doença destaca o papel dos fatores ambientais. Evidências indicam que uma variedade de poluentes atmosféricos tais como fumaça de tabaco, compostos orgânicos voláteis, dióxido de nitrogênio, monóxido de carbono e material particulado atuam como fatores de risco e agravantes da DA e outras doenças atópicas (Penard-Morand et al., 2010; Jedrychowski et al., 2011; Yi et al., 2012; Kim et al., 2013). Na pele a exposição a poluentes atmosféricos induz estresse oxidativo, como resultado de um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e os mecanismos de defesa antioxidantes (Ahn, 2014; Bertino et al., 2020). De fato, o estresse oxidativo desempenha um papel importante em muitas doenças da pele, incluindo a DA (Omata et al., 2001; Nakai et al., 2009; Sivaranjani et al., 2013), dado que é capaz de induzir alterações do sistema imune e disfunção da barreira da pele por peroxidação lipídica e oxidação

de proteínas epidérmicas (Ahn, 2014). Além disso, aeroalérgenos como ácaros da poeira doméstica, mofo, pólen ou pelos de animais também foram implicados como fatores desencadeantes da DA e outras doenças atópicas (Kutlu et al., 2013; Werfel et al., 2015; Cid et al., 2019). Outros fatores ambientais conhecidos por impactar a DA incluem a dureza da água e contaminantes na água, sabões e detergentes e o uso prolongado de corticosteroides tópicos (Kao et al., 2003; Perkin et al., 2016; Danby et al., 2018).



**Figura 1** - Patogênese da dermatite atópica. Os queratinócitos com barreira interrompida são produtores potentes de citocinas imunorreguladoras, como a TSLP, IL-25 e IL-33. Essas citocinas induzem uma resposta imune do tipo 2. As citocinas do tipo 2, por outro lado, inibem a função barreira ao regular negativamente a expressão da filagrina (FLG). Além disso, essas citocinas atuam diretamente nos nervos causando coceira, além da indução de inflamação e rompimento da barreira. Fonte: Nakahara et al., 2020.

Dentre as manifestações clinicas da DA, o prurido intenso é o principal sintoma, o qual pode começar antes mesmo das manifestações das lesões cutâneas. O prurido pode ocorrer durante todo o dia, mas é mais intenso à noite. Em casos graves, os pacientes arranham as áreas da pele lesionada até ocasionar escoriações e sangramento (Hong et al., 2011; Arkwright et al., 2014). Vários mediadores do prurido e seus receptores correspondentes são relatados como responsáveis pela coceira na DA, incluindo histamina e seus receptores H1 e H4 (H1R e H4R), certas proteases, substancia P, endotelina-1, citocinas (TSLP, IL-4, IL-13 e IL-31), receptores ativados por proteases do tipo 2 (PAR-2), receptores de potencial transitório anquirina do tipo 1 (TRPA1) e vanilóide do tipo 1 (TRPV1), entre outros (Darsow et al., 2011; Mollanazar et al., 2016). Os sinais clínicos da DA incluem eritema, pápulas, vesículas, escoriações, crostas, pele seca, rachada ou escamosa. As características e distribuição das lesões são distintas dependendo da idade; em lactentes, o eczema ocorre predominantemente nas bochechas, pescoço, couro cabeludo e tronco, mas não a área da fralda, enquanto que nas crianças mais velhas e nos adultos, as lesões geralmente estão localizadas nas superfícies de flexão das extremidades, dorso das mãos, pescoço e pálpebras (Thomsen, 2014; Nutten, 2015).

A DA causa sofrimento físico e emocional para os pacientes e suas famílias. Especialmente em pacientes pediátricos, a DA pode ter um impacto profundo na qualidade de vida. O prurido noturno ocasiona a perda de sono e concentração, resultando em desempenho escolar diminuído. As lesões cutâneas visíveis podem causar isolamento social, rejeição de colegas e bullying. Também foram encontradas taxas aumentadas de ansiedade e transtornos depressivos em pacientes com DA (Blome et al., 2016).

Existem várias possibilidades terapêuticas para controlar temporariamente os sinais e os sintomas da DA, mas nenhum deles é capaz de curar a doença; assim, os surtos após a suspensão do tratamento são bastante frequentes. A aplicação regular de hidratantes em combinação com corticosteroides tópicos e inibidores de calcineurina tópicos (imunomoduladores, como tacrolimus ou pimecrolimus) e prevenção de fatores de exacerbação compreendem tratamentos básicos para DA. Casos moderados a graves de DA requerem a adição de um tratamento sistêmico e/ou fototerapia ultravioleta. Corticosteroides orais, ciclosporina, metotrexato, micofenolato e azatioprina são alternativas estabelecidas quando o tratamento sistêmico é necessário (Sidbury et al., 2014). No entanto, a variabilidade da resposta do individuo e os conhecidos efeitos adversos dessas drogas, tais como atrofia cutânea, supressão do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, imunossupressão, reativação de uma infecção latente, entre outros, são a razão fundamental para procurar novas alternativas terapêuticas que permitam alcançar um melhor controle

da doença com menores riscos de efeitos adversos. O progresso na compreensão da imunopatologia da DA resultou em novas terapias que visam vias específicas com maior eficácia, e com menos efeitos colaterais sistêmicos. Assim, ao longo dos anos recentes, muitas drogas biológicas foram (e ainda estão) sob avaliação, no intuito de abordar de forma mais eficaz e menos tóxica o tratamento da DA. Com base em seu mecanismo de ação, estas terapias biológicas são classificadas em: terapia dirigida contra IgE (Omalizumab), agentes anti IL-4 (Dupilumab) e anti IL-4/IL-13 (Lebrikizumab, Tralokinumab), terapia dirigida contra IL-31 (Nemolizumab), anti IL-12/23 (Ustekinumab), bloqueio de IL-22 (Fezakinumab), terapia dirigida contra TSLP (Tezepelumab), inibidores da fosfodiesterase 4 (Apremilast, Crisaborol) e inibidores das vias JAK-STAT (Tofacitinib) (Deleanu, Nedelea, 2019).

#### 1.2 Sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S)

A terapia com banhos de águas minerais contendo enxofre tem sido usada há séculos como procedimento de medicina popular para o tratamento e alívio de varias condições e doenças dermatológicas incluindo acne, rosácea, sarna, dermatite atópica, psoríase e urticária. Exercendo efeitos na pele como anti-inflamatório, queratoplástico, cicatrizante, antipruriginoso, antifúngico e antibacteriano (Shani et al., 1997; Farina et al., 2011; Mazzulla et al., 2013; Joly et al., 2014; Karagülle et al., 2018); tais efeitos foram atribuídos, em parte, à presença de altas concentrações de compostos derivados do enxofre, dentre os quais conta-se o sulfeto de hidrogênio (Matz et al., 2003; Carbajo, Maraver, 2017; Hamidizadeh et al., 2017), presente em concentrações semelhantes às encontradas em fluidos biológicos de mamíferos (i.e., na faixa de 0,3 a 8 mM).

O sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ) é um gás incolor, inflamável, solúvel em água e lipídeos com o cheiro característico de ovo podre. Durante várias décadas o  $H_2S$  recebeu muita atenção por ser um gás contaminante ambiental altamente tóxico e perigoso para a saúde humana (Smith, Gosselin, 1979; Reiffenstein et al., 1992). Entretanto, desde a detecção de sua presença e a caracterização de sua produção enzimática em mamíferos (Stipanuk, Beck, 1982), e a posterior descoberta de seu papel como um neuromodulador endógeno (Abe, Kimura, 1996), o  $H_2S$  emergiu como uma molécula de sinalização em sistemas biológicos, sendo reconhecida como membro da família de gasotransmissores, junto com o óxido nítrico (NO) e o

monóxido de carbono (CO). O  $H_2S$  participa na regulação de varias condições fisiológicas e patológicas nos diferentes sistemas, incluindo o sistema nervoso central, cardiovascular, renal, respiratório, digestivo, entre outros (para revisão, vide Cao et al., 2019). Particularmente na pele, o  $H_2S$  endógeno participa na regulação de funções importantes como vasodilatação, angiogênese, proliferação celular, apoptose e inflamação (Gobbi et al., 2009; Kutz et al., 2015; Lee et al., 2016; Xie et al., 2016).

O H<sub>2</sub>S é facilmente dissolvido em água com uma solubilidade de 80 mM a 37°C. Em solução aquosa o H<sub>2</sub>S é um ácido fraco, com constantes de dissociação ácida (pKa) de 6,90 e 11,96. O H<sub>2</sub>S pode se dissociar em H<sup>+</sup> e íon hidrossulfeto (HS<sup>-</sup>), que por sua vez pode se dissociar a H<sup>+</sup> e íon sulfeto (S<sup>2-</sup>) como mostra a reação seguinte: H<sub>2</sub>S  $\rightleftharpoons$  H<sup>+</sup> + HS<sup>-</sup>  $\rightleftharpoons$  2H<sup>+</sup> + S<sup>2-</sup>. Em sistemas biológicos o H<sub>2</sub>S está presente como H<sub>2</sub>S e HS<sup>-</sup>, no interior da célula existem quantidades quase iguais de H<sub>2</sub>S e HS<sup>-</sup>, e aproximadamente 14% de H<sub>2</sub>S e 86% HS<sup>-</sup> no fluido extracelular e no plasma a 37°C e pH 7,4 (Wang, 2012; Zheng et al., 2015; Cao et al., 2019). O H<sub>2</sub>S é uma molécula altamente lipofílica e penetra facilmente por difusão passiva a bicamada lipídica das membranas celulares sem a necessidade de transportadores específicos (Riahi, Rowley, 2014).

A produção endógena de H<sub>2</sub>S em mamíferos (Figura 2) ocorre principalmente por vias enzimáticas de metabolização dos aminoácidos L-cisteína e/ou homocisteína, sendo as principais vias aquelas que dependem das enzimas cistationina  $\beta$ -sintase (CBS) e cistationina  $\gamma$ -liase (CSE), que requerem do cofator piridoxal-5'-fosfato (vitamina B<sub>6</sub>), e estão envolvidas na via de trans-sulfuração (Wang, 2012; Marutani, Ichinose, 2020). A CBS catalisa a condensação da homocisteína com L-serina para gerar cistationina. Esta, por sua vez é clivada pela CSE produzindo L-cisteína, que pode ser usada como substrato para a produção de H<sub>2</sub>S. A CBS produz H<sub>2</sub>S a partir de L-cisteína por meio de uma reação de  $\beta$ eliminação, e a CSE gera H<sub>2</sub>S por meio de  $\alpha$ , $\beta$ -eliminação. Além disso, ambas as enzimas podem catalisar a reação de substituição  $\beta$ , que condensa duas moléculas de L-cisteína ou catalisar a reação de condensação da homocisteína com L-cisteína para produzir H<sub>2</sub>S (Chen et al., 2004; Chiku et al., 2009; Singh et al., 2009). A CSE também pode usar apenas homocisteína para gerar H<sub>2</sub>S e é responsável pela depuração da homocisteína sob condições de hiper-homocisteinemia (Chiku et al., 2009). A terceira via enzimática para a produção de H<sub>2</sub>S envolve a enzima 3mercaptopiruvato sulfutransferase (3MST) acoplada à cisteino aminotransferase (CAT). O 3MST produz H<sub>2</sub>S a partir de 3-mercaptopiruvato (3MP) que é gerado pela CAT a partir de L-cisteína e  $\alpha$ -cetoácidos ( $\alpha$ -cetobutirato ou  $\alpha$ -cetoglutarato), na presença de tiol (-SH) e agentes redutores (Nagahara et al., 2007; Shibuya et al., 2009b). Uma nova via alternativa foi descrita em roedores para a produção endógena de H<sub>2</sub>S, a qual usa como substrato o aminoácido D-cisteína envolvendo as enzimas D-amino-oxidase (DAO) e 3MST (Shibuya et al., 2013).

Todas as enzimas estão expressas de forma ampla em vários tecidos, no entanto, as enzimas CBS e DAO são expressas principalmente no sistema nervoso, cérebro e rins (Moore et al., 2003; Kabil et al., 2011; Shibuya et al., 2013), enquanto a CSE é predominantemente expressa no sistema cardiovascular, fígado, intestino delgado e estômago (Ishii et al., 2004; Kabil et al., 2011) e o sistema 3MST/CAT está localizado em neurônios, coração, endotélio vascular, fígado, rins e músculo liso (Nagahara et al., 1998; Shibuya et al., 2009a). As enzimas CBS e CSE estão localizadas no citosol, enquanto a 3MST e CAT estão localizadas tanto no citosol quanto nas mitocôndrias, a DAO é encontrada nos peroxissomos. No entanto, CBS e CSE podem se translocar para as mitocôndrias quando a atividade do 3MST é significativamente suprimida em condições oxidativas, como a hipóxia (Kimura, 2015). Na pele, a expressão proteica das enzimas CSE e 3MST foi confirmada por análise de Western blot (Liu et al., 2014b; Kutz et al., 2015; Greaney et al., 2017), ainda, análises de expressão gênica revelaram a expressão das enzimas CSE e CBS em queratinócitos normais e níveis muito baixos de expressão das enzimas CSE, CBS e 3MST em melanócitos normais (Panza et al., 2015; Lee et al., 2016).

Além das vias enzimáticas, a produção endógena de H<sub>2</sub>S pode ocorrer também via processos não-enzimáticos menos conhecidos. O H<sub>2</sub>S pode ser gerado a partir de enxofre elementar, persulfetos ou polissulfetos, que são reduzidos pela glutationa envolvendo NADH ou NADPH como doadores de elétrons fornecidos por glicólise (Searcy, Lee, 1998; Szabo, Papapetropoulos, 2017; Cao et al., 2019). O tiossulfato  $(S_2O_3^{2-})$  e o sulfito  $(SO_3^{2-})$  também podem formar H<sub>2</sub>S em uma reação redutora envolvendo o piruvato como doador de hidrogênio (Kolluru et al., 2013). O H<sub>2</sub>S também pode ser produzido por uma reação catalisada não enzimaticamente por ferro (Fe<sup>3+</sup>) e vitamina B<sub>6</sub>, com a L-cisteína servindo como substrato, essa reação produz piruvato, NH<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>S (Yang et al., 2019).

Além disso, também foi relatada a produção de  $H_2S$  pela microflora enterobacteriana, principalmente por bactérias redutoras de enxofre, a qual influencia significativamente a biodisponibilidade de  $H_2S$  no tecido do hospedeiro (Shen et al., 2013).



**Figura 2** - Biossíntese de H<sub>2</sub>S em mamíferos. CBS, cistationina  $\beta$ -sintase; CSE, cistationina  $\gamma$ -liase; 3MST, 3-mercaptopiruvato sulfutransferase; CAT, cisteína aminotransferase; DAO, D-amino-oxidase. Fonte: Cao et al., 2019.

Após sua síntese, o  $H_2S$  pode ser imediatamente liberado para exercer seus efeitos biológicos através da interação com diferentes moléculas sinalizadoras, ou pode ser armazenado no meio intracelular, como ligações de enxofre sulfano (incluem polissulfetos, tiossulfato e enxofre elementar; o  $H_2S$  é liberado em condições redutoras) ou acido-lábil enxofre (incluem aglomerados ferro-enxofre e persulfetos; o  $H_2S$  é liberado em condições ácidas), e liberado mais tarde em resposta a um sinal fisiológico (Ogasawara et al., 1994; Ishigami et al., 2009; Leskova et al., 2017). Estudos mais recentes revelaram que espécies de enxofre

ligadas (polissulfetos e persulfetos) também podem ser produzidas pela 3MST e possuem vários papéis fisiológicos nas células de mamíferos, como proteção contra o estresse oxidativo e a ativação dos canais TRPA1, entre outros (Koike et al., 2017; Kimura, 2020).

Os mecanismos moleculares fisiológicos pelos quais o H<sub>2</sub>S exerce seus efeitos incluem: 1) interações com centros metálicos das proteínas, através da redução e/ou ligação direta do H<sub>2</sub>S às frações heme nas proteínas alvo, como citocromo c oxidase, hemoglobina, mioglobina e mieloperoxidase, resultando na formação de sulfheme (Pietri et al., 2011; Ríos-González et al., 2014; Pálinkás et al., 2015); 2) papel antioxidante, seja por eliminação direta de ROS ou de espécies reativas de nitrogênio (RNS) como peroxinitrito, peróxido de hidrogênio e superóxido, ou indiretamente através da estimulação da síntese de glutationa e ativação da expressão de proteínas antioxidantes conduzida pelo fator de transcrição Nrf2, como a tioredoxina (Bełtowski, 2019; Murphy et al., 2019); 3) persulfidação de proteínas (também chamado S-sulfidratação), pelo qual um grupo tiol (-SH) de uma cisteína reativa é modificado para um grupo persulfeto (-SSH), resultando em alterações conformacionais nas proteínas alvo para modificar sua atividade (Mustafa et al., 2009, 2011; Filipovic, 2015). A persulfidação mediada por H<sub>2</sub>S foi encontrada em várias proteínas celulares e enzimas, e representa o principal mecanismo de sinalização do H<sub>2</sub>S. Os exemplos de proteínas modificadas desta forma incluem canais de potássio sensíveis a ATP (KATP) e canais de potássio ativados por cálcio (K<sub>Ca</sub>; Mustafa et al., 2011), canais de potássio dependentes de voltagem Kv4.3 (Liu et al., 2014a), proteína 1 associada a ECH semelhante a Kelch (Keap1; Yang et al., 2013), subunidade p65 do fator nuclear-kB (NF-kB; Sen et al., 2012), gliceraldeído 3fosfato desidrogenase (GAPDH; Mustafa et al., 2009), subunidade  $\alpha$  da ATP sintase (Módis et al., 2016), NO sintase endotelial (eNOS; Mazza et al., 2013), proteína quinase G (PKG; Stubbert et al., 2014), MAPK/ERK quinase (MEK1; Zhao et al., 2014), lactato desidrogenase A (Untereiner et al., 2017) e canais catiônicos TRP (Liu et al., 2014c). Recentemente foi sugerido que persulfetos e polissulfetos são mais nucleofílicos do que H<sub>2</sub>S e seriam mais eficazes na persulfidação (Murphy et al., 2019).

O acúmulo de H<sub>2</sub>S seria tóxico para os órgãos, devido a seu efeito inibitório do Complexo mitocondrial IV (Nicholls et al., 2013); portanto, existem processos de oxidação rigidamente regulados para seu catabolismo. O mecanismo conhecido mais eficiente de oxidação de H<sub>2</sub>S em células de mamíferos ocorre nas mitocôndrias e requer a ação coordenada das enzimas sulfeto-quinona oxidoredutase (SQR), persulfeto dioxigenase (ETHE1), tiossulfato sulfuriltransferase (rodanase) e sulfito oxidase, e consiste em uma série de reações que catalisam sequencialmente a oxidação das espécies sulfeto (S<sup>2-</sup>/HS<sup>-</sup>) a tiossulfato e sulfato, envolvendo a participação da coenzima Q (Marutani, Ichinose, 2020), esta via também foi descrita nos fibroblastos da pele humana (Ziosi et al., 2017). O H<sub>2</sub>S também pode ser oxidado por meio de processos químicos, como a oxidação direta de H<sub>2</sub>S em tiossulfato na presença de O<sub>2</sub> e metais de transição (Chen; Morris, 1972). Em mamíferos, a eliminação das substâncias mencionadas ocorre principalmente pela urina, mas também pela exalação dos pulmões, fezes e flatos.

Considerando os extensos efeitos fisiológicos do H<sub>2</sub>S nos diferentes tecidos, vários compostos doadores de H<sub>2</sub>S estão sendo sintetizados especificamente para fornecer H<sub>2</sub>S terapêutico aos tecidos, para seu uso como ferramentas biológicas e como terapêutica potencial. Com base nos mecanismos e velocidade de liberação de H<sub>2</sub>S, os doadores de H<sub>2</sub>S mais comunmente usados podem ser divididos nos seguintes grupos: 1) substâncias inorgânicas ou sais de sulfeto, tais como hidrossulfeto de sódio (NaHS) e sulfeto de sódio (Na<sub>2</sub>S) que hidrolisam imediatamente após a dissolução em água, fornecendo acesso direto e instantâneo às formas biologicamente relevantes de sulfeto (H<sub>2</sub>S e HS<sup>-</sup>; dependendo do pH), e são assim chamados de "liberadores espontâneos", porém, existem desvantagens para estes doadores, sua meia-vida curta, liberação rápida e descontrolada e não possuem capacidade de direcionamento, essas deficiências levaram à busca de doadores de H<sub>2</sub>S mais controlados (Zheng et al., 2015; Szabo, Papapetropoulos, 2017; Powell et al., 2018); 2) doadores de liberação lenta, são compostos de natureza orgânica representados pelo composto GYY4137, os quais também podem liberar H<sub>2</sub>S após a hidrólise, e quando comparados com os sais de sulfeto fornecem  $H_2S$  de forma muito mais lenta e sustentada (Li et al., 2008; Lee et al., 2011); 3) doadores com perfis de liberação regulada, incluindo doadores dependentes de pH (por exemplo os compostos JK-1 e JK-2), doadores ativados por oxidantes, onde a liberação de H<sub>2</sub>S é desencadeada pelo estresse oxidativo (doadores a base de tiocarbamato), doadores direcionados às mitocôndrias que consiste em um cátion lipofílico trifenilfosfônio acoplado a uma porção doadora de H<sub>2</sub>S (por exemplo os compostos AP39 e AP123), entre outros (Szczesny et al., 2014; Gerő et al., 2016; Kang et al., 2016; Zhao, Pluth, 2016); 4) drogas híbridas (tais como os antiinflamatórios não esteroides - AINEs ou esteroides - AIEs liberadores de H<sub>2</sub>S) os quais apresentam grupos doadores de H<sub>2</sub>S (tais como o DTT - 1,2-ditiol-3-tiona, ADT - anetol ditioletiona ou TBZ - tiobenzamida) conjugados às moléculas dos antiinflamatórios tradicionais, contando-se os compostos ATB337 (S-Diclofenaco), ACS14 e ATB340 (S-Aspirina), ATB346 (S-naproxeno) e ATB352 (S-cetoprofeno), desenvolvidas com o fim de melhorar o perfil terapêutico (segurança e/ou eficácia) dos medicamentos utilizados clinicamente (Zhao et al., 2015; Zheng et al., 2015; Szabo, Papapetropoulos, 2017).

Os efeitos da administração de H<sub>2</sub>S exógeno foram examinados em numerosos estudos pré-clinicos, principalmente como anti-inflamatório (Zanardo et al., 2006; Ekundi-Valentim et al., 2010, 2013; Herrera et al., 2015), antinociceptivo (Distrutti et al., 2006a; Costa et al., 2020), antiagregante, anticoagulante e antitrombótico (Zagli et al., 2007; Kram et al., 2013; Grambow et al., 2014), anticancerígeno (Lee et al., 2011; Duan et al., 2015), imunomodulador (Cao et al., 2014; Yang et al., 2015), inibidor do estresse oxidativo (Yan et al., 2006; Yonezawa et al., 2007), na neuromodulação (Abe, Kimura, 1996), vasorregulação (Zhao et al., 2001; Laggner et al., 2007; Drapala et al., 2017), no tratamento da asma (Chen et al., 2009; Benetti et al., 2013; Campos et al., 2016; Mendes et al., 2019), dentre outros.

Alguns dos compostos doadores de  $H_2S$  foram testados em ensaios clínicos. Wallace et al. (2020) mostraram em um ensaio clínico de Fase 2B que o composto hibrido ATB-346, um anti-inflamatório não esteroide liberador de  $H_2S$  derivado do naproxeno, resultou em uma elevação significativa do  $H_2S$  plasmático e foi igualmente eficaz na inibição da atividade da cicloxigenase (COX), mas com menos danos gastrointestinais do que a droga parental naproxeno. Polhemus et al. (2015), em um ensaio clínico de Fase 1, mostram que uma mistura de várias moléculas ativas (SG1002) cujo principal constituinte é uma molécula  $\alpha$ -enxofre circular de oito membros, aumentou significativamente os níveis circulantes de  $H_2S$  e nitrito plasmático em indivíduos saudáveis e pacientes com insuficiência cardíaca, além de ser bem tolerado e seguro em todas as doses testadas. Um ensaio clínico de Fase 2 controlado por placebo está atualmente em fase de planejamento.

#### 1.3 Implicações do H<sub>2</sub>S na fisiopatologia da pele e doenças dermatológicas

Há uma quantidade crescente de literatura associando o H<sub>2</sub>S com diferentes condições e doenças de pele (para revisão, vide Coavoy-Sánchez et al., 2020).

Estudos prévios do nosso grupo demonstraram que o H<sub>2</sub>S desempenha um papel importante na resposta pruritogênica e inflamatória. Rodrigues et al. (2017) revelaram que a inibição da síntese endógena de H<sub>2</sub>S com β-ciano-L-alanina (um inibidor de CSE/CBS) resulta na potenciação significativa do comportamento de coçar induzido pelo composto 48/80 (degranulador de mastócitos) em camundongos, junto com o aumento do recrutamento de neutrófilos, medido pela atividade da mieloperoxidase. Além disso, descrevem importantes ações terapêuticas de doadores de H<sub>2</sub>S no prurido histaminérgico e não-histaminérgico em camundongos. Na via histaminérgica, o prurido induzido pela injeção intradérmica de histamina ou do composto 48/80 é reduzido pelo Na<sub>2</sub>S e o reagente de Lawesson, e este efeito é mediado em parte pela estabilização dos mastócitos (Rodrigues et al., 2017). Na via não-histaminérgica, o prurido secundário à ativação dos receptores PAR-2 é efetivamente reduzido pelo NaHS, atuando através da abertura dos canais K<sub>ATP</sub> e envolvendo a participação do NO endógeno de uma forma independente de GMPc (Coavoy-Sánchez et al., 2016).

Utilizando uma linhagem celular derivada de queratinócitos de pele humana (células HaCaT), Yang et al. (2011) demonstraram que a aplicação de NaHS resulta em redução significativa das lesões celulares e da resposta inflamatória induzidas pelo cloreto de cobalto (II) em um modelo de lesão celular induzida por hipoxia química, e este efeito do NaHS foi associado à diminuição da geração de ROS e redução da produção de IL-1β, IL-6 e IL-8. Além disso, o NaHS reduziu significativamente a superexpressão de COX-2, produção de protaglandina E2 (PGE2) e ativação de NF-κB.

Na psoríase, uma doença inflamatória crônica da pele, Alshorafa et al. (2012) revelaram que os níveis de H<sub>2</sub>S no soro de pacientes com psoríase progressiva crônica são mais baixos do que aqueles encontrados em indivíduos saudáveis, e estão negativamente correlacionados com a gravidade da psoríase. Ainda, o tratamento com NaHS em células HaCaT estimuladas com TNF- $\alpha$ , resultou na inibição significativa dos níveis de IL-6 e IL-8 de maneira dependente da dose, via supressão da ativação de p38, ERK e NF- $\kappa$ B. Em uma pesquisa anterior, Mirandola
et al. (2011) verificaram que, tanto nas lesões psoriáticas primárias quanto nos queratinócitos humanos, o H<sub>2</sub>S (NaHS) inibe a produção de IL-17 e IL-22 e diminui a secreção de IL-8 para atenuar a inflamação via inibição da fosforilação de ERK. Em consonância com esses estudos, nosso grupo observou em um modelo murino de psoríase (induzida pela aplicação tópica do imunomodulador imiquimod), que os níveis de H<sub>2</sub>S endógeno estão diminuídos em pele de camundongos com psoríase experimental (Rodrigues, 2018), e que tanto a administração sistêmica quanto tópica com o doador de H<sub>2</sub>S de liberação lenta GYY4137 teve efeitos benéficos controlando o prurido, reduzindo o recrutamento de neutrófilos para os locais da lesão e melhorando o índice de gravidade clínica da doença (Schmidt et al., 2015; Rodrigues, 2018).

Vários estudos reconhecem o H<sub>2</sub>S como uma molécula que acelera o processo de cicatrização de feridas cutâneas, promovendo a angiogênese e restaurando a estrutura anatômica e a função da pele lesada. Papapetropoulos et al. (2009) concluem que o H<sub>2</sub>S endógeno é um fator pró-cura, pois este processo se mostrou significativamente atrasado em camundongos CSE<sup>-/-</sup>. Nesse estudo, os camundongos tiveram 5% de sua área de superfície corporal total queimada por escaldamento e, ao longo do período de observação, as áreas da ferida em camundongos CSE<sup>+/+</sup> foram significativamente menores do que em camundongos CSE<sup>-/-</sup>. Além disso, a administração tópica de NaHS acelerou o processo de fechamento de feridas de pele de rato causadas por queimaduras. Empregando este mesmo modelo de queimadura de pele em ratos, um estudo anterior mostrou que a administração subcutânea do doador de H<sub>2</sub>S IK-1001, melhorou significativamente a re-epitelização da área lesada (Pyiochou et al., 2008). Estudos de Liu et al. (2014b) detectaram que a expressão de CSE se encontrava diminuída em úlceras de pé de pacientes portadores de diabetes e que camundongos diabéticos tipo 2 db/db tratados intraperitonealmente com os doadores H<sub>2</sub>S, NaHS e TBZ, mostraram melhora significativa na cicatrização de feridas por meio da restauração das funções das células progenitoras endoteliais e ativação da angiopoietina-1.

Outras pesquisas também demonstraram que o H<sub>2</sub>S está envolvido na regulação do câncer de pele. Trabalhando com amostras de melanoma humano, Panza et al. (2015) mostraram que em comparação com os melanócitos epidérmicos humanos normais, a expressão de CSE está aumentada em células de melanoma, os níveis mais altos de expressão estão em tumores primários, menores em lesões

metastáticas e quase silencioso em metástases não linfonodais. Os doadores de  $H_2S$  inibem a proliferação das células de melanoma promovendo apoptose, diminuindo a expressão das proteínas anti-apoptóticas, suprimindo a atividade de NF- $\kappa$ B e reduzindo a fosforilação de AKT e ERK (Panza et al., 2015; De Cicco et al., 2016, 2017).

## 1.4 Justificativa

Apesar do aumento no número de pacientes com DA nos últimos anos, a patogênese da doença ainda não foi totalmente elucidada. As drogas antiinflamatórias e imunossupressoras, como os corticosteroides, são eficazes para o tratamento da DA, no entanto, o uso prolongado dessas drogas esta associado a reações adversas, tais como atrofia cutânea, supressão do eixo hipotálamo-hipófiseadrenal, hipertensão, dislipidemia, hiperglicemia e imunossupressão (Coutinho, Chapman, 2011). Desta forma, é necessária a busca contínua de alternativas terapêuticas ou complementares que ofereçam mais eficácia e segurança. O H<sub>2</sub>S é um mediador gasoso com funções fisiológicas e fisiopatológicas em muitos órgãos, tem sido demonstrado que o H<sub>2</sub>S é produzido também na pele e participa na regulação da inflamação e prurido, na citoproteção, promoção de angiogênese, cicatrização de feridas, e outros (Coavoy-Sánchez et al., 2020). O H<sub>2</sub>S foi explorado na concepção de novos AINEs (AINEs liberadores de H<sub>2</sub>S). Um derivado liberador de H<sub>2</sub>S do naproxeno, ATB-346 mostrou ser tão eficaz quanto o fármaco original na redução da inflamação, enquanto produz significativamente menos efeitos adversos gastrointestinais (Wallace et al., 2010, 2020). Associações de doadores de H<sub>2</sub>S com corticosteroides também têm sido propostas, um estudo em células expostas ao estresse oxidativo, sugere que doadores de H<sub>2</sub>S podem potencializar o efeito antiinflamatório da dexametasona quando administrados concomitantemente (Sun et al., 2015). Tendo em consideração o potencial terapêutico deste tipo de associações, acreditamos que moléculas híbridas de corticosteroides com doadores de H<sub>2</sub>S como a dexametasona-TBZ e dexametasona-ADT, podem ser promissores agentes terapêuticos para o controle do prurido e reações inflamatórias cutâneas e sistêmicas características da DA, seja potencializando o efeito farmacológico desejado ou reduzindo a incidência de efeitos adversos. Por outro lado, dado o fato de que a DA esta associada com o estresse oxidativo e com alterações da função mitocondrial (Sivaranjani et al., 2013; Ahn, 2014; Feichtinger et al., 2014; Iyer et al., 2017), e dado o potencial terapêutico do  $H_2S$ , cremos que doadores de  $H_2S$  específicos para mitocôndria, como AP39 e RT01 podem servir para melhorar a função mitocondrial e exercer um efeito protetor na DA. A análise da participação das moléculas envolvidas na patogênese da DA e na decorrência do tratamento com os doadores de  $H_2S$  (híbridos e mitocondriais), é ponto fundamental para o aprofundamento do conhecimento sobre a farmacologia destes compostos.

## 1.5 Objetivos

- a) Avaliar comparativamente os efeitos da dexametasona em relação aos efeitos das moléculas híbridas doadoras de H<sub>2</sub>S, dexametasona-TBZ e dexametasona-ADT, e suas respectivas porções liberadoras, 4-hidroxi-tiobenzamida (TBZ) e anetol ditioletiona (ADT-OH) no modelo de DA induzida pela administração epicutânea do hapteno 2,4-dinitroclorobenzeno (DNCB) em camundongos, bem como investigar alguns dos mecanismos farmacológicos envolvidos e possíveis efeitos adversos.
- b) Investigar o efeito da administração dos doadores de H<sub>2</sub>S de ação mitocondrial, AP39 e RT01 no desenvolvimento e sinais clínicos da DA induzida pela administração epicutânea de DNCB em camundongos, bem como investigar alguns dos possíveis mecanismos farmacológicos envolvidos.

#### Estratégias

- Padronizar o modelo experimental da DA induzida por DNCB em camundongos.

- Comparar os efeitos da dexametasona com os derivados liberadores de H<sub>2</sub>S (doadores híbridos), dexametasona-TBZ e dexametasona-ADT, e suas respectivas porções liberadoras, TBZ e ADT-OH sobre o prurido, lesões da pele, edema de orelha, eosinofilia e esplenomegalia induzidos por DNCB em camundongos.

 Avaliar os efeitos dos doadores de H<sub>2</sub>S de ação mitocondrial, AP39 e RT01 sobre o prurido, lesões da pele, edema de orelha, eosinofilia e esplenomegalia induzidos por DNCB em camundongos.

- Analisar as concentrações circulantes de IgE total, como também as concentrações na pele das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, e da quimiocina eotaxina-1

(CCL11), e os efeitos do tratamento com os doadores de  $H_2S$  sobre estes mediadores.

- Investigar os efeitos da doença sobre a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase, glutationa (G) reductase (GR), peroxidase (GPx) e S-transferase (GST) e na expressão de marcadores de estresse oxidativo (resíduos proteicos de nitrotirosina, proteínas carboniladas) na pele e os efeitos dos doadores de H<sub>2</sub>S sobre estes parâmetros.

 Analisar a produção endógena de H<sub>2</sub>S, assim como a expressão proteica das enzimas CSE, CBS e 3MST na pele de camundongos.

 Quantificar os níveis de glicose e os parâmetros bioquímicos hepáticos em plasma de camundongos e os efeitos dos doadores de H<sub>2</sub>S (híbridos e suas respectivas porções liberadoras) sobre estes.

# 2 MATERIAL E MÉTODOS

#### 2.1 Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos BALB/c fêmeas de 7-10 semanas de vida, provenientes do Biotério do Departamento de Farmacologia - Unidade II do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (Protocolo nº 129/2016).

#### 2.2 Drogas

As seguintes drogas foram utilizadas: 2,4-dinitroclorobenzeno (DNCB) e dexametasona (Dexa) foram obtidos da Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO, USA); dexametasona-TBZ (Dexa-TBZ; doador híbrido), dexametasona-ADT (Dexa-ADT; doador híbrido), 4-hidroxi-tiobenzamida (TBZ; doador de liberação lenta) e anetol ditioletiona (ADT-OH, 5-(4-hydroxyphenyl)-3*H*-1,2-dithiole-3-thione; doador de liberação lenta) foram gentilmente doados pelo Prof. Giuseppe Caliendo (Università degli Studi di Napoli "Federico II", Nápoles, Itália); AP39 ([10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl] triphenyl phosphonium bromide; doador mitocondrial) e RT01 (análogo de AP39 desprovido de um átomo de enxofre; doador mitocondrial) foram gentilmente doadas pelo Prof. Matt Whiteman (University of Exeter, UK).

Todas as drogas foram dissolvidas em acetona/azeite de oliva (3:1).

Na Figura 3, estão ilustradas as estruturas químicas dos doadores de H<sub>2</sub>S utilizados no presente trabalho.



**Figura 3** - Estruturas químicas de doadores de H<sub>2</sub>S utilizados no presente trabalho. 4-hidroxitiobenzamida (TBZ) e anetol ditioletiona (ADT-OH) são doadores de liberação lenta, dexametasona-TBZ e dexamentasona-ADT são doadores híbridos, AP39 e RT01 são doadores específicos para mitocôndria.

Fonte: Próprio autor.

#### 2.3 Modelo experimental de dermatite atópica e aplicação do tratamento

A indução da DA experimental por DNCB, em camundongos foi realizada de acordo com o método proposto por Chan et al. (2013), com algumas modificações.

Os animais foram depilados na região dorsal do pescoço com ajuda de um barbeador elétrico. Após 24 horas, a sensibilização foi induzida pela aplicação epicutânea de 200 µl de DNCB a 0,5% em acetona/azeite de oliva (3:1) na área depilada nos primeiros 3 dias. Nos dias 15, 17, 19 e 22 os animais foram desafiados com 200 µl de DNCB a 0,2% sobre a pele do dorso e com 20 µl aplicados sobre a orelha direita. Nos dias 19 a 23 após a sensibilização, os animais foram tratados

topicamente uma vez por dia com compostos doadores de  $H_2S$  ou dexametasona. Para cada tipo de doador de  $H_2S$  os animais foram divididos nos seguintes grupos:

Grupo	Fármaco/Droga	Dose do tratamento
Veículo	Tratado com o veículo	200 µl/animal
DNCB	Sensibilizados e desafiados com DNCB e tratado com veículo	200 µl/animal
DNCB + Dexa	Sensibilizados e desafiados com DNCB e tratados com Dexa	62,5, 125, 250 ou 500 nmol/animal
DNCB + Dexa-TBZ	Sensibilizados e desafiados com DNCB e tratados com Dexa-TBZ	62,5, 125, 250 ou 500 nmol/animal
DNCB + TBZ	Sensibilizados e desafiados com DNCB e tratados com TBZ	1 µmol/animal

Tabela 1 – Tratamento por via de administração tópica de Dexa, Dexa-TBZ e TBZ

Tabela 2 – Tratamento por via de administração tópica de Dexa-ADT e ADT-OH

Grupo	Fármaco/Droga	Dose do tratamento
Veículo	Tratado com o veículo	200 µl/animal
DNCB	Sensibilizados e desafiados com DNCB e tratado com veículo	200 µl/animal
DNCB + Dexa-ADT	Sensibilizados e desafiados com DNCB e tratados com Dexa-ADT	250 nmol/animal
DNCB + ADT-OH	Sensibilizados e desafiados com DNCB e tratados com ADT-OH	1 µmol/animal

Tabela 3 –	Tratamento po	r via de	administração	tópica de	AP39 e RT01
			2		

Grupo	Fármaco/Droga	Dose do tratamento
Veículo	Tratado com o veículo	200 µl/animal
DNCB	Sensibilizados e desafiados com DNCB e tratado com veículo	200 µl/animal
DNCB + AP39	Sensibilizados e desafiados com DNCB e tratados com AP39	0,1 ou 0,2 nmol/animal
DNCB + RT01	Sensibilizados e desafiados com DNCB e tratados com RT01	0,2 nmol/animal

O protocolo experimental utilizado no presente estudo está representado esquematicamente na Figura 4. No dia 24, os animais foram anestesiados (isoflurano 3% em  $O_2$ ; v/v) e amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca. Imediatamente após, os animais foram submetidos à eutanásia e amostras de pele dorsal, orelhas e baço foram coletadas para posteriores análises.



**Figura 4 -** Diagrama esquemático do protocolo experimental. Camundongos BALB/c fêmeas foram depilados e sensibilizados epicutâneamente com 200  $\mu$ I de DNCB a 0,5% nos dias 1-3. Duas semanas depois, a dermatite foi induzida com 200  $\mu$ I de DNCB a 0,2% nos intervalos mostrados na figura. O tratamento (veículo, doadores de H<sub>2</sub>S ou dexametasona) foi aplicado topicamente durante 5 dias seguidos, a partir do dia 19. Os animais foram mortos 24 dias após a sensibilização.

Fonte: Próprio autor.

## 2.4 Avaliação dos parâmetros pruriceptivos e inflamatórios

#### 2.4.1 Análise do prurido em camundongos com modelo de DA

A avaliação do prurido foi feita imediatamente antes da aplicação de cada dose de DNCB (na fase de desafio) e antes da eutanásia (i.e., dia 24). Os animais foram colocados em caixas de acrílico em uma sala isenta de barulho e adaptada para uso de câmera de vídeo e foram filmados durante 30 min. A reprodução do vídeo serviu para avaliar o prurido por parte de pesquisadores treinados. A medida do prurido foi determinada pela contagem do número de acessos de coceira, sendo um acesso de coceira o evento isolado de três ou mais movimentos rápidos de toque com as patas traseiras dirigidas às proximidades das regiões tratadas.

#### 2.4.2 Avaliação macroscópica da gravidade das lesões

A gravidade da dermatite foi avaliada de acordo com o método descrito por Matsuda et al. (1997). As lesões da pele dorsal e orelhas foram avaliadas antes da aplicação de cada desafio e antes da eutanásia. A presença de cada um dos seguintes sinais: eritema/hemorragia, edema, escoriação/erosão e descamação/secura foi pontuada como 0 (ausente), 1 (ligeiro), 2 (moderado) e 3 (grave). O escore da gravidade da dermatite foi definido como a soma das pontuações individuais.

# 2.4.3 Avaliação do edema de orelha

No modelo experimental de DA, a estimulação induzida por DNCB induz edema de orelha, que foi medido após eutanásia. Ambas as orelhas foram cortadas na base e suas massas foram mensuradas com a utilização de uma balança analítica, antes e depois de secar o tecido na estufa a 60°C durante 5 dias. O conteúdo de água (expresso em %) de cada orelha foi calculado com base na diferença de massa (em gramas) entre o tecido úmido e o tecido seco, dividindo com a massa do tecido úmido e multiplicando o resultado por 100. O edema de orelha foi expresso em percentual, utilizando como cálculo a subtração do conteúdo de água (em %) obtido da orelha direita (tratada) com o conteúdo de água (em %) obtido da orelha esquerda (controle).

#### 2.5 Análises de sangue

As amostras de sangue foram coletadas dos animais anestesiados (isoflurano 3% em  $O_2$ ; v/v), por punção cardíaca imediatamente antes da eutanásia, em tubos contendo heparina. Seguidamente, o plasma foi separado por centrifugação (1.000 *g*, 4°C, 10 min) e armazenado a -80°C para análises bioquímicas.

#### 2.5.1 Quantificação de leucócitos no sangue

O número de leucócitos totais foi determinado diluindo o sangue anticoagulado 1:40 com solução de Turk (cristal violeta 0,2% em solução aquosa de ácido acético 30%) e 10  $\mu$ l dessa solução foram dispostos em câmara de Neubauer para a realização da contagem total de células. A análise diferencial dos leucócitos foi realizada no esfregaço sanguíneo, as lâminas foram coradas com May-Grünwald-Giemsa e as células presentes foram diferenciadas de acordo com a morfologia em linfócitos, monócitos, eosinófilos, neutrófilos e basófilos. Os dados foram expressos como número de células (x 10<sup>3</sup>) por  $\mu$ l de sangue.

## 2.5.2 Análises bioquímicas

Os níveis plasmáticos de glicose, bilirrubina total e das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e gama glutamil transpeptidase (GGT) foram quantificados por métodos colorimétricos enzimáticos no espectrofotômetro SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, USA), usando kits comerciais Glicose Liquiform (Ref. 133), Bilirrubina (Ref. 31), AST/GOT Liquiform (Ref. 109), ALT/GPT Liquiform (Ref. 109) e Gama GT Liquiform (Ref. 105) respectivamente (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil).

## 2.6 Peso do baço e número de esplenócitos.

Após eutanásia dos animais o baço foi rapidamente removido, pesado e homogeneizado em 5 mL de tampão fosfato salino (PBS; pH 7,2). Para quantificação de esplenócitos, o homogenato foi diluído 1:20 com solução de Turk e 10 µl dessa solução foram dispostos em câmara de Neubauer para a realização da contagem total de células. Os resultados foram expressos em número de esplénocitos (x 10<sup>4</sup>) por ml.

# 2.7 Determinação das concentrações de citocinas e IgE

#### 2.7.1 Quantificação das concentrações de IgE total

A concentração da IgE total foi quantificada no plasma por meio do ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) em sanduíche, utilizando o kit comercial ELISA MAX<sup>™</sup> Deluxe Set (BioLegend, San Diego, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, uma placa de 96 poços foi revestida com anticorpo

monoclonal de captura específico para IgE, diluído em tampão de captura e incubada por um período de 18 horas a 4°C. A placa foi lavada com PBS contendo 0,05% de Tween-20 e subsequentemente bloqueada com diluente de ensaio durante 1 hora a 20°C. Após um novo ciclo de lavagens, as amostras (diluídas 1:5000) e o padrão de IgE foram adicionados aos poços apropriados e a placa foi incubada durante 18 horas a 4°C. Ao término deste período, após lavagens, a placa foi incubada com o anticorpo de detecção anti-IgE biotinilado, a 20°C por 1 hora. A seguir, a avidina-HRP foi adicionada à placa e incubada a 20°C por 30 min, com lavagens entre as adições. Finalmente, após uma lavagem minuciosa, a placa foi desenvolvida com o substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) no escuro, produzindo uma cor azul proporcional à concentração de IgE presente na amostra, e após 10 min de incubação a reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico (2 N) em cada poço. As densidades ópticas foram medidas em espectrofotômetro SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, USA) em comprimento de onda de 450 nm com correção para 570 nm. As concentrações de IgE das amostras foram calculadas a partir da curva padrão obtida.

## 2.7.2 Quantificação das concentrações de IL-4, IL-5, IL-13 e eotaxina-1

Os níveis de citocinas foram medidos em amostras de pele do dorso dos animais dos diferentes grupos, após eutanásia.

As amostras de pele dorsal foram homogeneizadas em proporção 1:10 em tampão Tris (50 mM, pH 7,4) contendo 1 mM de PMSF (fenil-metil-sulfonil-fluoridro) e 0,1% de mistura de inibidor de proteases (P8340, Sigma, St. Louis, MO, USA) a 4°C, utilizando um microtriturador (DREMEL® 300, Distrito Federal, DF, México). Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 *g* por 10 min a 4°C, e os sobrenadantes resultantes foram separados, seguidamente foi determinada a concentração de proteínas de cada sobrenadante pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

As concentrações das citocinas IL-4, IL-5, IL-13, e da quimiocina eotaxina-1 foram quantificadas em sobrenadantes dos homogenatos de pele (diluídas 1:10) por meio do ensaio de ELISA em sanduíche: IL-4 e IL-5 foram medidas usando kits comerciais ELISA MAX<sup>™</sup> Set (BioLegend, San Diego, CA, USA), IL-13 e eotaxina-1 (CCL11) foram medidas usando kits DuoSet ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), de acordo com as instruções do fabricante. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, USA) em comprimento de onda de 450 nm com correção para 570 nm. As concentrações de citocinas das amostras foram calculadas a partir das curvas padrão obtidas com as citocinas recombinantes.

#### 2.8 Determinação da atividade das enzimas antioxidantes

A atividade das enzimas antioxidantes foi determinada em amostras de pele do dorso dos animais dos diferentes grupos, após eutanásia.

Amostras de pele foram homogeneizadas na proporção de 1:10 em tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) contendo 100 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 4°C, utilizando um microtriturador (DREMEL® 300, Distrito Federal, DF, México), os homogenatos foram centrifugados a 10.000 *g* por 10 min a 4°C. Os sobrenadantes resultantes foram separados para determinação da atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase, glutationa peroxidase, glutationa redutase e glutationa S-transferase.

#### 2.8.1 Atividade das superóxido dismutase (SOD)

As superóxido dismutases (SOD) são enzimas que catalisam a dismutação do ânion radical superóxido ( $O_2^{-}$ ) em oxigênio ( $O_2$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), fornecendo uma importante defesa contra o dano oxidativo. A atividade da SOD foi determinada de acordo com o método descrito por Ukeda et al. (1997), baseado na formação do produto XTT-formazan. Trata-se de um método indireto que envolve a conversão de xantina e  $O_2$  em ácido úrico e  $H_2O_2$  pela xantina oxidase (XO) gerando  $O_2^{-}$ , este por sua vez, reduz o reagente XTT para o produto XTT-formazan, que absorve luz a 470 nm. As SOD eliminam  $O_2^{-}$  e diminuem a formação do produto XTT-formazan.



Todos os sobrenadantes das amostras foram diluídos na proporção de 1:10 em tampão carbonato (50 mM, pH 10,2) contendo 3 mM de EDTA. Alíquotas de 10 µl das amostras diluídas brutas ou inativadas (aquecidas em banho-maria a 100°C por 5 min) foram dispostas em placas de 96 poços, juntamente com 260 µl do tampão carbonato (50 mM, pH 10,2 contendo 3 mM de EDTA), 10 µl de xantina (3 mM) e 10 µl de XTT (0,75 mM) e a reação foi iniciada pela adição de 10 µl da enzima xantina oxidase (56,1 mU/ml) em cada poço. As densidades ópticas foram medidas em espectrofotômetro SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, USA) em comprimento de onda de 470 nm durante 20 min. O resultado foi expresso como USOD/mg de proteína. A unidade de SOD foi definida como a quantidade de SOD capaz de transformar 1 µmol de  $O_2^{-r}$  por min.

# 2.8.2 Atividade da catalase

A catalase é uma enzima que catalisa a decomposição do  $H_2O_2$  em água e  $O_2$ , neutralizando a ação tóxica do  $H_2O_2$ . A atividade da catalase foi determinada de acordo com o método de Fossati et al. (1980) que está baseado na medida do  $H_2O_2$  como substrato remanescente depois da ação da catalase. O método ocorre em duas etapas, na primeira reação a catalase presente na amostra dismuta o  $H_2O_2$  (de concentração conhecida) em água e  $O_2$ . Na segunda reação, o  $H_2O_2$  restante reage com a o-dianisidina (OD), reação catalizada pela enzima peroxidase (HRP), para produzir um produto que pode ser medido colorimetricamente a 460 nm. Portanto, a atividade da catalase presente na amostra é inversamente proporcional ao sinal obtido.



Todos os sobrenadantes das amostras foram diluídos na proporção de 1:5 em tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) contendo 100 mM de EDTA. A reação 1 foi iniciada incubando 15 µl de amostras diluídas brutas ou inativadas (incubadas a 60°C por 2 h) com 250 µl de  $H_2O_2$  (10 mM) a temperatura ambiente por 10 min, e foi interrompida pela adição de 250 µl de azida sódica (NaN<sub>3</sub>, 1mM). A curva padrão de  $H_2O_2$  foi construída incubando 15 µl de tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) com 250 µl de diferentes concentrações de  $H_2O_2$  (11 a 8820 µM), de forma análoga às amostras.

A reação 2 foi realizada em placas de 96 poços, 20 µl dos produtos obtidos na reação 1 (amostras ou curva padrão) foram dispostos nos poços apropriados e foram adicionados 200 µl de reagente contendo OD (158 µg/ml) e HRP (0,095 µg/ml) em tampão fosfato (50 mM, pH 6,0). A velocidade de formação do produto foi medida em cumprimento de onda de 460 nm durante 10 min. A atividade da catalase foi calculada usando a curva padrão de  $H_2O_2$ . O resultado foi expresso em UCatalase/mg de proteína. A unidade da catalase é definida como a quantidade de  $H_2O_2$  (µmol) degradada por min.

#### 2.8.3 Atividade da glutationa peroxidase (GPx)

A glutationa peroxidase (GPx) é uma família de enzimas com atividade peroxidase, e converte a glutationa reduzida (GSH) em glutationa oxidada (GSSG) para reduzir os hidroperóxidos lipídicos em seus alcoóis correspondentes, ou reduzir o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água. O método para determinação da atividade GPx é baseado na medida indireta da atividade da GPx, através de uma reação acoplada com a glutationa redutase (GR), de acordo com Paglia e Valentine (1967). No método, a GPx reduz o hidroperóxido de t-butil e oxida a GSH para a GSSG. A GSSG gerada é reduzida a GSH com consumo de NADPH pela GR. A diminuição de NADPH é diretamente proporcional à atividade da GPx, e é acompanhada pelo decréscimo da absorbância medida a 340 nm.



Todos os sobrenadantes das amostras foram diluídos na proporção de 1:10 em tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) contendo 100 mM de EDTA. Seguidamente, 30 µl das amostras diluídas foram incubados (a 37°C por 5 min) com 145 µl de tampão fosfato (50 mM, pH 7,0 contendo 100 mM de EDTA), 5 µl de GSH (0,8 M) e 5 µl de GR (9,6 U/ml), em microplaca de quartzo. Finalmente, foram adicionados 5 µl de hidroperóxido de terc-butil (0,46%) e 10 µl de NADPH (1,2 mM). O decréscimo dos valores de absorbância foi registrado a 340 nm durante 10 min a 37°C. Os resultados foram expressos como µmol de GSH/min/mg de proteína.

## 2.8.4 Atividade da glutationa reductase (GR)

A glutationa reductase (GR) é uma flavoproteína que catalisa a redução dependente de NADPH da GSSG para a GSH. A GR é essencial para o ciclo redox da glutationa, e mantém níveis adequados de GSH celular. A determinação da atividade da GR foi realizada de acordo com o método de Carlberg e Mannervik (1975), baseado na medida direta da atividade da GR, que utiliza o NADPH como co-fator na redução da GSSG para GSH. A oxidação de NADPH a NADP<sup>+</sup> é acompanhada pelo decréscimo da absorbância em comprimento de onda de 340 nm.



Todos os sobrenadantes das amostras foram diluídos na proporção de 1:5 em tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) contendo 100 mM de EDTA. Seguidamente, 10 µl de amostras diluídas ou tampão fosfato foram dispostos em microplaca de quartzo, juntamente com 190 µl de meio de reação (tampão fosfato 50 mM, pH 7,0 contendo 86 mM de EDTA, 2 mg/ml de GSSG e 0,4 mg/ml de NADPH). O decréscimo dos valores de absorbância foi registrado a 340 nm durante 30 min a 37°C. Os

resultados foram expressos como µmol NADPH/min/mg de proteína, onde uma unidade de GR é aquela capaz de oxidar 1 µmol de NADPH por min.

#### 2.8.5 Atividade da glutationa S-transferase (GST)

A glutationa S-transferase (GST) é uma família de enzimas que catalisam a conjugação de GSH a substratos xenobióticos com o propósito de desintoxicação. A atividade da GST foi determinada de acordo com o método descrito por Habig et al. (1974), baseado na formação de um complexo entre a GSH e o 2,4-dinitroclorobenzeno (DNCB), reação catalisada pela GST. A formação do complexo é acompanhada por um aumento da absorbância, medida em comprimento de onda de 340 nm. A taxa de aumento é diretamente proporcional à atividade da GST na amostra.



Todos os sobrenadantes das amostras foram diluídos na proporção de 1:5 em tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) contendo 100 mM de EDTA. Alíquotas de 10  $\mu$ I das amostras diluídas ou tampão fosfato foram dispostos em microplaca de quartzo, juntamente com 180  $\mu$ I do tampão fosfato (50 mM, pH 7,0 contendo 100 mM de EDTA) e 5  $\mu$ I de DNCB (100 mM) e foram incubadas a temperatura ambiente por 10 min. Finalmente, foram adicionados 5  $\mu$ I de GSH (100 mM). A mudança de absorbância foi monitorada num comprimento de onda de 340 nm por 15 min a 25°C. Os resultados foram expressos como  $\mu$ mol de GSH/min/mg de proteína.

# 2.9 Analise dos marcadores de estresse oxidativo

A análise dos marcadores de estresse oxidativo foi realizada em amostras de pele do dorso dos animais dos diferentes grupos, após eutanásia.

As amostras de pele foram preparadas como descrito no item 2.7.2. Posteriormente, a concentração de cada sobrenadante foi acertada para 12,5 µg/ml em tampão de homogeneização.

A expressão de resíduos proteicos de nitrotirosina foi determinada aplicando 200 µl de sobrenadantes de amostras (2,5 µg de proteína total) em uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) disposta no sistema Slot Blot (Bio-Dot SF, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) e transferindo as proteínas à membrana utilizando vácuo. A eficácia da transferência e a qualidade de carga das proteínas foram comprovadas pela coloração reversível das membranas com o corante Ponceau S a 0,1% em ácido acético a 5%. Após bloqueio de sítios inespecíficos por 2 horas com tampão TBS-T (Tris 20 mM, NaCl 137 mM, Tween-20 0,2%; pH 7,4) contendo 0,2% de caseína, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário Anti-nitrotirosina (monoclonal de camundongo, 05-233, Millipore, Germany) na diluição 1:2000 em TBS-T contendo 3% de BSA, durante toda a noite, a 18°C e sob agitação contínua. As membranas foram lavadas com TBS-T sob agitação (6 vezes durante 10 min cada uma) e logo após, incubadas, durante 2 horas a temperatura ambiente, com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase cabra anti-camundongo (GAM)-HRP (1721011, Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA), diluído 1:4000 em TBS-T. Depois de um novo ciclo de lavagens com TBS-T (6x por 10 min) as bandas imunorreativas foram detectadas por quimiluminescência usando solução de revelação ECL e fotodocumentadas com o sistema de imagens ChemiDocTM MP (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA). A quantificação densitométrica destas bandas foi realizada utilizado o software ImageLabTM (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) e foram expressas como densitometría (%) de nitrotirosina após normalização com níveis obtidos pela coloração com Ponceau S (Tsuhako et al., 2010).

#### 2.9.2 Determinação do conteúdo de proteínas carboniladas por SLOT BLOT

As amostras de pele foram preparadas como descrito no item 2.7.2. Depois, a concentração de cada sobrenadante foi acertada para 12,5 µg/ml em tampão de homogeneização.

O conteúdo de proteínas carboniladas foi analisado empregando uma membrana de PVDF (difluoreto de polivinilideno; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) previamente ativada com 100% de MeOH durante 1 min, e em seguida, com solução TBS (Tris-base 20 mM, NaCl 500 mM; pH 7,4) contendo 20% de metanol por 5 min. Foram aplicados 200 µl de sobrenadantes de amostras (2,5 µg de proteína total) na membrana, através do sistema Slot Blot (Bio-Dot SF, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) e as proteínas foram transferidas utilizando vácuo. Seguidamente, a membrana foi retirada do sistema e lavada sequencialmente em 100% de metanol por 1 min, em TBS contendo 20% de metanol por 5 min e em HCI 2N durante 5 min, sob agitação continua, e incubada com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH; 0,1 mg/ml) em HCI 2N por exatamente 5 min. A continuação, as membranas foram lavadas de modo sequencial com HCI 2N e com 100% de metanol (3 vezes por 5 min cada uma). Posteriormente, as membranas foram tratadas conforme técnica descrita no item 2.9.1., empregando o anticorpo primário Anti-DNP (monoclonal de camundongo, LS-C64883, LSBio, WA, USA) na diluição 1:25.000 e o anticorpo secundário conjugado com peroxidase cabra anti-camundongo (GAM)-HRP (1721011, Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA). Os resultados foram expressos como densitometría (%) de proteínas carboniladas após normalização com níveis obtidos pela coloração com Ponceau S (Robinson et al., 1999).

# 2.10 Quantificação da produção de H<sub>2</sub>S (método do sulfeto de chumbo)

A capacidade de produção de H<sub>2</sub>S foi avaliada em amostras de pele do dorso de camundongos dos diferentes grupos, após eutanásia.

As amostras de pele foram homogeneizadas na proporção de 1:10 em tampão fosfato (100 mM, pH 7,4) contendo 1 mM de PMSF e 0,1% de mistura de inibidor de proteases (P8340, Sigma, St. Louis, MO, USA) a 4°C, utilizando um microtriturador (DREMEL® 300, Distrito Federal, DF, México). Após centrifugação a 10.000 *g* por 10 min a 4°C, os sobrenadantes resultantes foram separados, e foi determinada a concentração de proteínas de cada sobrenadante pelo método de Bradford (Bradford, 1976). A seguir, 200 µl das amostras, contendo 200 µg de proteínas, foram dispostas em placas de 96 poços, juntamente com 12,5 µl do substrato L-cisteína (10 mM) e 12,5 µl do co-fator piridoxal-5'-fosfato (2 mM). Em seguida, foi disposto sobre a placa o papel filtro impregnado com acetato de chumbo, e a placa

foi incubada por 180 min a 37°C. A medida da geração de H<sub>2</sub>S foi realizada através da formação de sulfeto de chumbo em papel filtro (Hine et al., 2015). Esta reação resulta da interação do H<sub>2</sub>S produzido pelas amostras com o acetato de chumbo contido no papel, resultando no precipitado de sulfeto de chumbo (PbS; cor preta), que permite sua quantificação por análise densitométrica.

Os dados foram expressos como quantidade de H<sub>2</sub>S gerado por período ou concentração de proteína, baseados em uma curva padrão construída a partir de concentrações conhecidas de NaHS dispostas na mesma placa das amostras.

# 2.11 Detecção da expressão proteica por Western Blot

As análises de Western Blot foram realizadas a partir de homogenatos de pele do dorso dos camundongos dos diferentes grupos, para detectar a expressão das enzimas CSE, CBS e 3MST.

As amostras de pele foram homogeneizadas e preparadas como descrito no item 2.7.2. Ato seguido, alíquotas dos sobrenadantes foram diluídas em tampão Tris (50 mM; pH 6,8) e adicionadas de tampão de Laemmli (62,5 mM de Tris-HCl, pH 6,8 contendo 2% de SDS, 0,001% de azul de bromofenol, 10% de glicerol e 5% de  $\beta$ mercaptoetanol). Após aquecimento das amostras em banho-maria a 100°C por 5 min, volumes equivalentes a 10 µg de proteínas totais foram aplicados na cuba de eletroforese e submetidos à separação das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12,5%, usando-se um tampão para eletroforese (Tris 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM e SDS 0,1%) e uma corrente constante de 100V (PowerPacTM HC, Bio-Rad Laboratories, Inc., Singapur) por 2 horas (Laemmli, 1970). Após o término da eletroforese, as bandas proteicas foram transferidas eletroforeticamente (400 mA; 90 min) para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) utilizando um sistema molhado (o tampão para transferência consistia em solução de Tris 25 mM, contendo 192 mM de glicina, 0,1% de SDS e 18% de etanol absoluto). A eficácia da transferência e a qualidade de carga das proteínas foram comprovadas pela coloração reversível das membranas com o corante Ponceau S a 0,1% em ácido acético a 5%.

A seguir, os sítios de ligação inespecíficos das membranas foram bloqueados por incubação das membranas por 1 hora a temperatura ambiente com tampão TBS-T contendo 3% de albumina de soro bovino (BSA). Em seguida, as membranas foram incubadas durante toda a noite, a 18°C e sob agitação, com os anticorpos primários Anti-CSE (CTH antibody, policional de coelho, 12217-1-AP, Proteintech Group, IL, USA) na diluição 1:1000 em TBS-T contendo 1% de BSA, Anti-CBS (monoclonal de camundongo, H00000875-M01, Abnova Co., Taiwan) na diluição 1:1500 em TBS-T contendo 1% de BSA, ou Anti-3MST (policional de coelho, CAU24033, Biomatik Co., Canadá) na diluição 1:1000 em TBS-T contendo 1% de BSA. Após lavagens das membranas com TBS-T sob agitação (6 vezes durante 10 min cada uma), as membranas foram incubadas, durante 2 horas a temperatura ambiente, com diluições 1:3000 em TBS-T dos anticorpos secundários conjugados com peroxidase: cabra anti-coelho (GAR)-HRP (1705046, Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) para CSE e 3MST ou cabra anti-camundongo (GAM)-HRP (1721011, Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) para CBS, respectivamente. Depois de um novo ciclo de lavagens com TBS-T (6x por 10 min) as bandas imunorreativas foram detectadas por quimiluminescência usando solução de revelação ECL e fotodocumentadas com o sistema de imagens ChemiDocTM MP (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA). O peso molecular das bandas foi determinado pelo software ImageLabTM (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) por comparação das mobilidades eletroforéticas com padrões de peso molecular conhecidos. As bandas detectadas foram submetidas à análise densitométrica e expressas como densitometría (U.A) de CSE, CBS e 3MST após normalização com níveis de GAPDH.

#### 2.12 Analise dos resultados

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Os dados apresentados sob a forma de curva temporal foram sujeitos à análise de variância de duas vias (two way-ANOVA), seguido do teste de Bonferroni. As diferenças entre grupos experimentais foram sujeitas à análise de variância de uma via (one way-ANOVA), seguido pelo teste de Tukey para múltiplas comparações entre os grupos, utilizando o programa GraphPad Prism v.5.01. Valores de P menores de 0,05 (P<0,05) foram considerados estatisticamente significativos.

# 3 RESULTADOS

# 3.1 Dermatite atópica experimental induzida pela aplicação repetida de DNCB

# 3.1.1 Parâmetros pruriceptivos e inflamatórios

A aplicação repetida de 200 µl de DNCB a 0,2% na pele dorsal de camundongos previamente sensibilizados com DNCB a 0,5%, promoveu aumento significativo e, de forma tempo-dependente, dos sinais clínicos característicos da DA, tais como prurido (Figura 5 A) e lesões na pele: eritema/hemorragia, edema, escoriação/erosão e descamação/secura (escore da gravidade de lesões da DA; Figura 5 B) a partir do dia 19, assim como, aumento significativo do edema de orelha (Figura 5 C), em relação ao grupo que recebeu o veículo. Enquanto que a aplicação repetida de 200 µl de DNCB a 0,1% promoveu aumento significativo do escore da gravidade da DA a partir do dia 22 (Figura 5 B), no entanto nenhuma diferença significativa foi observada na análise do prurido (Figura 5 A) e na medida do edema de orelha (Figura 5 C) em relação ao grupo que recebeu o veículo.



**Figura 5 -** Efeito da aplicação repetida de DNCB no dorso de camundongos. (A) Análise do prurido. (B) Avaliação macroscópica da gravidade das lesões. (C) Edema de orelha. Os dados foram expressos como média ± EPM. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs. Veículo; ###P<0.001 vs. DNCB 0,1% (n = 4-5).

#### 3.1.2 Quantificação das concentrações de IgE

A hiperprodução de IgE é uma característica importante da DA e os indivíduos com DA apresentam frequentemente níveis elevados de anticorpos IgE totais e específicos para alérgeno no sangue (Liu et al., 2011).

Conforme ilustrado na Figura 6, os níveis de IgE total foram elevados drasticamente nos grupos sensibilizados e desafiados com DNCB, este aumento foi aproximadamente 10 vezes maior no grupo desafiado com DNCB a 0,2% e 7 vezes maior no grupo desafiado com DNCB a 0,1%, em comparação com o grupo que recebeu veículo (P<0,001). Por sua vez, o grupo desafiado com DNCB a 0,2% exibiu níveis de IgE total significativamente maiores em comparação com o grupo desafiado com DNCB a 0,1% (P<0,001).



**Figura 6 -** Concentração de IgE total em plasma. A concentração de IgE total foi determinada por ELISA. Os dados são expressos como média ± EPM. \*\*\*P<0.001 vs. Veículo; ###P<0.001 vs. DNCB 0,1% (n = 4-5).

## 3.1.3 Quantificação da produção endógena de H<sub>2</sub>S (método do sulfeto de chumbo)

A indução da dermatite atópica experimental pela aplicação repetida de DNCB na pele do dorso dos camundongos desafiados com a concentração de 0,2%, resultou em diminuição significativa da capacidade de produção de H<sub>2</sub>S (P<0,01), quando comparado ao grupo veículo e quanto ao grupo desafiado com DNCB a 0,1% (Figura 7), este último, por sua vez, não revelou qualquer alteração na capacidade de produção de H<sub>2</sub>S.



**Figura 7** - Quantificação da produção de  $H_2S$ . Efeito da aplicação repetida de DNCB sobre a produção endógena de  $H_2S$  na pele do dorso de camundongos. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. \*P<0.05 vs. Veículo; #P<0.05 vs. DNCB 0,1% (n = 4-5).

# 3.1.4 Análise da expressão proteica das enzimas geradoras de H<sub>2</sub>S por Western blot

Na avaliação da expressão proteica das enzimas geradoras de H<sub>2</sub>S, CSE e 3MST na pele do dorso de camundongos com dermatite atópica experimental detectaram-se bandas imunorreativas com pesos moleculares aproximados de 43 kDa, compatíveis com o valor correspondente a enzima CSE informado na ficha técnica do anticorpo (Figura 8 A) e, por outro lado, bandas de 28 kDa correspondentes ao peso molecular da enzima 3MST (Figura 8 B). Na análise da enzima CBS não foram detectadas as bandas imunorreativas correspondentes ao peso molecular da enzima 3MST (Figura 8 B).

A indução da DA experimental pelo DNCB resultou em uma diminuição da expressão da enzima 3MST na pele do dorso dos camundongos desafiados com a concentração de 0,2%, quando comparado ao grupo que recebeu veículo (Figura 8 B). Entretanto, no que concerne à enzima CSE, a aplicação de DNCB não teve efeito significativo na expressão desta enzima (Figura 8 A).



**Figura 8** - Expressão proteica das enzimas geradoras de  $H_2S$  por Western blot. (A) Efeito da aplicação repetida de DNCB sobre a expressão proteica da enzima CSE na pele do dorso de camundongos. (B) Efeito da aplicação repetida de DNCB sobre a expressão proteica da enzima 3MST na pele do dorso de camundongos. Os dados são expressos como média ± EPM. \*P<0.05 vs. Veículo (n = 4). RU *random units* (unidades aleatórias).

A partir dos dados da indução da DA experimental, para prosseguir com o estudo de aplicação do tratamento, foi selecionada a concentração de 0,2% de DNCB na fase de desafio, devido à sua capacidade de induzir uma resposta significativa em todos os parâmetros avaliados (Figuras 5, 6 e 7), e foi estabelecido o tempo de 24 dias para a finalização do experimento, demonstrando ser o período ideal para análise de parâmetros pruriceptivos e inflamatórios (Figuras 5 A e B), visto que mostra uma resposta submáxima, e assim pode ser tanto inibida como potencializada por outros agentes a serem testados. Ainda, foi determinado o dia 19 como inicio para a aplicação do tratamento, uma vez que, a partir desse dia, a aplicação repetida de DNCB a 0,2% mostrou um aumento significativo do prurido (Figura 5 A) e do escore da gravidade de lesões na pele dos camundongos (Figura 5 B).

# 3.2.1 Efeitos comparativos da dexametasona, dexametasona-TBZ e TBZ no prurido em camundongos com DA experimental

O tratamento tópico dos animais com DA experimental com dexametasona (Dexa; 62,5, 125, 250 ou 500 nmol/animal) por 5 dias consecutivos (a partir do dia 19 até o dia 23), foi capaz de reduzir significativamente o prurido induzido pela aplicação repetida de DNCB na pele de camundongos, com porcentagens de redução de 64,8%, 69,9%, 75,5% e 41,6% respectivamente (P<0,01-P<0,001). De forma semelhante, o tratamento com doses equimolares de dexametasona-TBZ (Dexa-TBZ) resultou na redução significativa do prurido, com valores de 74,8%, 77,3%, 88,8% e 50,6% respectivamente (P<0,001), quando comparados ao grupo DNCB tratado com veículo, avaliados no dia 24 (Figura 9 A-D). Por outro lado, a administração da porção liberadora de H<sub>2</sub>S, o doador TBZ (1  $\mu$ mol/animal) em animais com DA experimental, não teve efeito sobre o prurido, sendo esta resposta semelhante ao grupo DNCB (Figura 9 E).



**Figura 9 -** Efeitos comparativos do tratamento tópico com dexametasona, dexametasona-TBZ ou TBZ no prurido induzido por DNCB em camundongos. (A) 62,5 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5-7); (B) 125 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5-7); (C) 250 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5-7); (D) 500 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5-7); (D) 500 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5-7); (D) 500 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 6); (E) 1  $\mu$ mol/animal de TBZ (n = 5-7). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs. Veículo + Veículo; <sup>#</sup>P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.01 vs. Veículo + Veículo; \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.01, \*\*\*

# 3.2.2 Efeitos comparativos da dexametasona, dexametasona-TBZ e TBZ no escore de lesões cutâneas em camundongos com DA experimental

Nos grupos de animais com DA experimental tratados com Dexa ou Dexa-TBZ, com as doses de 62,5, 125, 250 ou 500 nmol/animal, os escores de lesão cutânea foram significativamente menores (com exceção da dose 500 nmol/animal), com valores de 60,1%, 30,9% e 18,4% respectivamente para Dexa (P<0,05-P<0,001), e de 56,4%, 37,6%, 27,9% e 28,5%, respectivamente para Dexa-TBZ (P<0,001) em comparação com o grupo DNCB tratado com veículo (Figura 10 A-D), no dia 24. No tratamento com a dose 500 nmol/animal, a Dexa-TBZ mostrou ser significativamente mais eficaz do que a Dexa, com redução de 28,5% vs. 10,2% (P<0,05; Figura 10 D). Por sua vez, a administração do doador TBZ (1 µmol/animal) não revelou alteração no escore de gravidade das lesões induzida por DNCB (Figura 10 E).



**Figura 10** - Efeitos comparativos do tratamento tópico com dexametasona, dexametasona-TBZ ou TBZ nas lesões da pele induzidas por DNCB em camundongos. (A) 62,5 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5-7); (B) 125 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5-7); (C) 250 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5-7); (D) 500 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5-7); (D) 500 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5-7); (D) 500 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 6); (E) 1  $\mu$ mol/animal de TBZ (n = 5-7). Os dados são expressos como média ± EPM. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs. Veículo + Veículo; \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs. DNCB + Veículo; \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs. DNCB + Dexa.

# 3.2.3 Efeitos comparativos da dexametasona, dexametasona-TBZ e TBZ no edema de orelha induzido em camundongos com DA experimental

O edema de orelha constatado nos animais que receberam DNCB foi significativamente reduzido pelo tratamento tópico com 62,5, 125, 250 ou 500 nmol/animal de Dexa com valores de 96,5%, 63,5%, 86,7% e 100%, respectivamente (P<0,05-P<0,001), estes resultados foram semelhantes com relação aos grupos que receberam doses equivalentes de Dexa-TBZ, que exibiram porcentagens de redução de 74,2%, 77,5%, 98,8% e 66,4%, respectivamente (P<0,05-P<0,001) em relação ao grupo DNCB (Figura 11 A-D). Quando testado o doador TBZ (1 µmol/animal) não afetou significativamente o edema de orelha induzido por DNCB (Figura 11 E).



**Figura 11** - Efeitos comparativos do tratamento tópico com dexametasona, dexametasona-TBZ ou TBZ no edema de orelha induzido por DNCB em camundongos. (A) 62,5 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5-7); (B) 125 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5-7); (C) 250 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5-7); (D) 500 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5); (D) 500 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona ou dexametasona ou dexametasona ou dexametasona ou dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5); (D) 500 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 6); (E) 1  $\mu$ mol/animal de TBZ (n = 5-7). Os dados são expressos como média ± EPM. \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs. Veículo + Veículo; \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs. DNCB + Veículo.

# 3.2.4 Efeitos comparativos da dexametasona, dexametasona-TBZ e TBZ no número total e diferencial de leucócitos no sangue

Os eosinófilos desempenham um papel importante na DA, a eosinofilia esta presente na maioria dos indivíduos com DA e esta correlacionada com a atividade da doença (Liu et al., 2011), por isso foi medido o número total e diferencial de leucócitos no sangue de camundongos com DA experimental.

Conforme apresentado na Figura 12, a aplicação de DNCB aumentou de modo significativo a quantidade de eosinófilos no sangue de camundongos em aproximadamente 3-4 vezes em comparação com o grupo que recebeu veículo, a quantidade de leucócitos totais, linfócitos e neutrófilos também foi ligeiramente aumentada no grupo DNCB, embora esta diferença não seja significativa em todos os experimentos. O tratamento tópico tanto com Dexa quanto com Dexa-TBZ às doses de 62,5, 125, 250 ou 500 nmol/animal, diminuiu significativamente os números de eosinófilos induzidos por DNCB, com valores abaixo dos observados nos animais sem DA; os números de leucócitos totais e linfócitos também foram diminuídos significativamente em todos os grupos tratados com Dexa ou Dexa-TBZ e o número de neutrófilos foi diminuído no tratamento com 500 nmol/animal de Dexa ou Dexa-TBZ, quando comparado ao grupo DNCB (Figuras 12 A-D). Além disso, o tratamento tópico com TBZ (1 µmol/animal) diminuiu em 54,5% a eosinofilia induzida por DNCB (P<0,05; Figura 12 E).

Células (x 10 <sup>3</sup> /µl)	Veiculo	DNCB	Dexa 62.5 nmol/animal	Dexa-TBZ 62.5 nmol/animal
Leucócitos totais	5,44 ± 0,58	$7,03 \pm 0,59$	3,20 ± 0,68 ###	3,09 ± 0,75 ###
Linfócitos	3,83 ± 0,39	4,21 ± 0,34	1,73 ± 0,35 <sup>###</sup>	1,40 ± 0,40 ###
Neutrófilos	1,33 ± 0,17	1,96 ± 0,28	$1,32 \pm 0,33$	1,58 ± 0,34
Eosinófilos	$0,19 \pm 0,06$	0,75 ± 0,09 ***	$0,09 \pm 0,02$ ###	0,03 ± 0,01 ###
Monócitos	$0,\!06\pm0,\!03$	$0,\!08\pm0,\!02$	$0,05 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,02$
Basófilos	$0,\!02\pm0,\!01$	$0,03\pm0,02$	$\textbf{0,02} \pm \textbf{0,01}$	$0,\!02\pm0,\!01$

#### В

Células (x 10 <sup>3</sup> /µl)	Veiculo	DNCB	Dexa 125 nmol/animal	Dexa-TBZ 125 nmol/animal
Leucócitos totais	$5{,}16\pm0{,}30$	6,88 ± 0,50 **	2,86 ± 0,19 <sup>###</sup>	2,44 ± 0,19 <sup>###</sup>
Linfócitos	$\textbf{3,65} \pm \textbf{0,20}$	$4,\!40\pm0,\!25$	1,67 $\pm$ 0,14 $^{\#\#}$	1,25 $\pm$ 0,14 $^{\#\#}$
Neutrófilos	$\textbf{1,29} \pm \textbf{0,19}$	$1,\!70\pm0,\!29$	$1,15 \pm 0,10$	$1,\!16\pm0,\!12$
Eosinófilos	0,17 ± 0,03	0,72 ± 0,07 ***	0,02 ± 0,01 <sup>###</sup>	0,02 ± 0,00 <sup>###</sup>
Monócitos	$0,03\pm0,01$	$0,05\pm0,01$	0,01 ± 0,01	$0,01 \pm 0,00$
Basófilos	$\textbf{0,02} \pm \textbf{0,01}$	$\textbf{0,00} \pm \textbf{0,00}$	$0,\!00\pm0,\!00$	$0,00\pm0,00$

#### С

Células (x 10 <sup>3</sup> /µl)	Veiculo	DNCB	Dexa 250 nmol/animal	Dexa-TBZ 250 nmol/animal
Leucócitos totais	$4,\!44\pm0,\!36$	7,08 ± 0,63 ***	2,17 ± 0,32 <sup>###</sup>	1,60 ± 0,17 <sup>###</sup>
Linfócitos	$3,10 \pm 0,21$	4,84 $\pm$ 0,47 ***	1,10 $\pm$ 0,19 $^{\#\#}$	$0,59 \pm 0,08$ <sup>###</sup>
Neutrófilos	$1,05 \pm 0,19$	$1,\!58 \pm 0,\!24$	$1,\!02\pm0,\!18$	$0,97\pm0,13$
Eosinófilos	$0,22 \pm 0,04$	0,60 ± 0,07 ***	0,03 ± 0,01 <sup>###</sup>	0,02 ± 0,00 <sup>###</sup>
Monócitos	$0,05\pm0,01$	$0,06\pm0,02$	$0,\!02\pm0,\!01$	$0,01 \pm 0,00$
Basófilos	$0{,}02\pm0{,}01$	$0,\!00\pm0,\!00$	$\textbf{0,01} \pm \textbf{0,01}$	$0,00\pm0,00$

#### D

Células (x 10³/µl)	Veiculo	DNCB	Dexa 500 nmol/animal	Dexa-TBZ 500 nmol/animal
Leucócitos totais	$\textbf{5,}\textbf{46} \pm \textbf{0,}\textbf{54}$	5,18 ± 0,55	1,10 ± 0,13 <sup>###</sup>	1,04 ± 0,23 <sup>###</sup>
Linfócitos	$\textbf{3,57} \pm \textbf{0,32}$	$\textbf{2,87} \pm \textbf{0,40}$	0,52 $\pm$ 0,07 $^{\#\#}$	$0,46 \pm 0,11$ ###
Neutrófilos	$1,\!62\pm0,\!22$	$1,91 \pm 0,15$	$0,55\pm0,07$ <sup>###</sup>	$0,56 \pm 0,12$ ###
Eosinófilos	$0,20 \pm 0,03$	0,37 ± 0,03 ***	0,01 ± 0,00 <sup>###</sup>	0,01 ± 0,00 <sup>###</sup>
Monócitos	$0,\!05\pm0,\!02$	$0,03\pm0,01$	$0,01 \pm 0,00$	$0,01 \pm 0,00$
Basófilos	$0,03\pm0,02$	0,01 ± 0,01	$0,\!00\pm0,\!00$	$0,\!00\pm0,\!00$

#### Ε

Células (x 10 <sup>3</sup> /µl)	Veiculo	DNCB	TBZ 1 μmol/animal
Leucócitos totais	$\textbf{5,70} \pm \textbf{0,87}$	8,16 ± 0,34 *	8,71 ± 0,48 **
Linfócitos	$\textbf{3,73} \pm \textbf{0,64}$	$5,07\pm0,63$	$5{,}57\pm0{,}34$
Neutrófilos	$1,53 \pm 0,26$	3,11 ± 0,22 **	$3,39 \pm 0,34$ **
Eosinófilos	0,29 ± 0,06	0,95 ± 0,12 ***	$0,65 \pm 0,05$ $^{\#}$
Monócitos	$0,08\pm0,02$	$0,15\pm0,03$	$0{,}20\pm0{,}04$
Basófilos	$0,06\pm0,02$	$\textbf{0,07} \pm \textbf{0,02}$	$\textbf{0,10} \pm \textbf{0,01}$

**Figura 12** - Efeitos comparativos do tratamento tópico com dexametasona, dexametasona-TBZ ou TBZ no número total e diferencial de leucócitos no sangue de camundongos com DA experimental. (A) 62,5 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5-7); (B) 125 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5-7); (C) 250 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5-7); (C) 250 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5-7); (D) 500 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 6); (E) 1  $\mu$ mol/animal de TBZ (n = 5-7). Os dados são expressos como média ± EPM. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs. Veículo + Veículo; <sup>#</sup>P<0.05, <sup>###</sup>P<0.001 vs. DNCB + Veículo.

# 3.2.5 Efeitos comparativos da dexametasona, dexametasona-TBZ e TBZ na esplenomegalia e número de esplenócitos

Em modelos animais de DA, o peso do baço aumenta durante a ativação do sistema imunológico através da reação mediada por células, especialmente através da ativação de células T e B (Jung et al., 2015). Portanto, foram investigadas alterações morfológicas no baço dos camundongos com DA experimental.

Os camundongos sensibilizados e desafiados com DNCB apresentaram baços aumentados (esplenomegalia) com pesos significativamente maiores em comparação com o grupo que recebeu veículo, o número de esplenócitos totais também foi maior (não sendo significante em todos os experimentos) quando comparado com o grupo veículo. O tratamento dos animais com DA experimental com as diferentes doses de Dexa ou Dexa-TBZ promoveu a diminuição do peso do baço (Figura 13 A-D) e do número total de esplenócitos (Figura 14 A-D) abaixo dos valores observados nos animais sem DA experimental. O tratamento dos animais com o doador TBZ (1 µmol/animal) não mostrou alterações na esplenomegalia nem no número de esplenócitos totais induzidos pelo tratamento com DNCB (Figura 13 E e 14 E).


**Figura 13** - Efeitos comparativos do tratamento tópico com dexametasona, dexametasona-TBZ ou TBZ na esplenomegalia induzida por DNCB em camundongos. (A) 62,5 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5-7); (B) 125 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5-7); (C) 250 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5-7); (D) 500 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5-7); (D) 500 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5-7); (D) 500 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5-7); (D) 500 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5-7); (D) 500 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5-7); (D) 500 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5-7); (D) 500 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5-7); (D) 500 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5-7); (D) 500 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5-7); (D) 500 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5-7); (D) 500 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5-7); (D) 500 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 6); (E) 1 µmol/animal de TBZ (n = 5-7). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs. Veículo + Veículo; \*\*\*P<0.001 vs. DNCB + Veículo.



**Figura 14** - Efeitos comparativos do tratamento tópico com dexametasona, dexametasona-TBZ ou TBZ no número de esplenócitos totais em camundongos com DA experimental. (A) 62,5 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5-7); (B) 125 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5-7); (C) 250 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5-7); (D) 500 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5-7); (D) 500 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5-7); (D) 500 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ (n = 5-7). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs. Veículo + Veículo; \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.01 vs. DNCB + Veículo.

# 3.2.6 Efeitos comparativos da dexametasona, dexametasona-TBZ e TBZ nas concentrações plasmáticas de IgE em camundongos com DA experimental

Para examinar o efeito do tratamento sobre o aumento da IgE total plasmática induzida pela aplicação repetida de DNCB em camundongos, foram medidos os níveis plasmáticos de IgE nos grupos tratados topicamente com 250 nmol/animal de Dexa, Dexa-TBZ ou 1 µmol/animal de TBZ. A dose de 250 nmol/animal foi selecionada com base nos resultados obtidos nos itens anteriores e corresponde à dose que causou efeito máximo.

Como mostrado na Figura 15, o incremento dos níveis plasmáticos de IgE em camundongos com DA experimental não foi alterado pelo tratamento tópico com Dexa, Dexa-TBZ ou TBZ.



**Figura 15 -** Efeitos comparativos do tratamento tópico com dexametasona, dexametasona-TBZ ou TBZ nas concentrações plasmáticas de IgE total em camundongos com DA experimental. (A) 250 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ; (B) 1 µmol/animal de TBZ. Os dados foram expressos como média ± EPM. \*\*\*P<0.001 vs. Veículo+Veículo (n = 5-7).

3.2.7 Efeitos comparativos da dexametasona, dexametasona-TBZ e TBZ nas concentrações de IL-4, IL-5, IL-13 e eotaxina-1 em pele de camundongos com DA experimental

A resposta imune dominante Th2 desempenha um papel crítico no desenvolvimento de dermatite atópica. Para avaliar a resposta imune na pele de camundongos com DA experimental, foram avaliadas as concentrações das citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e da eotaxina-1.

Conforme ilustrado nas Figuras 16 e 17, a indução de DA experimental levou a um aumento significativo (P<0,05-P<0,001) das concentrações de IL-4 e da eotaxina-1, quando comparados aos animais do grupo veículo. Por outro lado, os níveis de ambas as citocinas IL-5 e IL-13 foram diminuídos significativamente (P<0,05-P<0,01) em relação ao grupo veículo.

O tratamento tópico com Dexa (250 nmol/animal) ou com Dexa-TBZ (dose equimolar) não revelou alteração significativa nas concentrações de IL-4 e eotaxina-1 em relação ao grupo DNCB, entretanto, no que concerne à IL-4, os animais tratados com Dexa-TBZ apresentaram níveis significativamente menores (P<0,01) desta citocina em comparação com o grupo tratado com Dexa (Figura 16 A).

Em referência às citocinas IL-5 e IL-13, o tratamento com Dexa aumentou significativamente (P<0,01) as concentrações de ambas as citocinas, revertendo o efeito observado no grupo de animais com DA, os valores observados também foram significativamente maiores (P<0,01) às concentrações obtidas no grupo tratado com Dexa-TBZ, que não mostrou alteração de estas citocinas (Figuras 16 B e C).

Por outro lado, o tratamento tópico com TBZ (1 µmol/animal) resultou em uma redução significativa de 87,4% (P<0,05) da concentração de IL-4, quando comparado com o grupo DNCB (Figura 17 A).



**Figura 16 -** Efeitos comparativos do tratamento tópico com dexametasona ou dexametasona-TBZ nas concentrações de citocinas em pele de camundongos com DA experimental. Efeito do tratamento com 250 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ nas concentrações de (A) IL-4, (B) IL-5, (C) IL-13 ou (D) Eotaxina-1. Os dados foram expressos como média ± EPM. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs. Veículo + Veículo; <sup>##</sup>P<0.01 vs. DNCB + Veículo; <sup>&&</sup>P<0.01 vs. DNCB + Dexa (n = 5-7).



**Figura 17** - Efeito do tratamento tópico com TBZ nas concentrações de citocinas em pele de camundongos com DA experimental. Efeito do tratamento tópico com 1 µmol/animal de TBZ nas concentrações de (A) IL-4, (B) IL-5, (C) IL-13 ou (D) Eotaxina-1. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs. Veículo + Veículo; <sup>#</sup>P<0.05 vs. DNCB + Veículo (n = 5-7).

# 3.2.8 Efeitos comparativos da dexametasona, dexametasona-TBZ e TBZ na produção endógena de H<sub>2</sub>S em pele de camundongos com DA experimental

Conforme apresentado na Figura 18, nenhuma alteração significativa foi observada em relação à capacidade de produção de H<sub>2</sub>S com o tratamento tópico com Dexa (250 nmol/aminal) ou com TBZ (1  $\mu$ mol/animal) comparado com o grupo DNCB, no entanto, os animais tratados com Dexa-TBZ (250 nmol/animal) exibiram uma capacidade de produção de H<sub>2</sub>S significativamente maior, com um aumento de 116,6% (P<0,01) em comparação com os animais tratados com Dexa (Figura 18 A).



**Figura 18 -** Efeitos comparativos do tratamento tópico com dexametasona, dexametasona-TBZ ou TBZ na produção endógena de H<sub>2</sub>S em pele de camundongos com DA experimental. (A) 250 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ; (B) 1 µmol/animal de TBZ. Os dados foram expressos como média ± EPM. \*P<0.05 vs. Veículo + Veículo; <sup>##</sup>P<0.01 vs. DNCB + Veículo; <sup>®</sup>P<0.05 vs. DNCB + Dexa (n = 5-7).

# 3.2.9 Efeitos comparativos da dexametasona, dexametasona-TBZ e TBZ na atividade das enzimas antioxidantes em camundongos com DA experimental

Para examinar o efeito do tratamento na atividade das enzimas antioxidantes em camundongos com DA experimental, foram medidas a atividade das enzimas SOD, catalase, GPx, GR e GST.

Como mostrado nas Figuras 19 e 20, a atividade das enzimas SOD, catalase e GST foi reduzida significativamente no grupo de animais sensibilizados e desafiados com DNCB em comparação com o grupo que recebeu veículo, não foram observadas alterações nas atividades das enzimas GPx e GR.

O tratamento tópico com Dexa (250 nmol/animal) ou Dexa-TBZ (dose equimolar) não interferiu na atividade das enzimas SOD, catalase, GR e GST, quando comparado ao grupo DNCB (Figura 19). No entanto, com relação à enzima GPx, o tratamento com Dexa-TBZ aumentou significativamente em 34,2% (P<0,001) a atividade desta enzima quando comparado ao grupo veículo, em 47,6% (P<0,001) quando comparado ao grupo DNCB e em 22,3% (P<0,05) quando comparado ao grupo tratado com Dexa (Figura 19 C).

Por outro lado, o tratamento tópico com TBZ (1 µmol/animal) não revelou alteração da atividade das enzimas SOD, catalase, GPx, GR e GST, quando comparado com o grupo DNCB (Figura 20).



**Figura 19 -** Efeitos comparativos do tratamento tópico com dexametasona ou dexametasona-TBZ na atividade das enzimas antioxidantes em pele de camundongos com DA experimental. Efeito do tratamento com 250 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ na atividade das enzimas (A) SOD, (B) catalase, (C) GPx, (D) GR ou (E) GST. Os dados são expressos como média ± EPM. \*P<0.05, \*\*\*P<0.001 vs. Veículo + Veículo; <sup>###</sup>P<0.001 vs. DNCB + Veículo; <sup>&</sup>P<0.05 vs. DNCB + Dexa (n = 5-7).



**Figura 20 -** Efeito do tratamento tópico com TBZ na atividade das enzimas antioxidantes em pele de camundongos com DA experimental. Efeito do tratamento tópico com 1 µmol/animal de TBZ na atividade das enzimas (A) SOD, (B) catalase, (C) GPx, (D) GR ou (E) GST. Os dados são expressos como média ± EPM. \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs. Veículo + Veículo (n = 5-7).

# 3.2.10 Efeitos comparativos da dexametasona, dexametasona-TBZ e TBZ nos marcadores de estresse oxidativo em camundongos com DA experimental

O dano oxidativo em proteínas foi mensurado pela determinação do conteúdo de grupos carbonila e nitrotirosina.

A expressão de proteínas contendo grupos nitrotirosina foi significativamente aumentada (P<0,05-0,01) na pele de camundongos com DA, em comparação com sua expressão nos camundongos sem DA. Por outro lado, a análise do conteúdo de proteínas carboniladas mostrou um incremento de expressão no grupo DNCB, mas não revelou variação significativa em comparação com o grupo veículo (Figuras 21 e 22).

O tratamento tópico com Dexa (250 nmol/animal) ou TBZ (1 µmol/animal) não teve efeito significativo na expressão de estes dois marcadores, mas a Dexa-TBZ (250 nmol/animal) reduziu acentuadamente tanto a expressão de resíduos proteicos de nitrotirosina, quanto a expressão de proteínas carboniladas em relação ao grupo DNCB, com porcentagens de redução de 68,4% (P<0,05) e 100% (P<0,05) respectivamente.



**Figura 21 -** Efeitos comparativos do tratamento tópico com dexametasona ou dexametasona-TBZ sobre os marcadores de estresse oxidativo de proteínas em pele de camundongos com DA experimental. Efeito do tratamento com 250 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ na expressão de (A) resíduos proteicos de nitrotirosina; (B) proteínas carboniladas. Os dados foram expressos como média ± EPM. \*\*P<0.01 vs. Veículo + Veículo; <sup>#</sup>P<0.05 vs. DNCB + Veículo (n = 5-7).



**Figura 22** - Efeito do tratamento tópico com TBZ sobre os marcadores de estresse oxidativo de proteínas em pele de camundongos com DA experimental. Efeito do tratamento com 1 µmol/animal de TBZ na expressão de (A) resíduos proteicos de nitrotirosina; (B) proteínas carboniladas. Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM. \*P<0.05 vs. Veículo + Veículo (n = 5-7).

#### 3.2.11 Efeitos comparativos da dexametasona, dexametasona-TBZ e TBZ nas concentrações plasmáticas de glicose, bilirrubina e enzimas hepáticas

Terapias a base de corticosteroides como a dexametasona podem alterar alguns parâmetros bioquímicos, por isso foram medidas as concentrações plasmáticas de glicose, bilirrubina e enzimas hepáticas ALT, AST e GGT.

A indução da DA experimental não revelou alterações nas concentrações plasmáticas de glicose (Figuras 23 e 24, painéis A). Quando aplicado o tratamento, a dose de 250 nmol/animal de Dexa provocou um aumento significativo (P<0,05) da concentração de glicose em comparação com os animais do grupo veículo (Figura 23 A). O tratamento com 250 nmol/animal de Dexa-TBZ ou com 1 µmol/animal de TBZ não alterou as concentrações de glicose, permanecendo semelhante ao grupo veículo.

No que concerne à concentração plasmática de bilirrubina, nenhuma alteração significativa foi observada tanto em resposta à aplicação de DNCB ou ao tratamento com Dexa, Dexa-TBZ ou TBZ (Figuras 23 e 24, painéis B)

Com relação às enzimas hepáticas ALT, AST e GGT, as Figuras 23 e 24 (painéis C e D) mostram que os níveis das enzimas ALT e AST foram aumentados significativamente no grupo de animais com DA experimental quando comparado com o grupo veículo, e não foram observadas alterações nos níveis da enzima GGT. Quando aplicado o tratamento, tanto Dexa (250 nmol/animal) quanto Dexa-TBZ (dose equimolar) promoveram um aumento acentuado (P<0,001) das concentrações da enzima ALT, quando comparado ao grupo DNCB (Figura 23 C). No entanto, o tratamento com TBZ (1 µmol/animal) reduziu significativamente em 86,6% (P<0,01) os níveis desta enzima em comparação com o grupo DNCB (Figura 24 C). Com relação às enzimas AST e GGT, o tratamento com Dexa, Dexa-TBZ ou TBZ não revelaram alterações nos níveis plasmáticos destas enzimas, mostrando valores semelhantes ao grupo DNCB.



**Figura 23 -** Efeitos comparativos do tratamento tópico com dexametasona ou dexametasona-TBZ nas concentrações plasmáticas de glicose, bilirrubina e enzimas hepáticas em camundongos com DA experimental. Efeito do tratamento com 250 nmol/animal de dexametasona ou dexametasona-TBZ nas concentrações plasmáticas de (A) glicose, (B) bilirrubina, (C) ALT, (D) AST ou (E) GGT. Os dados são expressos como média ± EPM. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs. Veículo + Veículo; <sup>###</sup>P<0.001 vs. DNCB + Veículo (n = 5-7).



**Figura 24** - Efeito do tratamento tópico com TBZ nas concentrações plasmáticas de glicose, bilirrubina e enzimas hepáticas em camundongos com DA experimental. Efeito do tratamento tópico com 1 µmol/animal de TBZ nas concentrações plasmáticas de (A) glicose, (B) bilirrubina, (C) ALT, (D) AST ou (E) GGT. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs. Veículo + Veículo; <sup>##</sup>P<0.01 vs. DNCB + Veículo (n = 5-7).

### 3.3 Efeitos do tratamento tópico com dexametasona-ADT ou ADT-OH no desenvolvimento da DA experimental

3.3.1 Efeitos da dexametasona-ADT e ADT-OH no prurido em camundongos com DA experimental

Conforme ilustrado na Figura 25, o tratamento tópico dos animais com DA experimental, com 250 nmol/animal de dexametasona-ADT (Dexa-ADT) por 5 dias consecutivos (a partir do dia 19 até o dia 23) foi capaz de reduzir significativamente, a partir do dia 22, o prurido induzido pela aplicação repetida de DNCB na pele de camundongos, alcançando a porcentagem de redução de 65,2% (P<0,001) medido no dia 24. Por outro lado, a administração do doador ADT-OH (1 µmol/animal) em animais com DA experimental, não alterou significativamente o prurido, em comparação com o grupo DNCB.



**Figura 25 -** Efeitos do tratamento tópico com o derivado dexametasona-ADT ou ADT-OH no prurido induzido por DNCB em camundongos. Efeito do tratamento tópico com 250 nmol/animal de dexametasona-ADT ou 1 µmol/animal de ADT-OH no prurido induzido. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs. Veículo + Veículo; <sup>###</sup>P<0.001 vs. DNCB + Veículo; <sup>&&&</sup>P<0.001 vs. DNCB + ADT-OH (n = 5-7).

### 3.3.2 Efeitos da dexametasona-ADT e ADT-OH no escore de lesões cutâneas em camundongos com DA experimental

Nos animais com DA experimental que receberam tratamento tópico com Dexa-ADT (250 nmol/animal), o escore de gravidade das lesões foi acentuadamente diminuído desde o dia 22, a redução do escore de gravidade no dia 24 foi de 31,8% (P<0,001), em comparação com o grupo DNCB. Por sua vez, a administração do doador ADT-OH (1 µmol/animal) não afetou no escore de gravidade das lesões (Figura 26).



**Figura 26 -** Efeitos do tratamento tópico com o derivado dexametasona-ADT ou ADT-OH nas lesões da pele induzidas por DNCB em camundongos. Efeito do tratamento tópico com 250 nmol/animal de dexametasona-ADT ou 1 µmol/animal de ADT-OH no escore de lesões cutâneas. Os dados são expressos como média ± EPM. \*\*\*P<0.001 vs. Veículo + Veículo; <sup>##</sup>P<0.01, <sup>###</sup>P<0.001 vs. DNCB + Veículo; <sup>&</sup>P<0.05, <sup>&&&</sup>P<0.001 vs. DNCB + ADT-OH (n = 5-7).

### 3.3.3 Efeitos da dexametasona-ADT e ADT-OH no edema de orelha induzido em camundongos com DA experimental

O tratamento tópico com 250 nmol/animal de Dexa-ADT em animais com DA experimental, reduziu completamente a formação do edema orelha (100%; P<0,01), quando comparado com o grupo DNCB. Quando testado o doador ADT-OH (1 µmol/animal) não revelou alteração significativa no edema de orelha induzido por DNCB (Figura 27).



**Figura 27 -** Efeitos do tratamento tópico com o derivado dexametasona-ADT ou ADT-OH no edema de orelha induzido por DNCB em camundongos. Efeito do tratamento tópico com 250 nmol/animal de dexametasona-ADT ou 1 µmol/animal de ADT-OH no edema de orelha. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. \*\*P<0.01 vs. Veículo + Veículo; <sup>##</sup>P<0.01 vs. DNCB + Veículo (n = 5-7).

## 3.3.4 Efeitos da dexametasona-ADT e ADT-OH no número total e diferencial de leucócitos no sangue

O tratamento tópico com Dexa-ADT (250 nmol/animal) em camundongos com DA experimental diminuiu significativamente o número de eosinófilos, induzido por DNCB, com valores abaixo dos observados nos animais sem DA; os números de leucócitos totais e linfócitos também foram diminuídos significativamente, em comparação com o grupo DNCB. Além disso, o tratamento tópico com ADT-OH (1 µmol/animal) diminuiu em 92,7% a eosinofilia induzida por DNCB (P<0,001; Figura 28).

Células (x 10 <sup>3</sup> /µl)	Veiculo	DNCB	Dexa-ADT 250 nmol/animal	ADT-OH 1 µmol/animal
Leucócitos totais	$5,\!18\pm0,\!25$	7,18 ± 0,63	4,19 ± 0,53 <sup>## &amp;&amp;</sup>	7,12 ± 0,51
Linfócitos	$3,31 \pm 0,14$	$\textbf{3,85} \pm \textbf{0,32}$	2,35 $\pm$ 0,31 $^{\#$ &&	$\textbf{4,30} \pm \textbf{0,20}$
Neutrófilos	$1,\!34\pm0,\!12$	$2,31 \pm 0,31$	1,71 ± 0,24	$\textbf{2,35} \pm \textbf{0,39}$
Eosinófilos	$0,35 \pm 0,04$	0,90 ± 0,08 ***	0,09 ± 0,02 <sup>### &amp;&amp;</sup>	0,39 ± 0,09 <sup>###</sup>
Monócitos	$0,07\pm0,02$	$0,10\pm0,03$	$0,04\pm0,02$	$0,07\pm0,01$
Basófilos	$0{,}02\pm0{,}01$	$0,\!02\pm0,\!02$	$0,00\pm0,00$	$\textbf{0,01} \pm \textbf{0,01}$

**Figura 28 -** Efeitos do tratamento tópico com o derivado dexametasona-ADT e ADT-OH no número total e diferencial de leucócitos no sangue de camundongos com DA experimental. Efeito do tratamento tópico com 250 nmol/animal de dexametasona-ADT ou 1 µmol/animal de ADT-OH no número total e diferencial de leucócitos em sangue. Os dados são expressos como média ± EPM. \*\*\*P<0.001 vs. Veículo + Veículo; <sup>##</sup>P<0.01, <sup>###</sup>P<0.001 vs. DNCB + Veículo; <sup>&&</sup>P<0.01 vs. DNCB + ADT-OH (n = 5-7).

### 3.3.5 Efeitos da dexametasona-ADT e ADT-OH na esplenomegalia e número de esplenócitos

Os pesos dos baços e o número total de esplenócitos marcadamente aumentados nos animais com DA experimental foram reduzidos pelo tratamento tópico com 250 nmol/aminal de Dexa-ADT abaixo dos valores observados nos animais sem DA. Por sua vez, o tratamento com o doador ADT-OH (1 µmol/animal) reduziu de modo significativo a esplenomegalia em 55,9% (P<0,05), em comparação com o grupo com DA experimental (Figura 29 A e B).



**Figura 29** - Efeitos do tratamento tópico com o derivado dexametasona-ADT ou ADT-OH na esplenomegalia e no número de esplenócitos totais em camundongos com DA experimental. (A) Efeito do tratamento tópico com 250 nmol/animal de dexametasona-ADT ou 1 µmol/animal de ADT-OH na esplenomegalia; (B) Efeito do tratamento tópico com 250 nmol/animal de dexametasona-ADT ou 1 µmol/animal de ADT-OH no número de esplenócitos totais. Os dados são expressos como média ± EPM. \*P<0.05, \*\*\*P<0.001 vs. Veículo + Veículo; \*P<0.05, \*#P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs. DNCB + ADT-OH (n = 5-7).

## 3.3.6 Efeitos da dexametasona-ADT e ADT-OH nas concentrações plasmáticas de IgE de camundongos com DA experimental

Conforme ilustra a Figura 30, a elevada concentração plasmática de IgE total em camundongos com DA experimental não foi alterada pela aplicação dos tratamentos com Dexa-ADT (250 nmol/animal) ou ADT-OH (1 µmol/animal).



**Figura 30** - Efeitos do tratamento tópico com o derivado dexametasona-ADT ou ADT-OH nos níveis plasmáticos de IgE total em camundongos com DA experimental. Efeito do tratamento tópico com 250 nmol/animal de dexametasona-ADT ou 1 µmol/animal de ADT-OH nas concentrações plasmáticas de IgE em camundongos com DA induzida por DNCB. Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM. \*\*P<0.01 vs. Veículo+Veículo (n = 5-7).

## 3.3.7 Efeitos da dexametasona-ADT e ADT-OH nas concentrações de IL-4, IL-5, IL-13 e eotaxina-1 em pele de camundongos com DA experimental

Na avaliação das concentrações de citocinas em pele, tanto o tratamento com Dexa-ADT (250 nmol/animal) como com ADT-OH (1 µmol/animal) reduziram significativamente os níveis de IL-4, com porcentagens de redução de 81,3% e 73,4% respectivamente (P<0,05) quando comparado com o grupo DNCB (Figura 31 A).

No que concerne à IL-5, IL-13 e eotaxina-1, nenhuma alteração significativa das concentrações de estas citocinas foi observada em resposta aos tratamentos com Dexa-ADT ou ADT, quando comparadas com o grupo DNCB (Figura 31).



**Figura 31 -** Efeitos do tratamento tópico com o derivado dexametasona-ADT ou ADT-OH nas concentrações de citocinas em pele de camundongos com DA experimental. Efeito do tratamento com 250 nmol/animal de dexametasona-ADT ou 1 µmol/animal de ADT-OH nas concentrações de (A) IL-4, (B) IL-5, (C) IL-13 ou (D) Eotaxina-1. Os dados foram expressos como média ± EPM. \*P<0.05, \*P<0.05, \*\*\*P<0.001 vs. Veículo + Veículo; <sup>#</sup>P<0.05 vs. DNCB + Veículo (n = 5-7).

# 3.3.8 Efeitos da dexametasona-ADT e ADT-OH na produção endógena de H<sub>2</sub>S em pele de camundongos com DA experimental

Conforme mostra a Figura 32, não foram observadas alterações significativas em relação à capacidade de produção de H<sub>2</sub>S com o tratamento tópico com Dexa-ADT (250 nmol/aminal) ou com ADT-OH (1 µmol/animal) quando comparado com o grupo DNCB.



**Figura 32** - Efeitos do tratamento tópico com o derivado dexametasona-ADT ou ADT-OH na produção endógena de H<sub>2</sub>S em pele de camundongos com DA experimental. Efeito do tratamento tópico com 250 nmol/animal de dexametasona-ADT ou 1 µmol/animal de ADT-OH na produção endógena de H<sub>2</sub>S em pele de camundongos com DA induzida por DNCB. Os dados foram expressos como média ± EPM. \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs. Veículo + Veículo (n = 5-7).

# 3.3.9 Efeitos da dexametasona-ADT e ADT-OH na atividade das enzimas antioxidantes em camundongos com DA experimental

Não foram observados quaisquer efeitos nas atividades das enzimas antioxidantes SOD, catalase, GPx, GR ou GST, em resposta à aplicação tópica de Dexa-ADT (250 nmol/animal) ou ADT-OH (1 µmol/animal), quando comparado com o grupo DNCB (Figura 33).



**Figura 33 -** Efeitos do tratamento tópico com o derivado dexametasona-ADT ou ADT-OH na atividade das enzimas antioxidantes em pele de camundongos com DA experimental. Efeito do tratamento com 250 nmol/animal de dexametasona-ADT ou ADT-OH na atividade das enzimas (A) SOD, (B) catalase, (C) GPx, (D) GR ou (E) GST (n = 5-7). Os dados são expressos como média ± EPM. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs. Veículo + Veículo.

### 3.3.10 Efeitos da dexametasona-ADT e ADT-OH nos marcadores de estresse oxidativo em camundongos com DA experimental

Como ilustra a Figura 34, os marcadores de estresse oxidativo aumentados em pele de animais com DA experimental, foram significativamente reduzidos em resposta ao tratamento tópico com Dexa-ADT (250 nmol/animal). Assim, a expressão de proteínas contendo grupos nitrotirosina foi reduzida em 56,8% (P<0,05), e a expressão de proteínas carboniladas foi reduzida em mais 100% (P<0,001), quando foram comparados com o grupo DNCB. Por sua vez, o tratamento com ADT-OH (1 µmol/animal) não mostrou alteração na expressão de estes dois marcadores.



**Figura 34 -** Efeitos do tratamento tópico com o derivado dexametasona-ADT ou ADT-OH sobre os marcadores de estresse oxidativo de proteínas em pele de camundongos com DA experimental. Efeito do tratamento com 250 nmol/animal de dexametasona-ADT ou 1 µmol/animal de ADT-OH na expressão de (A) resíduos proteicos de nitrotirosina; (B) proteínas carboniladas. Os dados foram expressos como média ± EPM. \*\*P<0.01 vs. Veículo + Veículo; <sup>#</sup>P<0.05 vs. DNCB + Veículo (n = 5-7).

### 3.3.11 Efeitos da dexametasona-ADT e ADT-OH nas concentrações plasmáticas de glicose, bilirrubina e enzimas hepáticas

A análise das concentrações plasmáticas de glicose ou bilirrubina não revelou nenhuma alteração significativa tanto em resposta à aplicação de DNCB ou ao tratamento com Dexa-ADT (250 namol/animal) ou ADT-OH (1 µmol/animal), permanecendo semelhante ao grupo veículo (Figura 35 A e B).

No que concerne às enzimas hepáticas, os níveis das enzimas ALT e AST foram aumentados significativamente no grupo DNCB quando comparado com o grupo veículo, e não foram observadas alterações nos níveis da enzima GGT (Figura 35 C, D e E). O tratamento com Dexa-ADT (250 nmol/animal) causou um aumento acentuado (P<0,001) da concentração da enzima ALT, quando comparado ao grupo DNCB. Entretanto, o tratamento com ADT-OH (1 µmol/animal) reduziu significativamente em 98,6% (P<0,05) os níveis desta enzima em comparação com o grupo DNCB (Figura 35 C). Com relação às enzimas AST e GGT, o tratamento com Dexa-ADT ou ADT-OH não revelaram alterações nos níveis plasmáticos destas enzimas, mostrando valores semelhantes ao grupo DNCB.



**Figura 35** - Efeitos do tratamento tópico com o derivado dexametasona-ADT ou ADT-OH nas concentrações plasmáticas de glicose, bilirrubina e enzimas hepáticas em camundongos com DA experimental. Efeito do tratamento com 250 nmol/animal de dexametasona-ADT ou 1 µmol/animal de ADT-OH nas concentrações plasmáticas de (A) glicose, (B) bilirrubina, (C) ALT, (D) AST ou (E) GGT. Os dados são expressos como média ± EPM. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs. Veículo + Veículo; \*P<0.05, \*\*P<0.001 vs. DNCB + Veículo (n = 5-7).

## 3.4 Efeitos do tratamento tópico com AP39 ou RT01 no desenvolvimento da DA experimental

3.4.1 Efeitos do tratamento com AP39 ou RT01 no prurido em camundongos com DA experimental

O prurido desenvolvido pela aplicação repetida de DNCB foi significativamente reduzido pelo tratamento tópico de 0,1 e 0,2 nmol/animal de AP39 (35,6% e 42,5% respectivamente; P<0,001) em comparação com o grupo DNCB (Figura 36 A). O tratamento com 0,2 nmol/animal de RT01 não revelou diferencia significativa em relação ao grupo DNCB (Figura 36 B).



**Figura 36** - Efeitos do tratamento tópico com AP39 ou RT01 no prurido induzido por DNCB em camundongos. (A) Efeito de 0,1 e 0,2 nmol/animal de AP39 (n = 5-7); (B) Efeito de 0,2 nmol/animal de RT01 (n = 5-7). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. \*P<0.05, \*\*\*P<0.001 vs. Veículo + Veículo; \*P<0.05, \*\*\*P<0.001 vs. DNCB + Veículo.

### 3.4.2 Efeitos do tratamento com AP39 ou RT01 no escore de lesões cutâneas em camundongos com DA experimental

O tratamento tópico com AP39 às doses de 0,1 e 0,2 nmol/animal demonstrou ser eficaz na diminuição das lesões da pele de camundongos com DA experimental, com porcentagens de redução de 17,9% (P<0,05) e 22,3% (P<0,01) respectivamente, em comparação ao grupo que recebeu DNCB (Figura 37 A). O grupo tratado com 0,2 nmol/animal de RT01 também exibiu escores de gravidade significativamente menores (15,4%; P<0,05), quando comparado ao grupo DNCB (Figura 37 B).



**Figura 37 -** Efeitos do tratamento tópico com AP39 ou RT01 nas lesões da pele induzidas por DNCB em camundongos. (A) Efeito de 0,1 e 0,2 nmol/animal de AP39 (n = 5-7); (B) Efeito de 0,2 nmol/animal de RT01 (n = 5-7). Os dados são expressos como média ± EPM. \*\*\*P<0.001 vs. Veículo + Veículo; <sup>#</sup>P<0.05, <sup>##</sup>P<0.01 vs. DNCB + Veículo.

## 3.4.3 Efeitos do tratamento com AP39 ou RT01 no edema de orelha induzido em camundongos com DA experimental

O tratamento tópico dos animais com a dose 0,2 nmol/animal de AP39 reduziu significativamente (64,7%, P<0,05) o edema de orelha induzido pela aplicação repetida de DNCB, quando comparado com o grupo DNCB (Figura 38 A). O tratamento com a dose de 0,1 nmol/animal de AP39 ou com 0,2 nmol/animal de RT01 não revelou alterações significativas no edema de orelha, em relação ao grupo DNCB (Figura 38 A e B).



**Figura 38 -** Efeitos do tratamento tópico com AP39 ou RT01 no edema de orelha induzido por DNCB em camundongos. (A) Efeito de 0,1 e 0,2 nmol/animal de AP39 (n = 5-7); (B) Efeito de 0,2 nmol/animal de RT01 (n = 5-7). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs. Veículo + Veículo; <sup>#</sup>P<0.01 vs. DNCB + Veículo; <sup>&</sup>P<0.01 vs. DNCB + AP39 0,1.

## 3.4.4 Efeitos do tratamento com AP39 ou RT01 no número total e diferencial de leucócitos no sangue

O tratamento tópico com AP39 (0,2 nmol/animal) ou RT01 (0,2 nmol/animal) em camundongos com DA experimental diminuiu significativamente os números de eosinófilos induzidos por DNCB com porcentagens de redução de 85,9% (P<0,05) e 50,0% (P<0,01) respectivamente, quando comparado com o grupo DNCB. (Figura 39). A dose de 0,1 nmol/animal de AP39 não revelou nenhuma alteração em comparação com o grupo DNCB.

Α				
Células (x 10 <sup>3</sup> /µl)	Veiculo	DNCB	AP39 0,1 nmol/animal	AP39 0,2 nmol/animal
Leucócitos totais	$5{,}58 \pm 0{,}25$	7,97 ± 0,26 *	7,75 ± 0,57 *	8,52 ± 0,49 **
Linfócitos	$\textbf{3,60} \pm \textbf{0,31}$	$\textbf{4,27} \pm \textbf{0,38}$	$\textbf{4,15} \pm \textbf{0,36}$	$\textbf{4,81} \pm \textbf{0,28}$
Neutrófilos	$1,\!41\pm0,\!06$	$\textbf{2,39} \pm \textbf{0,33}$	$2,73 \pm 0,33$ **	$3,00 \pm 0,27$ **
Eosinófilos	$0,46 \pm 0,08$	1,17 ± 0,14 *	$0,68 \pm 0,16$	$0,56 \pm 0,10$
Monócitos	$\textbf{0,10} \pm \textbf{0,01}$	0,11 ± 0,03	$\textbf{0,18} \pm \textbf{0,03}$	$0,13\pm0,03$
Basófilos	$\textbf{0,02} \pm \textbf{0,01}$	$\textbf{0,03} \pm \textbf{0,02}$	$\textbf{0,01} \pm \textbf{0,01}$	$\textbf{0,02} \pm \textbf{0,01}$

Células (x 10 <sup>3</sup> /µl)	Veiculo	DNCB	RT01 0,2 nmol/animal
Leucócitos totais	$4,\!34\pm0,\!59$	7,28 ± 0,35 **	5,55 ± 0,35
Linfócitos	$3,\!05\pm0,\!43$	$\textbf{3,83} \pm \textbf{0,27}$	$\textbf{3,13} \pm \textbf{0,23}$
Neutrófilos	$0,92\pm0,11$	$2,45 \pm 0,25$ **	$1,75 \pm 0,15$
Eosinófilos	0,29 ± 0,05	0,85 ± 0,06 ***	0,57 ± 0,04 <sup>##</sup>
Monócitos	$0,06\pm0,02$	$\textbf{0,10} \pm \textbf{0,02}$	$0,\!08\pm0,\!01$
Basófilos	$0,02\pm0,01$	$\textbf{0,04} \pm \textbf{0,02}$	$0,02\pm0,01$

В

**Figura 39** - Efeitos do tratamento tópico com AP39 ou RT01 no número total e diferencial de leucócitos no sangue de camundongos com DA experimental. (A) Efeito de 0,1 e 0,2 nmol/animal de AP39 (n = 5-7); (B) Efeito de 0,2 nmol/animal de RT01 (n = 5-7). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs. Veículo + Veículo; \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs. DNCB + Veículo.

## 3.4.5 Efeitos do tratamento com AP39 ou RT01 na esplenomegalia e número de esplenócitos

O tratamento com 0,2 nmol/animal de AP39 evitou a esplenomegalia evidenciada nos animais com DA experimental, mostrando uma redução de 68,2% (P<0,001) nos pesos dos baços, em comparação com o grupo DNCB (Figura 40 A). O tratamento com 0,1 nmol/animal de AP39 ou com 0,2 nmol/animal de RT01 não mostrou qualquer alteração nos pesos dos baços (Figura 40 A e B). Por outro lado, o número total de esplenócitos, não sofreu variação em resposta à aplicação de DNCB nem ao tratamento com AP39 ou RT01 (Figura 41).



**Figura 40 -** Efeitos do tratamento tópico com AP39 ou RT01 na esplenomegalia induzida por DNCB em camundongos. (A) Efeito de 0,1 e 0,2 nmol/animal de AP39 (n = 5-7); (B) Efeito de 0,2 nmol/animal de RT01 (n = 5-7). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs. Veículo + Veículo; <sup>###</sup>P<0.01 vs. DNCB + Veículo; <sup>&</sup>P<0.05 vs. DNCB + AP39 0,1.



**Figura 41 -** Efeitos do tratamento tópico com AP39 ou RT01 no número de esplenócitos totais em camundongos com DA experimental. (A) Efeito de 0,1 e 0,2 nmol/animal de AP39 (n = 5-7); (B) Efeito de 0,2 nmol/animal de RT01 (n = 5-7).

## 3.4.6 Efeitos do tratamento com AP39 ou RT01 nas concentrações plasmáticas de IgE em camundongos com DA experimental

Conforme mostrado na Figura 42, tanto o tratamento com AP39 (0,1-0,2 nmol/animal) como com RT01 (0,2 nmol/animal) não alteraram os níveis plasmáticos de IgE total em camundongos com DA experimental.



**Figura 42** - Efeitos do tratamento tópico com AP39 ou RT01 nos níveis plasmáticos de IgE total em camundongos com DA experimental. (A) Efeito de 0,1 e 0,2 nmol/animal de AP39 (n = 5-7); (B) Efeito de 0,2 nmol/animal de RT01 (n = 5-7). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. \*\*\*P<0.001 vs. Veículo + Veículo.
## 3.4.7 Efeitos do tratamento com AP39 ou RT01 nas concentrações de IL-4, IL-5, IL-13 e eotaxina-1 em pele de camundongos com DA experimental

O tratamento tópico com as doses de 0,1 e 0,2 nmol/animal de AP39 reverteu completamente os níveis das citocinas IL-4 e eotaxina-1, elevados em pele de animais com DA experimental (Figura 43 A e D). Em referência às citocinas IL-5 e IL-13, o tratamento com AP39 (ambas as doses) promoveu uma diminuição mais acentuada das concentrações de ambas as citocinas, com valores significativamente menores (P<0,05-0,001) às concentrações obtidas no grupo DNCB (Figuras 43 B e C).

Por outro lado, o tratamento tópico com RT01 (0,2 nmol/animal) resultou em uma redução significativa de 82,2% (P<0,001) da concentração de IL-4, quando comparado com o grupo DNCB (Figura 44 A). No que concerne à IL-5, IL-13 e eotaxina-1, nenhuma alteração significativa das concentrações de estas citocinas foi observada em resposta ao tratamento com RT01, quando comparados com o grupo DNCB (Figura 44 B-D).



**Figura 43** - Efeitos do tratamento tópico com AP39 nas concentrações de citocinas em pele de camundongos com DA experimental. Efeito do tratamento com 0,1 ou 0,2 nmol/animal de AP39 nas concentrações de (A) IL-4, (B) IL-5, (C) IL-13 ou (D) Eotaxina-1. Os dados foram expressos como média ± EPM. \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs. Veículo + Veículo; <sup>#</sup>P<0.05, <sup>##</sup>P<0.01, <sup>###</sup>P<0.001 vs. DNCB + Veículo (n = 5-7).



**Figura 44** - Efeito do tratamento tópico com RT01 nas concentrações de citocinas em pele de camundongos com DA experimental. Efeito do tratamento tópico com 0,2 nmol/animal de RT01 nas concentrações de (A) IL-4, (B) IL-5, (C) IL-13 ou (D) Eotaxina-1. Os dados são expressos como média ± EPM. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs. Veículo + Veículo; <sup>###</sup>P<0.001 vs. DNCB + Veículo (n = 5-7).

# 3.4.8 Efeitos do tratamento com AP39 ou RT01 na produção endógena de H<sub>2</sub>S em pele de camundongos com DA experimental

Conforme ilustra a Figura 45, nenhuma alteração significativa foi observada em relação à capacidade de produção de H<sub>2</sub>S com o tratamento tópico com AP39 (0,1-0,2 nmol/animal) ou com RT01 (0,2 nmol/animal), quando comparado com o grupo de animais com DA experimental.



**Figura 45** - Efeitos do tratamento tópico com AP39 ou RT01 na produção endógena de  $H_2S$  em pele de camundongos com DA experimental. (A) 0,1 ou 0,2 nmol/animal de AP39; (B) 0,2 nmol/animal de RT01. Os dados foram expressos como média ± EPM. \*\*P<0.01 vs. Veículo + Veículo (n = 5-7).

3.4.9 Efeitos do tratamento com AP39 ou RT01 na atividade das enzimas antioxidantes em camundongos com DA experimental

O tratamento tópico com AP39 (0,1-0,2 nmol/animal) ou RT01 (0,2 nmol/animal) em animais com DA experimental, não interferiu na atividade das enzimas antioxidantes SOD, catalase, GPx, GR e GST, mostrando valores semelhantes aos reportados no grupo DNCB (Figuras 46 e 47).



**Figura 46** - Efeitos do tratamento tópico com AP39 na atividade das enzimas antioxidantes em camundongos com DA experimental. Efeito do tratamento com 0,1 ou 0,2 nmol/animal de AP39 na atividade das enzimas (A) SOD, (B) catalase, (C) GPx, (D) GR ou (E) GST. Os dados são expressos como média ± EPM. \*P<0.05, \*\*\*P<0.001 vs. Veículo + Veículo (n = 5-7).





**Figura 47 -** Efeito do tratamento tópico com RT01 na atividade das enzimas antioxidantes em pele de camundongos com DA experimental. Efeito do tratamento tópico com 0,2 nmol/animal de RT01 na atividade das enzimas (A) SOD, (B) catalase, (C) GPx, (D) GR ou (E) GST . Os dados são expressos como média ± EPM. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs. Veículo + Veículo (n = 5-7).

## 3.4.10 Efeitos do tratamento com AP39 ou RT01 nos marcadores de estresse oxidativo em camundongos com DA experimental

O tratamento tópico com a dose 0,2 nmol/animal de AP39 reduziu significativamente em 32,9% (P<0,05) a expressão de proteínas carboniladas, aumentadas em pele de animais com DA experimental (Figura 48 B). Por outro lado, o tratamento tópico com as doses 0,1 nmol/animal de AP39 ou 0,2 nmol/animal de RT01 não mostrou nenhuma alteração na expressão de estes dois marcadores, exibindo valores semelhantes ao grupo de DNCB (Figuras 48 e 49).



**Figura 48** - Efeitos do tratamento tópico com AP39 sobre os marcadores de estresse oxidativo de proteínas em pele de camundongos com DA experimental. Efeito do tratamento com 0,1 ou 0,2 nmol/animal de AP39 na expressão de (A) resíduos proteicos de nitrotirosina; (B) proteínas carboniladas. Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM. \*\*\*P<0.001 vs. Veículo + Veículo; #P<0.05 vs. DNCB + Veículo (n = 5-7).



**Figura 49** - Efeito do tratamento tópico com RT01 sobre os marcadores de estresse oxidativo de proteínas em pele de camundongos com DA experimental. Efeito do tratamento com 0,2 nmol/animal de RT01 na expressão de (A) resíduos proteicos de nitrotirosina; (B) proteínas carboniladas. Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM. \*P<0.05, \*\*\*P<0.001 vs. Veículo + Veículo (n = 5-7).

Por fim, considerando todos os resultados acima descritos, podemos resumir os efeitos dos diferentes tratamentos nas Tabelas 4 e 5.

Parâmetros	<b>Dexa</b> 250 nmol/animal	<b>Dexa-TBZ</b> 250 nmol/animal	<b>Dexa-ADT</b> 250 nmol/animal	<b>TBZ</b> 1 μmol/animal	<b>ADT-OH</b> 1 μmol/animal
Prurido	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	-	-
Escore de lesões	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	-	-
Edema de orelha	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	-	-
Eosinofilia	$\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$
Esplenomegalia	$\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow$	-	$\downarrow$
IL-4	-	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$
Produção de H <sub>2</sub> S	-	1	-	-	-
Atividade GPx	-	1	-	-	-
Nitrotirosina	-	$\downarrow$	$\downarrow$	-	-
Proteinas carboniladas	-	$\downarrow$	$\downarrow$	-	-
Glicose	1	-	-	-	-
ALT	$\uparrow \uparrow$	$\uparrow \uparrow$	$\uparrow \uparrow$	$\downarrow$	$\downarrow$

Tabela 4 - Resultados do tratamento com Dexa, Dexa-TBZ, Dexa-ADT, TBZ e ADT-OH

Legenda: ↑: aumenta; ↑↑: aumenta acentuadamente; ↓: diminui; ↓↓: diminui acentuadamente; -: sem efeito.

#### Tabela 5 - Resultados do tratamento com AP39 e RT01

Parâmetros	<b>AP39</b> 0,1 nmol/animal	<b>AP39</b> 0,2 nmol/animal	<b>RT01</b> 0,2 nmol/animal
Prurido	$\downarrow$	$\downarrow$	-
Escore de lesões	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$
Edema de orelha	-	$\downarrow$	-
Eosinofilia	-	$\downarrow$	$\downarrow$
Esplenomegalia	-	$\downarrow$	-
IL-4	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$
Eotaxina-1	$\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow$	-
Proteinas carboniladas	-	$\downarrow$	-

Legenda: 1: diminui; 11: diminui acentuadamente; -: sem efeito.

#### 4 DISCUSSÃO

A DA é uma doença inflamatória crônica da pele caracterizada por prurido intenso e lesões eczematosas recorrentes, associada à dominância Th2 e apresenta níveis elevados de IgE sérica e eosinofilia sanguínea e tecidual (Nakahara et al., 2020). Recentemente a prevalência de DA aumentou em todo o mundo, especialmente nos países industrializados. O inicio da doença geralmente ocorre durante a infância, mas pode persistir na idade adulta (Weidinger et al., 2018). Além disso, os pacientes com DA têm maior risco de desenvolver asma, alergia alimentar e rinite alérgica (Leung et al., 2004).

Assim como em outras doenças humanas, o uso de modelos animais para estudo da DA é uma ferramenta fundamental para investigar a patogênese da doença visando o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Em a aplicação tópica repetida de camundongos, haptenos como DNCB, trinitroclorobenzeno (TNCB) e oxazolona evoca uma resposta inflamatória crônica Th2 dominante que é semelhante à DA humana (Matsumoto et al., 2004; Man et al., 2008). O background genético nos camundongos também é importante e influencia no equilíbrio Th1/Th2, camundongos C57BI/6 preferencialmente desenvolvem resposta imune Th1 enquanto que camundongos BALB/c favorecem a produção de citocinas Th2 (Hsieh et al., 1995; Stewart et al., 2002). No presente estudo, foram selecionados camundongos fêmeas BALB/c para a indução da DA. A aplicação tópica repetida de DNCB resultou ser uma ferramenta eficiente para induzir dermatites crônicas, sensibilizando camundongos três dias seguidos (dias 1-3) com aplicação epicutânea de DNCB a 0,5% na pele dorsal depilada e desafiando-os (depois de 15 dias da primeira aplicação) com DNCB a 0,2% quatro vezes (nos dias 15, 17, 19 e 22) na orelha direita e na pele dorsal. Em concordância com dados da literatura (Chan et al., 2013; Alves et al., 2016; Lin et al., 2017), o modelo de dermatite experimental crônica na pele de camundongos utilizado neste estudo, exibiu características clínicas e imunológicas semelhantes à DA humana tais como prurido, lesões cutâneas eczematosas (que incluem, eritema e hemorragia, edema, ressecamento, erosão superficial e escoriação profunda), edema de orelha, eosinofilia, níveis aumentados de IgE plasmática, bem como níveis aumentados de IL-4 e eotaxina-1 em pele. Portanto, este modelo simples e reprodutível pode ser usado para avaliar agentes com potencial terapêutico para o tratamento da DA em humanos.

Os corticosteroides, como a dexametasona, são considerados terapia de primeira linha para o controle de doenças alérgicas, incluindo DA, rinite alérgica e asma. Seus efeitos benéficos estão relacionados a uma ampla ação antiinflamatória, incluindo uma diminuição da infiltração celular nos tecidos. A atividade anti-inflamatória e imunossupressora dos corticosteroides é atribuída à repressão dos genes pró-inflamatórios por meio da transdução de sinal por seu receptor de glicocorticoides (Cruz-Topete, Cidlowski, 2014). Porém, é importante ressaltar que um dos grandes desafios do uso de corticosteroides está relacionado aos seus efeitos adversos graves, incluindo atrofia cutânea, supressão do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, hiperglicemia, osteoporose, etc. (Coutinho, Chapman, 2011); corroborando a necessidade de melhores tratamentos que possam melhorar a qualidade de vida dos pacientes com DA.

Muitos estudos fornecem evidências sobre o papel do H<sub>2</sub>S na fisiologia e fisiopatologia da pele (para revisão, vide Coavoy-Sánchez et al., 2020). A expressão das enzimas responsáveis pela produção endógena de  $H_2S$  na pele foi reportada em algumas pesquisas. Estudos de Liu et al. (2014b) detectaram a expressão da enzima CSE em tecido cutâneo humano por análise de Western blot e observaram que essa expressão se encontrava diminuída em úlceras de pé de pacientes portadores de diabetes. Por sua vez, Kutz et al. (2015) e Greaney et al. (2017) reportaram que as enzimas CSE e 3MST são expressas em homogenatos de tecido cutâneo e na microvasculatura cutânea humana. De forma semelhante, no nosso trabalho a expressão proteica das enzimas CSE e 3MST (mas não CBS) foi confirmada por análise de Western blot em homogenatos de pele de camundongos BALB/c, e as bandas imunorreativas mostraram pesos moleculares similares aos reportados na literatura (~43 kDa para CSE e ~28 kDa para 3MST). Além disso, algumas publicações revelam uma associação entre a produção endógena de H<sub>2</sub>S e doenças e condições da pele ou outras doenças atópicas. Alshorafa et al. (2012) declararam que a psoríase, uma doença inflamatória crônica da pele, está associada a baixas concentrações séricas de H<sub>2</sub>S. Pesquisas do nosso grupo demonstraram que os níveis de H<sub>2</sub>S endógeno se encontram diminuídos na pele de camundongos com psoríase experimental (Rodrigues, 2018), e que a inibição da síntese endógena de H<sub>2</sub>S, maximizou o prurido induzido pelo composto 48/80 (Rodrigues et al., 2017). Em pacientes com asma, Wu et al. (2008) reportaram que os níveis séricos de H<sub>2</sub>S se mostram significativamente reduzidos. No entanto, um estudo recente de Moniaga et al. (2020) observou que pacientes com DA apresentam concentrações elevadas de H<sub>2</sub>S sérico e expressão aumentada das enzimas CSE, CBS e 3MST medidas por imunofluorescência. No presente trabalho analisamos a produção de H<sub>2</sub>S pelo método do sulfeto de chumbo, bem como a expressão proteica das enzimas geradoras de H<sub>2</sub>S (CSE, CBS e 3MST) por Western blot, em homogenatos de pele do dorso de camundongos com DA experimental. Os resultados mostram uma diminuição tanto da capacidade de produção de H<sub>2</sub>S, quanto da expressão proteica da enzima 3MST na pele dos camundongos com DA experimental, o que pode indicar que o H<sub>2</sub>S tem um papel protetor na patogênese da DA, destacando a importância de uma suplementação exógena com doadores de H<sub>2</sub>S.

Várias linhas de pesquisa sugerem o uso do H<sub>2</sub>S exógeno em forma de doadores de H<sub>2</sub>S, para tratamento de uma variedade de condições e doenças dermatológicas principalmente como, anti-inflamatório, antipruriginoso, cicatrizante, pró-angiogênico, imunomodulador, dentre outros (para revisão, vide Coavoy-Sánchez et al., 2020). O H<sub>2</sub>S também tem sido explorado para uso no projeto de novos derivados de AINES (moléculas híbridas), que reduzem a inflamação tão eficazmente quanto o fármaco original, porem exibem poucos efeitos prejudiciais no trato gastrintestinal (Wallace et al., 2007, 2010; Ekundi-Valentim et al., 2013). Portanto formulamos a hipótese de que moléculas híbridas de corticosteroides com doadores de H<sub>2</sub>S representam uma alternativa terapêutica promissora para o controle da DA, seja potencializando o efeito farmacológico ou reduzindo a incidência de efeitos adversos do fármaco original. Adicionalmente, doadores de H<sub>2</sub>S direcionados às mitocôndrias podem ter um beneficio consistente no controle dos sintomas de DA, uma vez que níveis elevados de ROS e disfunção mitocondrial foram observados em uma variedade de doenças alérgicas, incluindo a DA.

Para elucidar o beneficio potencial do H<sub>2</sub>S no desenvolvimento e sinais clínicos da DA induzida em camundongos, neste trabalho foram administrados os doadores de H<sub>2</sub>S (doadores híbridos, as respectivas porções liberadoras ou doadores mitocondriais), por via tópica, diariamente durante 5 dias consecutivos a partir do dia 19 após a primeira sensibilização com DNCB. Na primeira parte do trabalho, foram comparados os efeitos da dexametasona com os derivados liberadores de H<sub>2</sub>S (doadores híbridos), dexametasona-TBZ e dexametasona-ADT, e suas respectivas

porções liberadoras, 4-hidroxi-tiobenzamida (TBZ) e anetol ditioletiona (ADT-OH). A segunda parte do trabalho compreende a avaliação dos efeitos do tratamento com os doadores de H<sub>2</sub>S de ação mitocondrial AP39 e RT01.

No presente estudo, inicialmente avaliamos o prurido, o escore de lesão cutânea e o edema de orelha nos camundongos com DA experimental. O tratamento tópico com Dexa-TBZ (nas doses de 62,5, 125, 250 ou 500 nmol/animal) ou Dexa-ADT (250 nmol/animal) resultou em reduções significativas do prurido, dos escores de lesão cutânea e do edema de orelha induzidos pela aplicação repetida de DNCB. O tratamento com Dexa exibiu efeitos semelhantes em cada caso, com exceção do escore de gravidade das lesões na dose de 500 nmol/animal, onde o tratamento com Dexa-TBZ foi significativamente mais eficaz que a dexametasona, com 28,5% de redução vs. 10,2% (P <0,05). Entretanto, a administração das porções liberadoras de H<sub>2</sub>S, TBZ ou ADT-OH na dose de 1  $\mu$ mol/animal (isto é, o dobro da dose mais alta administrada de Dexa-TBZ) não resultou em qualquer redução significativa do prurido, do escore de lesão cutânea ou do edema de orelha. Estes resultados sugerem que a presença das porções liberadoras de H<sub>2</sub>S (TBZ e ADT-OH) na molécula da dexametasona, não interferem significativamente com os efeitos benéficos deste corticosteroide.

Com relação à avaliação dos efeitos dos doadores mitocondriais AP39 e RT01 sobre o prurido, escore de lesão cutânea e edema de orelha, o doador AP39 (nas doses de 0,1 e 0,2 nmol/animal) demonstrou ser efetivo na redução do prurido espontâneo e do escore de lesão cutânea, e a dose de 0,2 nmol/animal também reduziu o edema de orelha, por sua vez, o doador RT01 (0,2 nmol/animal) unicamente foi efetivo na redução do escore de lesão cutânea. Todos estes resultados são consistentes com descobertas prévias do nosso laboratório, que mostram que o tratamento com H<sub>2</sub>S exógeno (Na<sub>2</sub>S e reagente de Lawesson) em camundongos reduz o prurido induzido pela injeção intradérmica de histamina ou do composto 48/80, e este efeito está mediado, em parte, pela estabilização dos mastócitos (Rodrigues et al., 2017). Por outro lado, os doadores de H<sub>2</sub>S, NaHS e GYY4137 são também capazes de reduzir o prurido secundário à ativação dos receptores PAR-2 (independente de histamina), atuando através da abertura dos canais K<sub>ATP</sub> e envolvendo a participação do NO endógeno de forma independente de GMPc (Coavoy-Sánchez et al., 2016). Resultados ainda não publicados do nosso grupo mostram que o tratamento tanto sistêmico quanto tópico com GYY4137 reduz a inflamação cutânea e o prurido em um modelo de psoríase experimental induzido pelo quimioterápico imiquimode em camundongos (Schmidt et al., 2015; Rodrigues, 2018). Assim, com base nos dados acima mencionados, o efeito antipruriginoso do H<sub>2</sub>S possivelmente seja resultado da sua ação direta sobre as fibras sensoriais, bem como a inibição da degranulação de mastócitos, que são os iniciadores primários de processos alérgicos.

A eosinofilia sanguínea e tecidual é uma característica comum da DA humana e parece correlacionar-se diretamente com a atividade da doença (Liu et al., 2011). Em doenças alérgicas a ativação e diferenciação dos eosinófilos é induzida principalmente pelo fator de estimulação de colônias de granulócitos/macrófagos (GM-CSF) e pelas citocinas IL-3 e IL-5, e a migração dos eosinófilos para o tecido inflamado esta relacionada às quimiocinas eotaxinas (eotaxina-1, eotaxina-2 e eotaxina-3), que estão aumentadas na DA (Simon et al., 2004). No presente trabalho, o número elevado de eosinófilos no sangue de camundongos com DA experimental foi inibido completamente pelo tratamento tópico com todas as doses testadas de Dexa, Dexa-TBZ ou Dexa-ADT, exibindo valores abaixo dos observados nos animais controle (sem DA). Notavelmente, estes resultados são consistentes com a atividade imunossupressora conhecida da dexametasona e outros corticosteroides, que reduzem drasticamente o número de linfócitos, monócitos e eosinófilos em sangue por indução direta de apoptose (Druilhe et al., 2003). Da mesma forma, o tratamento tópico com as frações TBZ ou ADT-OH ou com os doadores de ação mitocondrial AP39 e RT01, diminuiu significativamente a eosinofilia sanguínea induzida por DNCB. Efeitos inibitórios de eosinofilia por parte de doadores de H<sub>2</sub>S também foram relatados na literatura, estudos em modelos animais de asma alérgica tem mostrado que o tratamento com o doador NaHS diminuiu significativamente o número de eosinófilos no lavado broncoalveolar (Chen et al., 2009; Benetti et al., 2013; Zhang et al., 2013), e o influxo de eosinófilos em parênquima pulmonar, induzidos por ovalbumina (Campos et al., 2016).

Por outro lado, no que se refere à avaliação dos níveis de eotaxina-1, neste estudo foram detectados níveis elevados de eotaxina-1 em pele de camundongos com DA experimental. A eotaxina-1 é uma das quimiocinas mais importantes envolvidas na inflamação do tecido e desempenha um papel central na patogênese da DA, assim como em muitas outras doenças alérgicas (Liu et al., 2011). O antagonismo da eotaxina-1 foi estudado como uma opção terapêutica seletiva para a

DA (Amerio et al., 2005). Foi descrito na literatura que a dexametasona regula diferencialmente à eotaxina-1, dependendo da duração de exposição, a dexametasona pode inibir (dentro de 24 horas) ou aumentar (de 48 a 72 horas) a expressão e produção de eotaxina-1 induzida por IL-4 em fibroblastos de pulmão humano (Suzuki et al., 2008). Porém, nossos resultados não revelaram qualquer alteração nos níveis de eotaxina-1 em resposta aos tratamentos com Dexa, Dexa-TBZ ou Dexa-ADT, nem com as frações TBZ ou ADT-OH. Em contrate, o tratamento com o doador mitocondrial AP39 reduziu a produção de eotaxina-1 nas lesões de pele de camundongos com DA, sugerindo uma inibição da infiltração de eosinófilos no tecido. Entretanto, estudos adicionais são necessários para confirmar esta hipótese. Estudos que relacionam o H<sub>2</sub>S com a eotaxina-1 também foram publicados, Zhang et al. (2013) indicam que a administração de NaHS reduziu significativamente os níveis das citocinas inflamatórias Th2 e da eotaxina-1 no lavado broncoalveolar num modelo de asma em camundongo sensibilizado com ovalbumina. Naturalmente, o papel regulador do H<sub>2</sub>S na inflamação é complexo e os efeitos benéficos provavelmente envolvem vários mecanismos, além da inibição da migração dos eosinófilos para os tecidos inflamados.

Os níveis séricos elevados de IgE são uma característica imunológica da DA e a IgE é liberada em resposta a vários alérgenos. As células Th2 produzem IL-4 e IL-13, que são citocinas envolvidas na produção excessiva de IgE, subsequentemente a IgE se liga a alérgenos e mastócitos para induzir a degranulação dos mastócitos e a liberação de mediadores inflamatórios (Frew, 2010; Gandhi et al., 2016). No presente estudo, o incremento dos níveis plasmáticos de IgE total em camundongos com DA experimental, não foi reduzido pelo tratamento tópico com Dexa, Dexa-TBZ, Dexa-ADT, TBZ ou ADT-OH, nem com os doadores de ação mitocondrial AP39 ou RT01. Consistente com nossos resultados, Roviezzo et al. (2015) reportaram que a administração por aerossol do doador NaHS (100 ppm) diariamente por 2 semanas em camundongos com asma alérgica crônica, não influenciou os níveis plasmáticos de IgE. No entanto, Han et al. (2016) em um modelo animal de rinite alérgica mostraram que o tratamento oral por 10 dias consecutivos com o doador NaHS em doses elevadas (1 mg/kg) reduz significativamente a IgE total sérica. Considerando estes reportes, e analisando os resultados obtidos no presente trabalho, pode-se deduzir que a ausência de efeito com o tratamento os diferentes doadores de H<sub>2</sub>S nos níveis plasmáticos de IgE, pode ser consequência de baixas concentrações das

drogas administradas ou tempos curtos de tratamento. Interessantemente, os níveis elevados da IL-4 nas lesões da pele dorsal de camundongos com DA experimental, foram significativamente reduzidos pelo tratamento com Dexa-TBZ ou Dexa-ADT, mas não com Dexa, que ainda mostrou valores acima do observado no grupo DNCB. Sabe-se que os corticosteroides suprimem a síntese de citocinas derivadas de Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13), que são necessárias para a produção de IgE, o que contribui para sua eficácia no controle de doenças alérgicas. Curiosamente, os corticosteroides também podem inclinar a balança para a predominância de células Th2 por um efeito que pode ser devido à supressão de interferon (IFN)-y, que normalmente inibe a diferenciação de Th2 (Agarwal, Marshall, 2001; Barnes, 2001). Nesse sentido, as moléculas híbridas evitaram este efeito prejudicial da dexametasona. Além disso, o tratamento com as porções liberadoras TBZ e ADT-OH, e os doadores mitocondriais AP39 e RT01 também resultou em reduções significativas dos níveis de IL-4. Notavelmente, este resultado é consistente com a capacidade conhecida do  $H_2S$  de atenuar a produção de citocinas Th2 (Zhang et al., 2013; Cao et al., 2014).

De forma contrária com informação da literatura, nosso modelo de DA não promoveu aumento nos níveis das citocinas IL-5 e IL-13, ao contrário, estas citocinas estavam diminuídas em camundongos sensibilizados e desafiados com DNCB quando comparados com o grupo veículo. Não se sabe ainda qual é a origem destes dados contraditórios, visto que a eosinofilia, níveis aumentados de IgE plasmática, bem como níveis aumentados de IL-4 e eotaxina-1 em pele, todos associados à resposta Th2, estavam presentes em nosso modelo. Todavia, estudos adicionais se fazem necessários para elucidar esta questão.

Em continuidade ao estudo, foram analisados os efeitos dos doadores de H<sub>2</sub>S na produção endógena de H<sub>2</sub>S em pele de camundongos com DA experimental. De forma interessante, o tratamento com Dexa-TBZ, mas não com Dexa-ADT ou Dexa, nem com as frações TZB ou ADT-OH, induziu a produção endógena de H<sub>2</sub>S em pele de camundongos com DA, revertendo os valores previamente diminuídos pela aplicação de DNCB. Este efeito poderia estar relacionado com um aumento da expressão das enzimas geradoras de H<sub>2</sub>S por parte do H<sub>2</sub>S exógeno, tal como observado por Wu et al. (2017), que relatam que o tratamento com NaHS aumentou a expressão das enzimas CSE e CBS em tecido do coração, fígado e rins, em um modelo de envelhecimento acelerado induzido por D-galactose em camundongos.

Entretanto, são necessários estudos de expressão proteica em pele das enzimas CSE e 3MST nos grupos tratados com Dexa, Dexa-TBZ e Dexa-ADT, para confirmar esta hipótese.

Com o propósito de avaliar o envolvimento do estresse oxidativo na fisiopatologia da DA e nos possíveis mecanismos farmacológicos dos doadores de H<sub>2</sub>S, foram determinadas a atividade das enzimas antioxidantes, assim como a expressão de marcadores de estresse oxidativo (resíduos proteicos de nitrotirosina e proteínas carboniladas) na pele dos camundongos. A inflamação crônica da pele está associada à superprodução de ROS, como anion superóxido (O2<sup>-</sup>) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). O acúmulo de ROS eventualmente excede a capacidade de defesa do sistema antioxidante, essa condição, definida como estresse oxidativo, desempenha um importante papel patogenético na DA humana (Bertino et al., 2020). O estado de estresse oxidativo/nitrosativo provoca alterações nos componentes celulares, como lipídios, proteínas e DNA. Por exemplo, o peroxinitrito, um potente agente nitrante e oxidante pode reagir com a tirosina das proteínas para formar nitrotirosina (Pacher et al., 2007), que é identificada como um marcador de dano celular. Há evidências de níveis aumentados de marcadores de estresse oxidativo, bem como de deficiências no sistema antioxidante na DA humana, o que contribui para a patogênese dessa doença. Por exemplo, Omata et al. (2001) reportam que níveis de marcadores urinários de estresse oxidativo são mais altos em crianças com DA do que em crianças sem DA. Chung et al. (2009) mostram que a capacidade antioxidante do sangue é significativamente menor em crianças com DA em comparação com o grupo controle. Mais recentemente, Sivaranjani et al. (2013) revelam que, em comparação com o grupo controle, os pacientes com AD tem níveis mais baixos de defesas antioxidantes, incluindo as enzimas SOD, catalase, GPx e Vitaminas A, E e C. De fato, no presente estudo, descobrimos que as atividades das enzimas SOD, catalase e GST se encontram significativamente reduzidas em pele de camundongos com DA experimental. Além disso, a indução da DA experimental também causou aumentos significativos dos níveis de nitração e carbonilação de proteínas em pele.

Por outro lado, é de conhecimento que o H<sub>2</sub>S tem capacidade antioxidante e citoproterora em sistemas fisiológicos expostos a ROS e RNS. O H<sub>2</sub>S exerce seus efeitos antioxidantes por meio de vários mecanismos, incluindo extinção direta de ROS, modulação da expressão e da atividade de GSH e tioredoxina, ou aumento da

síntese de proteínas antioxidantes por ativação do fator de transcrição Nrf2 (Corsello et al., 2018; Bełtowski, 2019; Murphy et al., 2019). Além disso, o Nrf2 está associado à função de barreira epidérmica para proteção contra danos oxidativos (Schäfer et al., 2012). No presente estudo, o doador híbrido Dexa-TBZ na dose de 250 nmol/animal, aumentou significativamente a atividade da enzima GPx em pele dos animais com DA experimental, este aumento foi significativamente diferente (22,3%; P<0,05) da dexametasona, que não mostrou qualquer alteração. A enzima GPx é uma enzima eliminadora de peróxidos, importante para proteger do estresse oxidativo. Nesse contexto, este resultado implica que a presença da porção liberadora de H<sub>2</sub>S, TBZ na molécula de dexametasona aumenta a capacidade de eliminação de ROS em pele, bloqueando os efeitos nocivos da oxidação. Ademais, o tratamento com os doadores híbridos, Dexa-TBZ ou Dexa-ADT, mas não com dexametasona, também foi capaz de prevenir a nitração e a carbonilação de proteínas em tecidos de pele. Estes resultados mostram que a adição da porção liberadora de H<sub>2</sub>S, TBZ ou ADT-OH na molécula de dexametasona, é capaz de estimular as defesas antioxidantes e diminuir os níveis de ROS e RNS, o que resulta em maior proteção contra os danos causados pelo estresse oxidativo. Além disso, o tratamento tópico com o doador específico para mitocôndria AP39 também mostrou proteção contra o estresse oxidativo ao prevenir a carbonilação de proteínas em pele de camundongos com DA. Consistente com nossos resultados, alguns estudos já provaram que doadores de H<sub>2</sub>S têm efeito antioxidante potente em modelos de dermatites e doenças atópicas. Por exemplo, Wu et al. (2019), observaram que o sulforafano (um composto que contém enxofre) aliviou os sintomas da DA induzida por DNCB em camundongos, através da ativação do fator Nrf2 e da supressão da sinalização JAK1/STAT3. Em um modelo de asma alérgica em camundongos, Benetti et al. (2013) demonstram que o tratamento com NaHS é capaz de prevenir a inflamação alérgica pulmonar através do aumento da expressão de enzimas SOD, GR e GPx.

Curiosamente, enquanto que as porções liberadoras de H<sub>2</sub>S, TBZ ou ADT-OH não alteraram os valores de produção endógena de H<sub>2</sub>S, a atividade de GPx e o conteúdo de nitrotirosina e proteínas carboniladas, o tratamento com os doadores híbridos sim alteraram estes parâmetros, Dexa-TBZ aumentou a produção endógena de H<sub>2</sub>S e a atividade da GPx e ambos Dexa-TBZ e Dexa-ADT diminuíram a expressão de nitrotirosina e proteínas carboniladas em pele. A explicação para este achado pode estar nos diferentes níveis de liberação de H<sub>2</sub>S a partir de TBZ ou ADT-OH versus Dexa-TBZ ou Dexa-ADT. Por exemplo, a liberação de H<sub>2</sub>S a partir do doador híbrido ATB-346 (naproxeno conjugado com TBZ) incubado em homogenatos de fígado de rato foi seis vezes maior do que TBZ a uma concentração equimolar (Wallace et al., 2010). Resultados semelhantes foram relatados com o doador híbrido ATB-429 (mesalamina conjugado com ADT-OH), onde a quantidade de H<sub>2</sub>S liberada por este composto foi significativamente maior do que aquela liberada por ADT-OH sozinho (Distrutti et al., 2006b). Assim, esses dados suportam a hipótese de que os efeitos benéficos adicionais da Dexa-TBZ e Dexa-ADT são devidos à sua capacidade de gerar H<sub>2</sub>S, bem como estimular a produção de H<sub>2</sub>S por vias enzimáticas.

Embora a esplenomegalia não seja um sinal clínico associado à DA em humanos, estudos em animais de experimentação demonstraram essa alteração como resultado da aplicação repetida de DNCB (Jung et al., 2015; Kim et al., 2017; Ku et al., 2017). No presente trabalho, os camundongos com DA experimental desenvolveram esplenomegalia com número de esplenócitos totais elevado, e esta resposta foi completamente inibida pelo tratamento tópico com as diferentes doses de Dexa, Dexa-TBZ e Dexa-ADT. De fato, já foi relatado que em animais de experimentação os corticosteroides (como a dexametasona) exercem efeitos inibitórios sobre órgãos linfoides, tais como timo e baço, e estes efeitos imunossupressores são considerados deletérios, o qual é provavelmente causado por um aumento da taxa de apoptose de timócitos e esplenócitos (Rooman et al., 1999). Ainda, o tratamento com a porção liberadora ADT-OH e com o doador mitocondrial AP39 também reduziu a esplenomegalia induzida por DNCB em camundongos.

Outros efeitos colaterais dos corticosteroides são o aumento dos níveis de glicose no sangue e elevação dos níveis de enzimas hepáticas (ALT e AST). Os corticosteroides podem interferir no metabolismo de glicose, pois inibem a captação periférica de glicose pelo músculo e tecido adiposo, antagonizando a resposta à insulina. Além disso, aumentam a gliconeogenêse no fígado, contribuindo para o estado de hiperglicemia, o que pode resultar em risco aumentado em pacientes portadores de diabetes (Kuo et al., 2015). No presente trabalho, um aumento significativo da glicemia foi observado com o tratamento com dexametasona (250 µmol/animal) em comparação com o grupo veiculo, enquanto que o tratamento com

as doses equimolares de Dexa-TBZ ou Dexa-ADT teve um efeito preservador, impedindo o incremento da glicose no sangue. Dados da literatura demonstram que o H<sub>2</sub>S contribui diretamente para a manutenção homeostática dos níveis de glicose em sangue (Piragine, Calderone, 2020). A regulação do metabolismo da glicose promovida pelo H<sub>2</sub>S é complexa e ocorre em vários níveis, desde a produção/liberação de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas até a resposta de órgãos-alvo (como fígado, músculo esquelético e tecido adiposo) à insulina (Xue et al., 2013; Cai et al., 2016; Pichette et al., 2017; Takahashi et al., 2017; Guo et al., 2019). Assim, o efeito preventivo da Dexa-TBZ e Dexa-ADT no aumento da glicose em sangue, sugere que estes novos compostos podem exibir um melhor perfil para seu uso em pacientes portadores de diabetes do que os corticosteroides convencionais.

Adicionalmente, no presente estudo foi observado um aumento dos níveis das enzimas hepáticas (ALT e AST) em plasma dos animais com DA experimental e um incremento ainda mais pronunciado em animais tratados com dexametasona, indicando um dano hepático, este efeito não foi diferente do observado nos animais tratados com os doadores híbridos Dexa-TBZ ou Dexa-ADT. No entanto, as respectivas porções liberadoras, TBZ e ADT-OH foram capazes de atenuar completamente o aumento dos níveis de ALT retornando aos valores normais observados no grupo de animais tratados com veiculo. De fato, um estudo conduzido por Wei et al. (2017) demonstra que o conteúdo de H<sub>2</sub>S em plasma está negativamente correlacionado com os níveis de das enzimas hepáticas ALT e AST, sugerindo que H<sub>2</sub>S pode proteger a função hepática.

Por fim, considerando todos os dados acima descritos (resumidos nas Tabelas 4 e 5), a seguir, comparamos resumidamente os efeitos dos diferentes tratamentos.

Ambos os doadores híbridos Dexa-TBZ e Dexa-ADT (na dose de 250 nmol/animal) exibiram efeitos comparáveis à dose equimolar de dexametasona na redução do comportamento de coçar, escore de lesões cutâneas, edema de orelha, eosinofilia e esplenomegalia induzidas por DNCB. Adicionalmente, em contraste com a dexametasona, ambos os doadores Dexa-TBZ e a Dexa-ADT mostraram um efeito preservador, evitando o aumento de IL-4 e dos marcadores de estresse oxidativo (nitrotirosina e proteinas carboniladas). Ainda, a Dexa-TBZ, mas não Dexa-ADT, também promoveu um aumento na produção endógena de H<sub>2</sub>S e na atividade da GPx. Este efeito aditivo da Dexa-TBZ nos sugere que este composto poderia gerar

H<sub>2</sub>S tanto por atividades não enzimáticas como enzimáticas (induzindo a expressão das enzimas geradoras de H<sub>2</sub>S). Além disso, enquanto que a dexametasona induziu hiperglicemia, ambos os doadores híbridos Dexa-TBZ e Dexa-ADT preveniram este efeito adverso.

No que concerne às frações liberadoras de H<sub>2</sub>S, TBZ e ADT-OH, sabe-se que a fração TBZ possui um único átomo de enxofre, portanto pode liberar uma molécula de H<sub>2</sub>S por composto doador, enquanto que ADT-OH contem três átomos de enxofre e seria capaz de liberar mais H<sub>2</sub>S, em diferentes etapas (Gerő et al., 2016). Curiosamente, ambas a frações liberadoras de H<sub>2</sub>S, TBZ e ADT-OH tiveram efeitos comparáveis entre si, inibindo a eosinofilia, reduzindo o aumento de IL-4 e prevenindo os níveis elevados de ALT, de uma maneira semelhante.

Por outro lado, o doador AP39 na dose de 0,2 nmol/animal, foi mais eficaz do que o RT01 (dose equimolar) e do que AP39 (0,1 nmol/animal) no controle dos sinais clínicos da DA experimental, inibindo o comportamento de coçar, escore de lesão cutânea, edema de orelha, eosinofilia e a esplenomegalia induzidos por DNCB. Ambos os compostos reduziram significativamente os níveis de IL-4 de maneira semelhante. Entretanto que AP39, mas não RT01, diminuiu a produção de eotaxina-1 e a expressão de proteínas carboniladas. Foi descrito que, o doador de ação mitocondrial AP39, foi gerado ligando ADT-OH a uma molécula de direcionamento mitocondrial trifenilfosfônio, este direcionamento pode resultar em um acúmulo de 500 vezes da droga na mitocôndria (Gerő et al., 2016), isso explicaria o efeito melhorado do AP39 em comparação com ADT-OH. Por outro lado, o doador RT01 é um análogo de AP39 desprovido de um átomo de enxofre, portanto, RT01 libera H<sub>2</sub>S em uma taxa mais lenta e por um período de tempo mais curto do que o AP39 (Waters et al., 2017), que foi evidenciado pela ausência de efeito sobre muitos parâmetros avaliados no presente estudo.

### 5 CONCLUSÕES

Conclui-se que:

- a) A presença das porções liberadoras de H<sub>2</sub>S (TBZ ou ADT-OH) na molécula da dexametasona, não interfere com os efeitos benéficos deste corticoide, e apresenta um avanço sobre a molécula parental, podendo estimular a atividade das defesas antioxidantes no tratamento da DA e prevenir a hiperglicemia associada ao uso de corticosteroides. Sugerindo que essa associação possui um grande potencial terapêutico para ser empregado na prática clínica.
- b) A entrega específica de H<sub>2</sub>S na mitocôndria por meio do doador AP39, pode suprimir os sinais clínicos da DA induzida por DNCB em camundongos através da modulação imunológica e manutenção do equilíbrio redox, e pode ser um potencial opção terapêutica para o tratamento de pacientes com DA.

## **REFERÊNCIAS**<sup>\*</sup>

Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. J Neurosci. 1996 Feb 1;16(3):1066–71.

Agarwal SK, Marshall JD. Dexamethasone promotes type 2 cytokine production primarily through inhibition of type 1 cytokines. J Interf Cytokine Res. 2001;21(3):147–55.

Ahn K. The role of air pollutants in atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 2014 Nov;134(5):993–9; discussion 1000.

Alshorafa AKH, Guo Q, Zeng F, Chen M, Tan G, Tang Z, et al. Psoriasis is associated with low serum levels of hydrogen sulfide, a potential anti-inflammatory molecule. Tohoku J Exp Med. 2012;228(4):325–32.

Alves NO, da Silva GT, Weber DM, Luchese C, Wilhelm EA, Fajardo AR. Chitosan/poly(vinyl alcohol)/bovine bone powder biocomposites: A potential biomaterial for the treatment of atopic dermatitis-like skin lesions. Carbohydr Polym. 2016 Sep 5;148:115–24.

Amerio P, Frezzolini A, Feliciani C, Verdolini R, Teofoli P, Pità O, et al. Eotaxins and CCR3 Receptor in Inflammatory and Allergic Skin Diseases: Therapeutical Implications. Curr Drug Target -Inflammation Allergy. 2005 Mar 25;2(1):81–94.

Arkwright PD, Stafford JC, Sharma V. Atopic dermatitis in children. J allergy Clin Immunol Pract. 2014 Jul;2(4):388–95.

Barnes PJ. Corticosteroids, IgE, and atopy. Vol. 107, Journal of Clinical Investigation. The American Society for Clinical Investigation; 2001. p. 265–6.

Bełtowski J. Synthesis, metabolism, and signaling mechanisms of hydrogen sulfide: An overview. In: Methods in Molecular Biology. Humana Press Inc.; 2019. p. 1–8.

Benetti LR, Campos D, Gurgueira SA, Vercesi AE, Guedes CEV, Santos KL, et al. Hydrogen sulfide inhibits oxidative stress in lungs from allergic mice in vivo. Eur J Pharmacol. 2013 Jan 5;698(1–3):463–9.

Bertino L, Guarneri F, Cannavò SP, Casciaro M, Pioggia G, Gangemi S. Oxidative stress and atopic dermatitis. Vol. 9, Antioxidants. MDPI AG; 2020.

Blome C, Radtke MA, Eissing L, Augustin M. Quality of Life in Patients with Atopic Dermatitis: Disease Burden, Measurement, and Treatment Benefit. Vol. 17, American Journal of Clinical Dermatology. Springer International Publishing; 2016. p. 163–9.

Boniface K, Bernard F-X, Garcia M, Gurney AL, Lecron J-C, Morel F. IL-22 inhibits

<sup>\*</sup> De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [Cited 2011 Jul 15]. Available from: http://www.icmje.org

epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. J Immunol. 2005 Mar 15;174(6):3695–702.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976 May 7;72:248–54.

Brandt EB. Th2 Cytokines and Atopic Dermatitis. J Clin Cell Immunol. 2011;02(03).

Brown SJ, McLean WHI. One remarkable molecule: Filaggrin. Vol. 132, Journal of Investigative Dermatology. Nature Publishing Group; 2012. p. 751–62.

Cabanillas B, Novak N. Atopic dermatitis and filaggrin. Vol. 42, Current Opinion in Immunology. Elsevier Ltd; 2016. p. 1–8.

Cai J, Shi X, Wang H, Fan J, Feng Y, Lin X, et al. Cystathionine γ lyase-hydrogen sulfide increases peroxisome proliferator-activated receptor γ activity by sulfhydration at C139 site thereby promoting glucose uptake and lipid storage in adipocytes. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids. 2016 May 1;1861(5):419–29.

Campion M, Smith L, Gatault S, Métais C, Buddenkotte J, Steinhoff M. Interleukin-4 and interleukin-13 evoke scratching behaviour in mice. Vol. 28, Experimental Dermatology. Blackwell Publishing Ltd; 2019. p. 1501–4.

Campos D, Ravagnani FG, Gurgueira SA, Vercesi AE, Teixeira SA, Costa SKP, et al. Increased glutathione levels contribute to the beneficial effects of hydrogen sulfide and inducible nitric oxide inhibition in allergic lung inflammation. Int Immunopharmacol. 2016 Oct;39:57–62.

Cao H, Zhou X, Zhang J, Huang X, Zhai Y, Zhang X, et al. Hydrogen sulfide protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats by inhibiting NF-κB expression and regulating Th1/Th2 balance. Toxicol Lett. 2014 Jan 30;224(3):387–94.

Cao X, Ding L, Xie ZZ, Yang Y, Whiteman M, Moore PK, et al. A Review of Hydrogen Sulfide Synthesis, Metabolism, and Measurement: Is Modulation of Hydrogen Sulfide a Novel Therapeutic for Cancer? Vol. 31, Antioxidants and Redox Signaling. Mary Ann Liebert Inc.; 2019. p. 1.

Carbajo JM, Maraver F. Sulphurous Mineral Waters: New Applications for Health. Evidence-Based Complement Altern Med. 2017;2017:1–11.

Carlberg I, Mannervik B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. J Biol Chem. 1975;250(14):5475–80.

Cevikbas F, Wang X, Akiyama T, Kempkes C, Savinko T, Antal A, et al. A sensory neuron–expressed IL-31 receptor mediates T helper cell–dependent itch: Involvement of TRPV1 and TRPA1. J Allergy Clin Immunol. 2014 Feb;133(2):448-460.e7.

Chan C-C, Liou C-J, Xu P-Y, Shen J-J, Kuo M-L, Len W-B, et al. Effect of

dehydroepiandrosterone on atopic dermatitis-like skin lesions induced by 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in mouse. J Dermatol Sci. 2013 Nov;72(2):149–57.

Chen KY, Morris JC. Kinetics of Oxidation of Aqueous Sulfide by O2. Environ Sci Technol. 1972 Jun 1;6(6):529–37.

Chen X, Jhee K-H, Kruger WD. Production of the neuromodulator H2S by cystathionine beta-synthase via the condensation of cysteine and homocysteine. J Biol Chem. 2004 Dec 10;279(50):52082–6.

Chen Y-H, Wu R, Geng B, Qi Y-F, Wang P-P, Yao W-Z, et al. Endogenous hydrogen sulfide reduces airway inflammation and remodeling in a rat model of asthma. Cytokine. 2009 Feb;45(2):117–23.

Chiku T, Padovani D, Zhu W, Singh S, Vitvitsky V, Banerjee R. H  $_2$  S Biogenesis by Human Cystathionine  $\gamma$ -Lyase Leads to the Novel Sulfur Metabolites Lanthionine and Homolanthionine and Is Responsive to the Grade of Hyperhomocysteinemia. J Biol Chem. 2009 Apr 24;284(17):11601–12.

Chung J, Oh S-Y, Shin Y-K. Association of glutathione-S-transferase polymorphisms with atopic dermatitis risk in preschool age children. Clin Chem Lab Med. 2009 Jan 1;47(12):1475–81.

De Cicco P, Panza E, Armogida C, Ercolano G, Taglialatela-Scafati O, Shokoohinia Y, et al. The Hydrogen Sulfide Releasing Molecule Acetyl Deacylasadisulfide Inhibits Metastatic Melanoma. Front Pharmacol. 2017 Feb 27;8:65.

De Cicco P, Panza E, Ercolano G, Armogida C, Sessa G, Pirozzi G, et al. ATB-346, a novel hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drug, induces apoptosis of human melanoma cells and inhibits melanoma development in vivo. Pharmacol Res. 2016 Dec;114:67–73.

Cid BJ, Perez-Mateluna G, Iturriaga C, Zambrano MJ, Vives MI, Valenzuela PM, et al. Is there an association between indoor allergens and the severity of atopic dermatitis? Int J Dermatol. 2019 Apr 1;58(4):433–9.

Coavoy-Sánchez SA, Costa SKP, Muscará MN. Hydrogen sulfide and dermatological diseases. Br J Pharmacol. 2020 Feb 1;177(4):857–65.

Coavoy-Sánchez SA, Rodrigues L, Teixeira SA, Soares AG, Torregrossa R, Wood ME, et al. Hydrogen sulfide donors alleviate itch secondary to the activation of type-2 protease activated receptors (PAR-2) in mice. Pharmacol Res. 2016 Nov 1;113:686–94.

Corsello T, Komaravelli N, Casola A. Role of hydrogen sulfide in nrf2-and sirtuindependent maintenance of cellular redox balance. Vol. 7, Antioxidants. MDPI AG; 2018.

Costa SKPF, Muscara MN, Allain T, Dallazen J, Gonzaga L, Buret AG, et al. Enhanced Analgesic Effects and Gastrointestinal Safety of a Novel, Hydrogen Sulfide-Releasing Anti-Inflammatory Drug (ATB-352): A Role for Endogenous Cannabinoids. Antioxid Redox Signal. 2020 Mar 13;

Coutinho AE, Chapman KE. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. Vol. 335, Molecular and Cellular Endocrinology. Elsevier; 2011. p. 2–13.

Cruz-Topete D, Cidlowski JA. One hormone, two actions: Anti- And pro-inflammatory effects of glucocorticoids. Neuroimmunomodulation. 2014 Nov 7;22(1–2):20–32.

Danby SG, Brown K, Wigley AM, Chittock J, Pyae PK, Flohr C, et al. The Effect of Water Hardness on Surfactant Deposition after Washing and Subsequent Skin Irritation in Atopic Dermatitis Patients and Healthy Control Subjects. J Invest Dermatol. 2018 Jan 1;138(1):68–77.

Darsow U, Pfab F, Valet M, Huss-Marp J, Behrendt H, Ring J, et al. Pruritus and atopic dermatitis. Clin Rev Allergy Immunol. 2011 Dec 5;41(3):237–44.

DaVeiga SP. Epidemiology of atopic dermatitis: a review. Allergy asthma Proc. 2012 May 1;33(3):227–34.

David Boothe W, Tarbox JA, Tarbox MB. Atopic Dermatitis: Pathophysiology. Vol. 1027, Advances in experimental medicine and biology. Springer International Publishing AG; 2017. p. 21–37.

Deleanu D, Nedelea I. Biological therapies for atopic dermatitis: An update (review). Exp Ther Med. 2019 Feb 1;17(2):1061–7.

Distrutti E, Sediari L, Mencarelli A, Renga B, Orlandi S, Antonelli E, et al. Evidence that hydrogen sulfide exerts antinociceptive effects in the gastrointestinal tract by activating KATP channels. J Pharmacol Exp Ther. 2006a Jan;316(1):325–35.

Distrutti E, Sediari L, Mencarelli A, Renga B, Orlandi S, Russo G, et al. 5-Amino-2hydroxybenzoic acid 4-(5-thioxo-5H-[1,2]dithiol-3yl)-phenyl ester (ATB-429), a hydrogen sulfide-releasing derivative of mesalamine, exerts antinociceptive effects in a model of postinflammatory hypersensitivity. J Pharmacol Exp Ther. 2006b;319(1):447–58.

Dold S, Wjst M, Von Mutius E, Reitmeir P, Stiepel E. Genetic risk for asthma, allergic rhinitis, and atopic dermatitis. Arch Dis Child. 1992;67(8):1018–22.

Drapala A, Koszelewski D, Tomasova L, Ostaszewski R, Grman M, Ondrias K, et al. Parenteral Na2S, a fast-releasing H2S donor, but not GYY4137, a slow-releasing H2S donor, lowers blood pressure in rats. Acta Biochim Pol. 2017;64(3):561–6.

Druilhe A, Létuvé S, Pretolani M. Glucocorticoid-induced apoptosis in human eosinophils: Mechanisms of action. Vol. 8, Apoptosis. Apoptosis; 2003. p. 481–95.

Duan F, Li Y, Chen L, Zhou X, Chen J, Chen H, et al. Sulfur inhibits the growth of androgen-independent prostate cancer in vivo. Oncol Lett. 2015 Jan 1;9(1):437–41.

Ekundi-Valentim E, Mesquita FP, Santos KT, de Paula MAV, Florenzano J, Zanoni CI, et al. A comparative study on the anti-inflammatory effects of single oral doses of naproxen and its hydrogen sulfide (H2S)-releasing derivative ATB-346 in rats with carrageenan-induced synovitis. Med Gas Res. 2013 Nov 16;3(1):24.

Ekundi-Valentim E, Santos KT, Camargo EA, Denadai-Souza A, Teixeira SA, Zanoni CI, et al. Differing effects of exogenous and endogenous hydrogen sulphide in carrageenan-induced knee joint synovitis in the rat. Br J Pharmacol. 2010 Apr;159(7):1463–74.

Farina S, Gisondi P, Zanoni M, Pace M, Rizzoli L, Baldo E, et al. Balneotherapy for atopic dermatitis in children at Comano spa in Trentino, Italy. J Dermatolog Treat. 2011 Dec 22;22(6):366–71.

Feichtinger RG, Sperl W, Bauer JW, Kofler B. Mitochondrial dysfunction: a neglected component of skin diseases. Exp Dermatol. 2014 Sep;23(9):607–14.

Filipovic MR. Persulfidation (S-sulfhydration) and H2S. Handb Exp Pharmacol. 2015;230:29–59.

Fossati P, Prencipe L, Berti G. Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. Clin Chem. 1980 Feb;26(2):227–31.

Frew AJ. Allergen immunotherapy. J Allergy Clin Immunol. 2010 Feb 1;125(2 SUPPL. 2):S306–13.

Gandhi NA, Bennett BL, Graham NMH, Pirozzi G, Stahl N, Yancopoulos GD. Targeting key proximal drivers of type 2 inflammation in disease. Vol. 15, Nature Reviews Drug Discovery. Nature Publishing Group; 2016. p. 35–50.

Gerő D, Torregrossa R, Perry A, Waters A, Le-Trionnaire S, Whatmore JL, et al. The novel mitochondria-targeted hydrogen sulfide (H2S) donors AP123 and AP39 protect against hyperglycemic injury in microvascular endothelial cells in vitro. Pharmacol Res. 2016 Nov;113(Pt A):186–98.

Gobbi G, Ricci F, Malinverno C, Carubbi C, Pambianco M, Panfilis G de, et al. Hydrogen sulfide impairs keratinocyte cell growth and adhesion inhibiting mitogenactivated protein kinase signaling. Lab Invest. 2009 Sep 22;89(9):994–1006.

Grambow E, Mueller-Graf F, Delyagina E, Frank M, Kuhla A, Vollmar B. Effect of the hydrogen sulfide donor GYY4137 on platelet activation and microvascular thrombus formation in mice. Platelets. 2014;25(3):166–74.

Greaney JL, Kutz JL, Shank SW, Jandu S, Santhanam L, Alexander LM. Impaired Hydrogen Sulfide-Mediated Vasodilation Contributes to Microvascular Endothelial Dysfunction in Hypertensive Adults. Hypertens (Dallas, Tex 1979). 2017 May;69(5):902–9. Guo W, Li D, You V, Li W, Hu B, Zhang S, et al. Cystathionine γ-lyase deficiency aggravates obesity-related insulin resistance via FoxO1-dependent hepatic gluconeogenesis. FASEB J. 2019 Mar 1;33(3):4212–24.

Gutowska-Owsiak D, Schaupp AL, Salimi M, Taylor S, Ogg GS. Interleukin-22 downregulates filaggrin expression and affects expression of profilaggrin processing enzymes. Br J Dermatol. 2011 Sep;165(3):492–8.

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J Biol Chem. 1974;249(22):7130–9.

Hamidizadeh N, Simaeetabar S, Handjani F, Ranjbar S, Moghadam MG, Parvizi MM. Composition of minerals and trace elements at Mamasani thermal source: A possible preventive treatment for some skin diseases. J Educ Health Promot. 2017;6:110.

Han N-R, Moon P-D, Jeong H-J, Kim H-M. Hydrogen sulfide diminishes the levels of thymic stromal lymphopoietin in activated mast cells. Arch Dermatol Res. 2016 Mar 20;308(2):103–13.

Herrera BS, Coimbra LS, da Silva AR, Teixeira SA, Costa SKP, Wallace JL, et al. The H2S-releasing naproxen derivative, ATB-346, inhibits alveolar bone loss and inflammation in rats with ligature-induced periodontitis. Med Gas Res. 2015;5(1):4.

Hine C, Harputlugil E, Zhang Y, Ruckenstuhl C, Lee BC, Brace L, et al. Endogenous hydrogen sulfide production is essential for dietary restriction benefits. Cell. 2015 Jan 15;160(1–2):132–44.

Hong J, Buddenkotte J, Berger TG, Steinhoff M. Management of itch in atopic dermatitis. Semin Cutan Med Surg. 2011 Jun;30(2):71–86.

Howell MD, Kim BE, Gao P, Grant A V, Boguniewicz M, Debenedetto A, et al. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. J Allergy Clin Immunol. 2007 Jul;120(1):150–5.

Hsieh CS, Macatonia SE, O'Garra A, Murphy KM. T cell genetic background determines default t helper phenotype development in vitro. J Exp Med. 1995 Feb 1;181(2):713–21.

Irvine AD, McLean WHI, Leung DYM. Filaggrin Mutations Associated with Skin and Allergic Diseases. N Engl J Med. 2011 Oct 6;365(14):1315–27.

Ishigami M, Hiraki K, Umemura K, Ogasawara Y, Ishii K, Kimura H. A Source of Hydrogen Sulfide and a Mechanism of Its Release in the Brain. Antioxid Redox Signal. 2009;11(2):205–14.

Ishii I, Akahoshi N, Yu X-N, Kobayashi Y, Namekata K, Komaki G, et al. Murine cystathionine gamma-lyase: complete cDNA and genomic sequences, promoter activity, tissue distribution and developmental expression. Biochem J. 2004 Jul 1;381(Pt 1):113–23.

Iyer D, Mishra N, Agrawal A. Mitochondrial Function in Allergic Disease. Vol. 17, Current Allergy and Asthma Reports. Current Medicine Group LLC 1; 2017. p. 1–10.

Jedrychowski W, Perera F, Maugeri U, Mrozek-Budzyn D, Miller RL, Flak E, et al. Effects of prenatal and perinatal exposure to fine air pollutants and maternal fish consumption on the occurrence of infantile eczema. Int Arch Allergy Immunol. 2011 Jun;155(3):275–81.

Johansson SGO, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. J Allergy Clin Immunol. 2004;113(5):832–6.

Joly F, Branka J-E, Lefeuvre L. Thermal Water from Uriage-les-Bains Exerts DNA Protection, Induction of Catalase Activity and Claudin-6 Expression on UV Irradiated Human Skin in Addition to Its Own Antioxidant Properties. J Cosmet Dermatological Sci Appl. 2014 Mar 10;04(02):99–106.

Jung M, Lee TH, Oh HJ, Kim H, Son Y, Lee EH, et al. Inhibitory effect of 5,6dihydroergosteol-glucoside on atopic dermatitis-like skin lesions via suppression of NF-κB and STAT activation. J Dermatol Sci. 2015 Sep;79(3):252–61.

Kabil O, Vitvitsky V, Xie P, Banerjee R. The quantitative significance of the transsulfuration enzymes for H2S production in murine tissues. Antioxid Redox Signal. 2011 Jul 15;15(2):363–72.

Kang J, Li Z, Organ CL, Park CM, Yang CT, Pacheco A, et al. PH-Controlled Hydrogen Sulfide Release for Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. J Am Chem Soc. 2016 May 25;138(20):6336–9.

Kao JS, Fluhr JW, Man MQ, Fowler AJ, Hachem JP, Crumrine D, et al. Short-term glucocorticoid treatment compromises both permeability barrier homeostasis and stratum corneum integrity: Inhibition of epidermal lipid synthesis accounts for functional abnormalities. J Invest Dermatol. 2003 Mar 1;120(3):456–64.

Karagülle MZ, Karagülle M, Kılıç S, Sevinç H, Dündar C, Türkoğlu M. In vitro evaluation of natural thermal mineral waters in human keratinocyte cells: a preliminary study. Int J Biometeorol. 2018 Sep 2;62(9):1657–61.

Kim C-G, Lee J-E, Jeong D-G, Lee Y-H, Park S-I, Lee D-G, et al. Bathing effects of east saline groundwater concentrates on allergic (atopic) dermatitis-like skin lesions induced by 2,4-dinitrochlorobenzene in hairless mice. Exp Ther Med. 2017 Jun;13(6):3448–66.

Kim J, Kim E-H, Oh I, Jung K, Han Y, Cheong H-K, et al. Symptoms of atopic dermatitis are influenced by outdoor air pollution. J Allergy Clin Immunol. 2013 Aug;132(2):495-8.e1.

Kimura H. Hydrogen sulfide and polysulfides as signaling molecules. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 2015;91(4):131–59.

Kimura H. Signalling by hydrogen sulfide and polysulfides via protein S-sulfuration. Vol. 177, British Journal of Pharmacology. John Wiley and Sons Inc.; 2020. p. 720– 33.

Koike S, Nishimoto S, Ogasawara Y. Cysteine persulfides and polysulfides produced by exchange reactions with H2S protect SH-SY5Y cells from methylglyoxal-induced toxicity through Nrf2 activation. Redox Biol. 2017 Aug 1;12:530–9.

Kolluru GK, Shen X, Bir SC, Kevil CG. Hydrogen sulfide chemical biology: pathophysiological roles and detection. Nitric oxide Biol Chem. 2013 Nov 30;35:5–20.

Kram L, Grambow E, Mueller-Graf F, Sorg H, Vollmar B. The anti-thrombotic effect of hydrogen sulfide is partly mediated by an upregulation of nitric oxide synthases. Thromb Res. 2013 Aug;132(2).

Ku JM, Hong SH, Kim HI, Seo HS, Shin YC, Ko S-G. Effects of Angelicae dahuricae Radix on 2, 4-Dinitrochlorobenzene-Induced Atopic Dermatitis-Like Skin Lesions in mice model. BMC Complement Altern Med. 2017 Dec 7;17(1):98.

Kuo T, McQueen A, Chen TC, Wang JC. Regulation of glucose homeostasis by glucocorticoids. Adv Exp Med Biol. 2015;872:99–126.

Kutlu A, Karabacak E, Aydin E, Ozturk S, Taskapan O, Aydinoz S, et al. Relationship between skin prick and atopic patch test reactivity to aeroallergens and disease severity in children with atopic dermatitis. Allergol Immunopathol (Madr). 2013 Nov;41(6):369–73.

Kutz JL, Greaney JL, Santhanam L, Alexander LM. Evidence for a functional vasodilatatory role for hydrogen sulphide in the human cutaneous microvasculature. J Physiol. 2015 May 1;593(9):2121–9.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970 Aug 15;227(5259):680–5.

Laggner H, Hermann M, Esterbauer H, Muellner MK, Exner M, Gmeiner BMK, et al. The novel gaseous vasorelaxant hydrogen sulfide inhibits angiotensin-converting enzyme activity of endothelial cells. J Hypertens. 2007;25(10):2100–4.

Langan SM, Irvine AD, Weidinger S. Atopic dermatitis. Vol. 396, The Lancet. Lancet Publishing Group; 2020. p. 345–60.

Lee E, Kim H-J, Lee M, Jin SH, Hong SH, Ahn S, et al. Cystathionine metabolic enzymes play a role in the inflammation resolution of human keratinocytes in response to sub-cytotoxic formaldehyde exposure. Toxicol Appl Pharmacol. 2016 Nov 1;310:185–94.

Lee ZW, Zhou J, Chen C-S, Zhao Y, Tan C-H, Li L, et al. The slow-releasing hydrogen sulfide donor, GYY4137, exhibits novel anti-cancer effects in vitro and in

vivo. PLoS One. 2011;6(6):e21077.

Leskova A, Pardue S, Glawe JD, Kevil CG, Shen X. Role of thiosulfate in hydrogen sulfide-dependent redox signaling in endothelial cells. Am J Physiol Circ Physiol. 2017 Aug 1;313(2):H256–64.

Leung DYM, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA. New insights into atopic dermatitis. Vol. 113, Journal of Clinical Investigation. The American Society for Clinical Investigation; 2004. p. 651–7.

Li L, Whiteman M, Guan YY, Neo KL, Cheng Y, Lee SW, et al. Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137): new insights into the biology of hydrogen sulfide. Circulation. 2008 May 6;117(18):2351–60.

Lin L, Zhou Y, Li H, Pang D, Zhang L, Lu X, et al. Polysaccharide extracted from Chinese white wax scale ameliorates 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis-like symptoms in BALB/c mice. Saudi Pharm J SPJ Off Publ Saudi Pharm Soc. 2017 May;25(4):625–32.

Liu DH, Huang X, Meng XM, Zhang CM, Lu HL, Kim YC, et al. Exogenous H2S enhances mice gastric smooth muscle tension through S-sulfhydration of KV4.3, mediating the inhibition of the voltage-dependent potassium current. Neurogastroenterol Motil. 2014a Dec 1;26(12):1705–16.

Liu F, Chen D-D, Sun X, Xie H-H, Yuan H, Jia W, et al. Hydrogen sulfide improves wound healing via restoration of endothelial progenitor cell functions and activation of angiopoietin-1 in type 2 diabetes. Diabetes. 2014b May 1;63(5):1763–78.

Liu FT, Goodarzi H, Chen HY. IgE, mast cells, and eosinophils in atopic dermatitis. Clin Rev Allergy Immunol. 2011 Dec 20;41(3):298–310.

Liu Y, Yang R, Liu X, Zhou Y, Qu C, Kikuiri T, et al. Hydrogen sulfide maintains mesenchymal stem cell function and bone homeostasis via regulation of Ca2+ channel sulfhydration. Cell Stem Cell. 2014c Jul 3;15(1):66–78.

Man M-Q, Hatano Y, Lee SH, Man M, Chang S, Feingold KR, et al. Characterization of a hapten-induced, murine model with multiple features of atopic dermatitis: structural, immunologic, and biochemical changes following single versus multiple oxazolone challenges. J Invest Dermatol. 2008 Jan;128(1):79–86.

Marutani E, Ichinose F. Emerging pharmacological tools to control hydrogen sulfide signaling in critical illness. Intensive Care Med Exp. 2020 Dec 31;8(1):1–14.

Matsuda H, Watanabe N, Geba GP, Sperl J, Tsudzuki M, Hiroi J, et al. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. Int Immunol. 1997;9(3):461–6.

Matsumoto K, Mizukoshi K, Oyobikawa M, Ohshima H, Tagami H. Establishment of an atopic dermatitis-like skin model in a hairless mouse by repeated elicitation of contact hypersensitivity that enables to conduct functional analyses of the stratum corneum with various non-invasive biophysical instruments. Skin Res Technol. 2004 May;10(2):122–9.

Matz H, Orion E, Wolf R. Balneotherapy in dermatology. Dermatol Ther. 2003;16(2):132–40.

Mazza R, Pasqua T, Cerra MC, Angelone T, Gattuso A. Akt/eNOS signaling and PLN S-sulfhydration are involved in H2S-dependent cardiac effects in frog and rat. Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol. 2013 May 8;305(4).

Mazzulla S, Nicoletta V, Perrotta I, De Stefano S, Sesti S. In vivo study of biomechanical properties in psoriasis vulgaris: Effectiveness of sulfur spa therapy. Open J Mol Integr Physiol. 2013;(3):15–20.

Mendes JA, Ribeiro MC, Reis Filho GJMV, Rocha T, Muscará MN, Costa SKP, et al. Hydrogen sulfide inhibits apoptosis and protects the bronchial epithelium in an allergic inflammation mice model. Int Immunopharmacol. 2019 Aug 1;73:435–41.

Mirandola P, Gobbi G, Micheloni C, Vaccarezza M, Di Marcantonio D, Ruscitti F, et al. Hydrogen sulfide inhibits IL-8 expression in human keratinocytes via MAP kinase signaling. Lab Invest. 2011 Aug 9;91(8):1188–94.

Módis K, Ju YJ, Ahmad A, Untereiner AA, Altaany Z, Wu L, et al. S-Sulfhydration of ATP synthase by hydrogen sulfide stimulates mitochondrial bioenergetics. Pharmacol Res. 2016 Nov 1;113(Pt A):116–24.

Mollanazar NK, Smith PK, Yosipovitch G. Mediators of Chronic Pruritus in Atopic Dermatitis: Getting the Itch Out? Clin Rev Allergy Immunol. 2016 Dec 1;51(3):263–92.

Moniaga CS, Kamata Y, Ogawa H, Suga Y, Tominaga M, Takamori K. Hydrogen sulfide modulates the expression of axon-guidance molecules in human keratinocytes. Vol. 97, Journal of Dermatological Science. Elsevier Ireland Ltd; 2020. p. 232–5.

Moore PK, Bhatia M, Moochhala S. Hydrogen sulfide: from the smell of the past to the mediator of the future? Trends Pharmacol Sci. 2003 Dec;24(12):609–11.

Murphy B, Bhattacharya R, Mukherjee P. Hydrogen sulfide signaling in mitochondria and disease. FASEB J. 2019 Dec 1;33(12):13098–125.

Mustafa AK, Gadalla MM, Sen N, Kim S, Mu W, Gazi SK, et al. H2S signals through protein S-sulfhydration. Sci Signal. 2009;2(96):ra72.

Mustafa AK, Sikka G, Gazi SK, Steppan J, Jung SM, Bhunia AK, et al. Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulfhydrates potassium channels. Circ Res. 2011 Nov 11;109(11):1259–68.

Nagahara N, Ito T, Kitamura H, Nishino T. Tissue and subcellular distribution of mercaptopyruvate sulfurtransferase in the rat: confocal laser fluorescence and

immunoelectron microscopic studies combined with biochemical analysis. Histochem Cell Biol. 1998 Sep;110(3):243–50.

Nagahara N, Yoshii T, Abe Y, Matsumura T. Thioredoxin-dependent enzymatic activation of mercaptopyruvate sulfurtransferase. An intersubunit disulfide bond serves as a redox switch for activation. J Biol Chem. 2007 Jan 19;282(3):1561–9.

Nakahara T, Kido-Nakahara M, Tsuji G, Furue M. Basics and recent advances in the pathophysiology of atopic dermatitis. J Dermatol. 2020 Oct 29;1346-8138.15664.

Nakai K, Yoneda K, Maeda R, Munehiro A, Fujita N, Yokoi I, et al. Urinary biomarker of oxidative stress in patients with psoriasis vulgaris and atopic dermatitis. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2009 Dec;23(12):1405–8.

Nicholls P, Marshall DC, Cooper CE, Wilson MT. Sulfide inhibition of and metabolism by cytochrome c oxidase. Biochem Soc Trans. 2013 Oct 1;41(5):1312–6.

Nograles KE, Zaba LC, Guttman-Yassky E, Fuentes-Duculan J, Suárez-Fariñas M, Cardinale I, et al. Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. Br J Dermatol. 2008 Nov;159(5):1092–102.

Nutten S. Atopic dermatitis: global epidemiology and risk factors. Ann Nutr Metab. 2015;66 Suppl 1(1):8–16.

Ogasawara Y, Isoda S, Tanabe S. Tissue and subcellular distribution of bound and acid-labile sulfur, and the enzymic capacity for sulfide production in the rat. Biol Pharm Bull. 1994 Dec;17(12):1535–42.

Oh M-H, Oh SY, Lu J, Lou H, Myers AC, Zhu Z, et al. TRPA1-dependent pruritus in IL-13-induced chronic atopic dermatitis. J Immunol. 2013 Dec 1;191(11):5371–82.

Omata N, Tsukahara H, Ito S, Ohshima Y, Yasutomi M, Yamada A, et al. Increased oxidative stress in childhood atopic dermatitis. Life Sci. 2001 Jun 1;69(2):223–8.

Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. Vol. 87, Physiological Reviews. NIH Public Access; 2007. p. 315–424.

Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med. 1967 Jul;70(1):158–69.

Pálinkás Z, Furtmüller PG, Nagy A, Jakopitsch C, Pirker KF, Magierowski M, et al. Interactions of hydrogen sulfide with myeloperoxidase. Vol. 172, British Journal of Pharmacology. John Wiley and Sons Inc.; 2015. p. 1516–32.

Palmer CNA, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. Nat Genet. 2006 Apr;38(4):441–6.

Panza E, De Cicco P, Armogida C, Scognamiglio G, Gigantino V, Botti G, et al. Role

of the cystathionine  $\gamma$  lyase/hydrogen sulfide pathway in human melanoma progression. Pigment Cell Melanoma Res. 2015 Jan;28(1):61–72.

Papapetropoulos A, Pyriochou A, Altaany Z, Yang G, Marazioti A, Zhou Z, et al. Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Dec 22;106(51):21972–7.

Penard-Morand C, Raherison C, Charpin D, Kopferschmitt C, Lavaud F, Caillaud D, et al. Long-term exposure to close-proximity air pollution and asthma and allergies in urban children. Eur Respir J. 2010 Jul 1;36(1):33–40.

Peng W, Novak N. Pathogenesis of atopic dermatitis. Clin Exp Allergy. 2015 Mar 1;45(3):566–74.

Perkin MR, Craven J, Logan K, Strachan D, Marrs T, Radulovic S, et al. Association between domestic water hardness, chlorine, and atopic dermatitis risk in early life: A population-based cross-sectional study. J Allergy Clin Immunol. 2016 Aug 1;138(2):509–16.

Pichette J, Fynn-Sackey N, Gagnon J. Hydrogen sulfide and sulfate prebiotic stimulates the secretion of GLP-1 and improves glycemia in male mice. Endocrinology. 2017 Oct 1;158(10):3416–25.

Pietri R, Román-Morales E, López-Garriga J. Hydrogen sulfide and hemeproteins: Knowledge and mysteries. Vol. 15, Antioxidants and Redox Signaling. Antioxid Redox Signal; 2011. p. 393–404.

Piragine E, Calderone V. Pharmacological modulation of the hydrogen sulfide (H2S) system by dietary H2S-donors: A novel promising strategy in the prevention and treatment of type 2 diabetes mellitus. Phytotherapy Research. John Wiley and Sons Ltd; 2020.

Polhemus DJ, Li Z, Pattillo CB, Gojon G, Gojon G, Giordano T, et al. A Novel Hydrogen Sulfide Prodrug, SG1002, Promotes Hydrogen Sulfide and Nitric Oxide Bioavailability in Heart Failure Patients. Cardiovasc Ther. 2015 Aug 1;33(4):216–26.

Powell CR, Dillon KM, Matson JB. A review of hydrogen sulfide (H2S) donors: Chemistry and potential therapeutic applications. Vol. 149, Biochemical Pharmacology. Elsevier Inc.; 2018. p. 110–23.

Pyiochou A, Papapetropoulos A, Olah G, Wintner E, Jeschke M, Branski L, et al. The hydrogen sulfide donor IK-1001 stimulates neovascularization and improves wound healing. FASEB J. 2008;22:912.42-912.42.

Reiffenstein RJ, Hulbert WC, Roth SH. Toxicology of hydrogen sulfide. Vol. 32, Annual Review of Pharmacology and Toxicology. Annu Rev Pharmacol Toxicol; 1992. p. 109–34.

Riahi S, Rowley CN. Why can hydrogen sulfide permeate cell membranes? J Am Chem Soc. 2014 Oct 29;136(43):15111–3.

Ríos-González BB, Román-Morales EM, Pietri R, López-Garriga J. Hydrogen sulfide activation in hemeproteins: The sulfheme scenario. J Inorg Biochem. 2014 Apr 1;133:78–86.

Robinson CE, Keshavarzian A, Pasco DS, Frommel TO, Winship DH, Holmes EW. Determination of protein carbonyl groups by immunoblotting. Anal Biochem. 1999 Jan 1;266(1):48–57.

Rodrigues L. Efeitos antipruriginosos do sulfeto de hidrogênio (exógeno e endógeno) sobre o prurido agudo e crônico em pele de camundongos. [São Paulo]: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo; 2018.

Rodrigues L, Ekundi-Valentim E, Florenzano J, Cerqueira ARA, Soares AG, Schmidt TP, et al. Protective effects of exogenous and endogenous hydrogen sulfide in mast cell-mediated pruritus and cutaneous acute inflammation in mice. Pharmacol Res. 2017 Jan;115:255–66.

Rooman R, Koster G, Bloemen R, Gresnigt R, van Buul-Offers SC. The effect of dexamethasone on body and organ growth of normal and IGF-II-transgenic mice. J Endocrinol. 1999 Dec;163(3):543–52.

Roviezzo F, Bertolino A, Sorrentino R, Terlizzi M, Matteis M, Calderone V, et al. Hydrogen sulfide inhalation ameliorates allergen induced airway hypereactivity by modulating mast cell activation. Pharmacol Res. 2015 Oct 1;100:85–92.

Salimi M, Barlow JL, Saunders SP, Xue L, Gutowska-Owsiak D, Wang X, et al. A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. J Exp Med. 2013 Dec;210(13):2939–50.

Schäfer M, Farwanah H, Willrodt AH, Huebner AJ, Sandhoff K, Roop D, et al. Nrf2 links epidermal barrier function with antioxidant defense. EMBO Mol Med. 2012 May;4(5):364–79.

Schmidt TP, Lopes LB, Rodrigues L, Wood M, Whiteman M, Muscará MN, et al. Antipsoriatic activity of GYY4137 (a slow-releasing hydrogen sulphide donor) microemulsion system using a mouse skin model of psoriasis. Nitric Oxide. 2015 May 1;47:S26.

Schultz Larsen F. Atopic dermatitis: A genetic-epidemiologic study in a populationbased twin sample. J Am Acad Dermatol. 1993;28(5):719–23.

Searcy DG, Lee SH. Sulfur reduction by human erythrocytes. J Exp Zool. 1998 Oct 15;282(3):310–22.

Sen N, Paul BD, Gadalla MM, Mustafa AK, Sen T, Xu R, et al. Hydrogen sulfidelinked sulfhydration of NF-κB mediates its antiapoptotic actions. Mol Cell. 2012 Jan 13;45(1):13–24.

Shani J, Seidl V, Hristakieva E, Stanimirovic A, Burdo A, Harari M. Indications,
contraindications and possible side-effects of climatotherapy at the Dead-Sea. Int J Dermatol. 1997 Jul;36(7):481–92.

Shen X, Carlström M, Borniquel S, Jädert C, Kevil CG, Lundberg JO. Microbial regulation of host hydrogen sulfide bioavailability and metabolism. Free Radic Biol Med. 2013 Jul;60:195–200.

Shibuya N, Koike S, Tanaka M, Ishigami-Yuasa M, Kimura Y, Ogasawara Y, et al. A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells. Nat Commun. 2013 Dec 22;4(1):1366.

Shibuya N, Mikami Y, Kimura Y, Nagahara N, Kimura H. Vascular Endothelium Expresses 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase and Produces Hydrogen Sulfide. J Biochem. 2009a Nov 1;146(5):623–6.

Shibuya N, Tanaka M, Yoshida M, Ogasawara Y, Togawa T, Ishii K, et al. 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase Produces Hydrogen Sulfide and Bound Sulfane Sulfur in the Brain. Antioxid Redox Signal. 2009b Apr;11(4):703–14.

Sidbury R, Davis DM, Cohen DE, Cordoro KM, Berger TG, Bergman JN, et al. Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: section 3. Management and treatment with phototherapy and systemic agents. J Am Acad Dermatol. 2014 Aug;71(2):327–49.

Simon D, Braathen LR, Simon HU. Eosinophils and atopic dermatitis. Vol. 59, Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology. John Wiley & Sons, Ltd; 2004. p. 561–70.

Singh S, Padovani D, Leslie RA, Chiku T, Banerjee R. Relative Contributions of Cystathionine  $\beta$ -Synthase and  $\gamma$ -Cystathionase to H  $_2$  S Biogenesis via Alternative Trans-sulfuration Reactions. J Biol Chem. 2009 Aug 14;284(33):22457–66.

Sivaranjani N, Rao SV, Rajeev G. Role of Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Atopic Dermatitis. J Clin DIAGNOSTIC Res. 2013 Dec;7(12):2683–5.

Smith RP, Gosselin RE. Hydrogen sulfide poisoning. J Occup Med. 1979 Feb;21(2):93–7.

Solé D, Wandalsen GF, Camelo-Nunes IC, Naspitz CK, ISAAC - Brazilian Group I-B. Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and atopic eczema among Brazilian children and adolescents identified by the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) - Phase 3. J Pediatr (Rio J). 2006 Aug 28;82(5):341– 6.

Stewart D, Fulton WB, Wilson C, Monitto CL, Paidas CN, Reeves RH, et al. Genetic contribution to the septic response in a mouse model. Shock. 2002;18(4):342–7.

Stipanuk MH, Beck PW. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. Biochem J. 1982 Aug 15;206(2):267–77.

Stubbert D, Prysyazhna O, Rudyk O, Scotcher J, Burgoyne JR, Eaton P. Protein kinase G Iα oxidation paradoxically underlies blood pressure lowering by the reductant hydrogen sulfde. Hypertension. 2014;64(6):1344–51.

Sun Y, Wang K, Li MX, He W, Chang JR, Liao CC, et al. Metabolic changes of H2S in smokers and patients of COPD which might involve in inflammation, oxidative stress and steroid sensitivity. Sci Rep. 2015 Oct 12;5(1):14971.

Suzuki T, Arakawa H, Mizuno T, Muramatsu K, Tadaki H, Takizawa T, et al. Differential regulation of eotaxin expression by dexamethasone in normal human lung fibroblasts. Am J Respir Cell Mol Biol. 2008 Jun 1;38(6):707–14.

Szabo C, Papapetropoulos A. International union of basic and clinical pharmacology. CII: Pharmacological modulation of H2S levels: H2s donors and H2S biosynthesis inhibitors. Pharmacol Rev. 2017 Oct 1;69(4):497–564.

Szczesny B, Módis K, Yanagi K, Coletta C, Le Trionnaire S, Perry A, et al. AP39, a novel mitochondria-targeted hydrogen sulfide donor, stimulates cellular bioenergetics, exerts cytoprotective effects and protects against the loss of mitochondrial DNA integrity in oxidatively stressed endothelial cells in vitro. Nitric Oxide - Biol Chem. 2014 Sep 15;41:120–30.

Takahashi N, Wei FY, Watanabe S, Hirayama M, Ohuchi Y, Fujimura A, et al. Reactive sulfur species regulate tRNA methylthiolation and contribute to insulin secretion. Nucleic Acids Res. 2017;45(1):435–45.

Thomsen SF. Atopic Dermatitis: Natural History, Diagnosis, and Treatment. ISRN Allergy. 2014;2014:1–7.

Tollefson MM, Bruckner AL, Section On Dermatology. Atopic dermatitis: skin-directed management. Pediatrics. 2014 Dec;134(6):e1735-44.

Tsuhako MH, Augusto O, Linares E, Chadi G, Giorgio S, Pereira CA. Tempol ameliorates murine viral encephalomyelitis by preserving the blood-brain barrier, reducing viral load, and lessening inflammation. Free Radic Biol Med. 2010 Mar 1;48(5):704–12.

Ukeda H, Hasegawa Y, Ishi T, Sawamura M. Inactivation of Cu,Zn-superoxide dismutase by intermediates of Maillard reaction and glycolytic pathway and some sugars. Biosci Biotechnol Biochem. 1997 Dec;61(12):2039–42.

Untereiner AA, Oláh G, Módis K, Hellmich MR, Szabo C. H2S-induced Ssulfhydration of lactate dehydrogenase a (LDHA) stimulates cellular bioenergetics in HCT116 colon cancer cells. Biochem Pharmacol. 2017 Jul 15;136:86–98.

Wallace JL, Caliendo G, Santagada V, Cirino G. Markedly reduced toxicity of a hydrogen sulphide-releasing derivative of naproxen (ATB-346). Br J Pharmacol. 2010 Mar;159(6):1236–46.

Wallace JL, Caliendo G, Santagada V, Cirino G, Fiorucci S. Gastrointestinal Safety and Anti-Inflammatory Effects of a Hydrogen Sulfide-Releasing Diclofenac Derivative in the Rat. Gastroenterology. 2007;132(1):261–71.

Wallace JL, Nagy P, Feener TD, Allain T, Ditrói T, Vaughan DJ, et al. A proof-of-concept, Phase 2 clinical trial of the gastrointestinal safety of a hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drug. Br J Pharmacol. 2020 Feb 11;177(4):769–77.

Wang R. Physiological Implications of Hydrogen Sulfide: A Whiff Exploration That Blossomed. Physiol Rev. 2012 Apr;92(2):791–896.

Waters A, Torregrossa R, Gero D, Perry A, Wood ME, Whiteman M. RT01, A Novel Derivative of the Mitochondria-targeted Hydrogen Sulfide Donor AP39, Reversed Hyperglycaemia-induced Mitochondrial Dysfunction in Murine Brain Microvascular Endothelial Cells. Free Radic Biol Med. 2017 Nov 1;112:157–8.

Wei W, Wang C, Li D. The content of hydrogen sulfide in plasma of cirrhosis rats combined with portal hypertension and the correlation with indexes of liver function and liver fibrosis. Exp Ther Med. 2017 Nov 1;14(5):5022–6.

Weidinger S, Beck LA, Bieber T, Kabashima K, Irvine AD. Atopic dermatitis. Vol. 4, Nature Reviews Disease Primers. Nature Publishing Group; 2018. p. 1–20.

Werfel T, Heratizadeh A, Niebuhr M, Kapp A, Roesner LM, Karch A, et al. Exacerbation of atopic dermatitis on grass pollen exposure in an environmental challenge chamber. J Allergy Clin Immunol. 2015;136(1):96-103.e9.

Wu R, Yao W, Chen Y, Geng B, Tang C. [Plasma level of endogenous hydrogen sulfide in patients with acute asthma]. Beijing Da Xue Xue Bao. 2008 Oct 18;40(5):505–8.

Wu W, Hou CL, Mu XP, Sun C, Zhu YC, Wang MJ, et al. H2S Donor NaHS Changes the Production of Endogenous H2S and NO in D-Galactose-Induced Accelerated Ageing. Oxid Med Cell Longev. 2017;2017.

Wu W, Peng G, Yang F, Zhang Y, Mu Z, Han X. Sulforaphane has a therapeutic effect in an atopic dermatitis murine model and activates the Nrf2/HO-1 axis. Mol Med Rep. 2019;20(2):1761–71.

Xie X, Dai H, Zhuang B, Chai L, Xie Y, Li Y. Exogenous hydrogen sulfide promotes cell proliferation and differentiation by modulating autophagy in human keratinocytes. Biochem Biophys Res Commun. 2016 Apr 8;472(3):437–43.

Xue R, Hao DD, Sun JP, Li WW, Zhao MM, Li XH, et al. Hydrogen sulfide treatment promotes glucose uptake by increasing insulin receptor sensitivity and ameliorates kidney lesions in type 2 diabetes. Antioxidants Redox Signal. 2013;19(1):5–23.

Yan SK, Chang T, Wang H, Wu L, Wang R, Meng QH. Effects of hydrogen sulfide on homocysteine-induced oxidative stress in vascular smooth muscle cells. Biochem

Biophys Res Commun. 2006 Dec 15;351(2):485–91.

Yang C, Yang Z, Zhang M, Dong Q, Wang X, Lan A, et al. Hydrogen Sulfide Protects against Chemical Hypoxia-Induced Cytotoxicity and Inflammation in HaCaT Cells through Inhibition of ROS/NF-κB/COX-2 Pathway. Agarwal S, editor. PLoS One. 2011 Jul 14;6(7):e21971.

Yang G, Zhao K, Ju Y, Mani S, Cao Q, Puukila S, et al. Hydrogen sulfide protects against cellular senescence via s-sulfhydration of keap1 and activation of Nrf2. Antioxidants Redox Signal. 2013 May 20;18(15):1906–19.

Yang J, Minkler P, Grove D, Wang R, Willard B, Dweik R, et al. Non-enzymatic hydrogen sulfide production from cysteine in blood is catalyzed by iron and vitamin B6. Commun Biol. 2019 Dec 1;2(1):1–14.

Yang R, Qu C, Zhou Y, Konkel JE, Shi S, Liu Y, et al. Hydrogen Sulfide Promotes Tet1- and Tet2-Mediated Foxp3 Demethylation to Drive Regulatory T Cell Differentiation and Maintain Immune Homeostasis. Immunity. 2015 Aug 18;43(2):251–63.

Yi O, Kwon H-J, Kim H, Ha M, Hong S-J, Hong Y-C, et al. Effect of environmental tobacco smoke on atopic dermatitis among children in Korea. Environ Res. 2012 Feb;113:40–5.

Yonezawa D, Sekiguchi F, Miyamoto M, Taniguchi E, Honjo M, Masuko T, et al. A protective role of hydrogen sulfide against oxidative stress in rat gastric mucosal epithelium. Toxicology. 2007 Nov 20;241(1–2):11–8.

Zagli G, Patacchini R, Trevisani M, Abbate R, Cinotti S, Gensini GF, et al. Hydrogen sulfide inhibits human platelet aggregation. Eur J Pharmacol. 2007 Mar 15;559(1):65–8.

Zanardo RCO, Brancaleone V, Distrutti E, Fiorucci S, Cirino G, Wallace JL. Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. FASEB J. 2006 Oct;20(12):2118–20.

Zhang G, Wang P, Yang G, Cao Q, Wang R. The Inhibitory Role of Hydrogen Sulfide in Airway Hyperresponsiveness and Inflammation in a Mouse Model of Asthma. Am J Pathol. 2013 Apr 1;182(4):1188–95.

Zhao K, Ju Y, Li S, Altaany Z, Wang R, Yang G. S-sulfhydration of MEK1 leads to PARP-1 activation and DNA damage repair. EMBO Rep. 2014;15(7):792–800.

Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H2S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. EMBO J. 2001 Nov 1;20(21):6008–16.

Zhao Y, Pacheco A, Xian M. Medicinal chemistry: Insights into the development of novel H2S donors. Handb Exp Pharmacol. 2015;230:365–88.

Zhao Y, Pluth MD. Hydrogen Sulfide Donors Activated by Reactive Oxygen Species.

Angew Chemie - Int Ed. 2016;55(47):14638–42.

Zheng Y, Ji X, Ji K, Wang B. Hydrogen sulfide prodrugs-a review. Vol. 5, Acta Pharmaceutica Sinica B. Chinese Academy of Medical Sciences; 2015. p. 367–77.

Ziosi M, Di Meo I, Kleiner G, Gao X-H, Barca E, Sanchez-Quintero MJ, et al. Coenzyme Q deficiency causes impairment of the sulfide oxidation pathway. EMBO Mol Med. 2017 Jan 1;9(1):96–111.