

Sara Miriam Cruz Sousa

Papel das ceramidas na fisiopatologia da pele

UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2017

Sara Miriam Cruz Sousa

Papel das ceramidas na fisiopatologia da pele

UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2017

Sara Miriam Cruz Sousa

Papel das ceramidas na fisiopatologia da pele

Sara Miriam Cruz Sousa

Monografia apresentada à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ABSTRATO

Os esfingolípidos representam uma classe estruturalmente heterogênea de moléculas lipídicas tipicamente observada nas membranas de células eucarióticas. Para além da sua função estrutural nas biomembranas, os esfingolípidos participam numa complexa rede de reações que abrangem várias vias metabólicas (anabólica, catabólica, reciclagem e ciclo da esfingomielina) e desempenham funções de regulação em eventos celulares muito diversos, tais como a proliferação, inflamação ou apoptose celular. Deste ponto de vista, a ceramida ocupa uma posição central no metabolismo dos esfingolípidos e é uma molécula lipídica funcionalmente multifacetada. Estas características justificam a associação da ceramida com a patogénese de doenças clinicamente distintas, designadamente as doenças crónicas da pele. Estas doenças são, geralmente, caracterizadas por uma inter-relação complexa entre vários fatores etiopatogénicos, incluindo alterações em etapas específicas do metabolismo da ceramida. Por isso, estratégias terapêuticas de reposição do nível de equilíbrio da ceramida e/ou metabolitos relacionados têm suscitado um grande interesse e revelado resultados promissores. Contudo, a diversidade estrutural das ceramidas, bem como dos seus derivados metabólicos, colocam muitos desafios e oportunidades que deverão continuar a ser investigados, no futuro. O presente trabalho de revisão analisa, assim, a estrutura, a função e o metabolismo dos esfingolípidos, bem como a sua relação com a fisiopatologia da pele e com estratégias terapêuticas representativas de potenciais tratamentos de primeira linha das doenças crónicas da pele.

Palavras-Chave: Ceramidas, Dermatite atópica, Doenças crónicas de pele, Esfingolípidos, Metabolismo, Psoríase.

ABSTRACT

The sphingolipids represent a structurally heterogeneous class of lipid molecules typically observed in eukaryotic cell membranes. In addition to its structural role in biomembranes, the sphingolipids participate in a complex network of reactions encompassing various metabolic pathways (anabolic, catabolic, cycling and sphingomyelin cycle) and play regulatory roles in very diverse cellular events such as proliferation, inflammation or cell apoptosis. From this point of view, the ceramide occupies a central position in the sphingolipid metabolism and is a functionally multifaceted lipid molecule. These characteristics justify the association of ceramide with the pathogenesis of clinically distinct diseases, namely chronic skin diseases. These diseases are usually characterised by a complex interrelationship between different etiopathogenic factors, including alterations in specific steps of the ceramide metabolism. Therefore, therapeutic strategies to restore a balanced level of ceramide and/or related metabolites have aroused great interest and revealed promising results. However, the structural diversity of ceramides, as well as its metabolic derivatives, poses many challenges and opportunities that should continue to be investigated in the future. The present review thus analyses the structure, function and metabolism of sphingolipids, as well as its relation with skin pathophysiology and therapeutic strategies representing potential first line treatments for these chronic skin diseases.

Keywords: Atopic dermatitis, Ceramide, Chronic skin diseases, Metabolism, Psoriasis, Sphingolipids.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, à minha família por todo o apoio e sacrifício que fizeram por mim ao longo da minha vida acadêmica, em particular à minha mãe, ao meu pai e à minha irmã por todo o carinho e amor que me ofereceram nos bons e maus momentos.

Agradeço, ao meu namorado, que foi sem dúvida um dos meus maiores pilares para a concretização deste sonho e por estar sempre disponível para me ajudar.

Agradeço, aos meus amigos, por toda amizade e apoio ao longo deste percurso, por estarem sempre presentes comigo em todos os níveis, nunca esquecerei tudo o que fizeram por mim e a verdade é que os amigos da faculdade são amigos para a vida.

Por último, mas sem menor importância, agradeço à minha orientadora, a Doutora Maria Gil Ribeiro, por todo o apoio demonstrado na realização deste trabalho, pela forma incansável com que me auxiliou que, sem dúvida, foi indispensável para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

Abstrato.....	I
Abstract.....	II
Agradecimentos.....	III
Índice de figuras.....	VI
Índice de tabelas.....	VIII
Lista de abreviaturas.....	IX
I. Introdução.....	1
II. Esfingolípidos.....	2
1. Classificação e estrutura.....	2
2. Aspectos básicos do metabolismo.....	5
3. Função.....	7
III. Ceramidas.....	11
1. Diversidade estrutural.....	11
2. Síntese de <i>novo</i> e o ciclo da esfingomielina.....	15
3. Fisiopatologia da ceramida/ceramidase.....	17

IV.	Metabolismo, função e patologia das ceramidas na epiderme.....	21
1.	Anatomia e fisiologia da pele – aspetos básicos.....	21
2.	Papel dos lípidos na barreira cutânea.....	24
3.	Ceramida e doenças inflamatórias da pele.....	26
i.	Dermatite atópica.....	26
ii.	Psoríase.....	35
iii.	Síndrome de Netherton.....	40
V.	Conclusão e perspectivas futuras.....	44
VI.	Bibliografia.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura das bases esfingóides dos esfingolípidos.....	2
Figura 2. Estrutura da ceramida.....	3
Figura 3. Estrutura dos cerebrosídeos.....	4
Figura 4. Estrutura do monosialogangliosídeo 1 (GM1).....	4
Figura 5. Metabolismo e transporte dos esfingolípidos.....	5
Figura 6. Degradação dos GSLs e Esfingolípidoses.....	9
Figura 7. Heterogeneidade estrutural das ceramidas.....	14
Figura 8. Ciclo da esfingomielina.....	17
Figura 9. Representação esquemática da anatomia da pele.....	21
Figura 10. Anatomia da epiderme.....	22
Figura 11. Esquema representativo da secção do estrato córneo.....	25
Figura 12. Ilustração da dermatite atópica no rosto.....	27
Figura 13. Mecanismos patogénicos da dermatite atópica.....	28
Figura 14. Metabolismo da ceramida na dermatite atópica.....	30
Figura 15. Estrutura da pseudoceramida esfingolípidos E.....	33

Figura 16. Estrutura da hidroxipalmitoil esfinganina.....	34
Figura 17. Aspeto clinico de uma lesão psoriática com placa.....	36
Figura 18. Representação esquemática do ciclo da psoríase.....	37
Figura 19. Eritrodermia generalizada num bebé com Síndrome de Netherton.....	41

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Nomenclatura das diferentes classes de ceramidas na epiderme.....12

Tabela 2. A família de esfingomielinases humanas.....16

Tabela 3. A família de ceramidases humanas.....18

Tabela 4. Fisiopatologia das ceramidases humanas.....19

LISTA DE ABREVIATURAS

aCDase - *Acid ceramidase* / Ceramidase ácida

AD - *Atopic dermatitis* / Dermatite atópica

AlkCDase - *Alkaline ceramidase* / Ceramidase alcalina

AlkSMase - *Alkaline sphingomyelinase* / Esfingomielinase alcalina

ASA - *Arylsulfatase* / Arilsulfatase

aSMase - *Acid sphingomyelinase* / Esfingomielinase ácida

C1P - *Ceramide-1-phosphate* / Ceramida-1-fosfato

CDase - Ceramidase

CE - *Cornified envelope* / Envelope cornificado

Cer - *Ceramide* / Ceramida

CerK - *Ceramide kinase* / Ceramida cinase

CERT - *Ceramide transfer protein* / Proteína de transporte da ceramida

CerS - *Ceramide synthase* / Ceramida sintetase

CGT - *Ceramide galactosyltransferase* / Ceramida galactosiltransferase

CoA - *Coenzyme A* / Coenzima A

CST - Cerebroside sulfotransferase / Cerebrosídeo sulfotransferase

DAG - *Diacylglycerol* / Diacilglicerol

DEGS - *Dihydroceramide desaturase* / Dihidroceramida desaturase

ELOVL - *Elongases of very long chain fatty acids* / Elongases de ácidos gordos de cadeia muito longa

ER - *Endoplasmatic reticulum* / Retículo endoplasmático

FA - *Fatty acid* / Ácido gordo

FAPP2 - *Four-phosphate adaptor protein 2* / Proteína adaptadora 4-fosfato 2

FLG - *Filaggrin* / Filagrina

GalCer - *Galactosylceramide* / Galactosilceramida

GC - *Golgi complex* / Complexo de Golgi

GCS - *Glucosylceramide synthase* / Glucosilceramida sintetase

GlcCer - *Glucosylceramide* / Glucosilceramida

GSL - *Glycosphingolipid* / Glicosfingolípido

GM1 - *Monosialoganglioside 1* / Monosialogangliosídeo 1

GM2 - *Monosialoganglioside 2* / Monosialogangliosídeo 2

GM2-AP - *Activator protein GM2* / Proteína ativadora do GM2

IFN γ - *Interferon γ* / Interferão γ

JNK - *c-jun N-terminal kinase* / c-jun N-terminal quinase

KSR - *3-ketosphinganine reductase* / 3- ceto esfingosina redutase

LCB - *Long chain base* / Cadeia longa da base esfingóide

LEKT1 - *Lympho-epithelial Kazal-type related inhibitor* / Inibidor da linfoepitelial
Kazal-tipo

MA-nSMase - *Mitochondrial-associated nSMase* / nSMase associada à mitocôndria

nCDase - *Neutral ceramidase* / Ceramidase neutra

NMF - *Natural moisturizing factors* / Fatores naturais de hidratação

NS - *Netherton syndrome* / Síndrome de Netherton

nSMase - *Neutral sphingomyelinase* / Esfingomielinase neutra

PASI - *Psoriasis area severity index* / Índice de área e gravidade da Psoríase

PC - *Phosphatidylcholine* / Fosfatidilcolina

PKC- α - *Protein kinase C alpha* / Proteína quinase C-alfa

PM - *Plasmatic membrane* / Membrana plasmática

S1P - *Sphingosine-1-phosphate* / Esfingosina-1-fosfato

SAP - *Saposin* / Saposina

SC - *Stratum corneum* / Estrato córneo

SGPP - *Sphingosine-1-phosphate phosphatase* / Esfingosina-1-fosfato fosfatase

SL - *Sphingolipid* / Esfingolípido

SPGL - *Sphingosine-1-phosphate lyase* / Esfingosina-1-fosfato liase

SM - *Sphingomyelin* / Esfingomielina

SMase - *Sphingomyelinase* / Esfingomielinase

SMS - *Sphingomyelin synthase* / Esfingomielina sintetase

Sph - *Sphingosine* / Esfingosina

SPHK - *Sphingosine kinase* / Esfingosina cinase

SPINK5 - *Serin protease inhibitor Kazal-type 5* / Inibidor da serina protease Kazal-tipo5

SPT - *Serine palmitoyltransferase* / Serina palmitoil transferase

Stat3 - *Signal transducer and activator of transcription 3* / Transdutor de sinal e ativadora da transcrição 3

TEWL - *Transepidermal water loss* / Perda de água transepidérmica

TGase - Transglutaminase

TGN - Trans-Golgi *network*

Th - *Thelper lymphocytes* / Linfócitos *Thelper*

TNF - *Tumor necrosis factor* / Fator de necrose tumoral

I. INTRODUÇÃO

Em 1884, o alemão Johann L.W.Thudichum, médico e bioquímico, caracterizou pela primeira vez uma classe natural de lípidos que denominou por esfingolípidos (SLs) (Young *et al.*, 2012).

Os SLs são componentes típicos das biomembranas das células eucarióticas. Estruturalmente são constituídos por três elementos essenciais: uma base esfingóide (LCB), um ácido gordo (FA) e um grupo polar. As bases esfingóides constituem a base molecular da diversidade estrutural dos SLs e algumas delas são biologicamente ativas (Gault *et al.*, 2010; Kihara, 2016; Kolter, 2011; Merrill, 2011; Merrill e Carman, 2015; Young *et al.*, 2012).

Nas últimas décadas, tornou-se evidente que SLs tais como a esfingomiéline (SM), esfingosina (Sph), esfingosina-1-fosfato (S1P), ceramida (Cer), ceramida-1-fosfato (C1P) e glicosfingolípidos (GSLs) desempenham um papel fundamental na sinalização celular. O facto de a sinalização estar implicada em eventos celulares muito distintos, tais como apoptose, diferenciação, inflamação, angiogénese, entre outros, tem dificultado a identificação do papel exato dos SLs na fisiopatologia celular (Kihara, 2016; Kolter, 2011; Merrill, 2011; Merrill e Carman, 2015; Young *et al.*, 2012). Mais recentemente, moléculas esfingolípídicas específicas têm sido implicadas na manutenção da barreira epidérmica representando, simultaneamente, potenciais fatores causais e terapêuticos das doenças crónicas da pele (Meckfessel e Brandt, 2014; Uchida, 2014; van Smeden *et al.*, 2014).

O presente trabalho foi, assim, elaborado com o objetivo de compilar informação relevante e atual sobre a relação entre os SLs e as doenças crónicas da pele. A pesquisa bibliográfica incidiu sobre artigos de revisão com informação no âmbito dos seguintes tópicos: estrutura, função e metabolismo dos SLs, estrutura e metabolismo das ceramidas, estrutura e função das ceramidas na pele, ceramidas e doenças crónicas da pele. A literatura científica foi selecionada com base na data da publicação, relevância da informação e profundidade de análise dos respetivos tópicos.

II. ESFINGOLÍPIDOS

1. Classificação e estrutura

Os SLs constituem uma classe de lípidos caracterizados pela presença de uma cadeia aminoalcoól de 18 átomos de carbono. Modificações a nível desta estrutura permitem criar uma vasta família de SLs. Genericamente, os SLs são constituídos por 3 elementos fundamentais: uma base esfingóide, um ácido gordo e um grupo polar característico do tipo de SL (Merrill, 2011; Uchida, 2014; Young *et al.*, 2012).

As bases esfingóides mais simples são a esfinganina ou dihidroesfingosina, a esfingosina, a fitoesfingosina e a 6-hidroesfingosina (Figura 1). As LCBs constituem a base molecular da diversidade estrutural dos SLs e incluem moléculas biologicamente ativas tais como a SM, Sph, S1P, Cer, C1P e GSLs (Kihara, 2016; Kolter, 2011; Merrill e Carman, 2015; Young *et al.*, 2012).

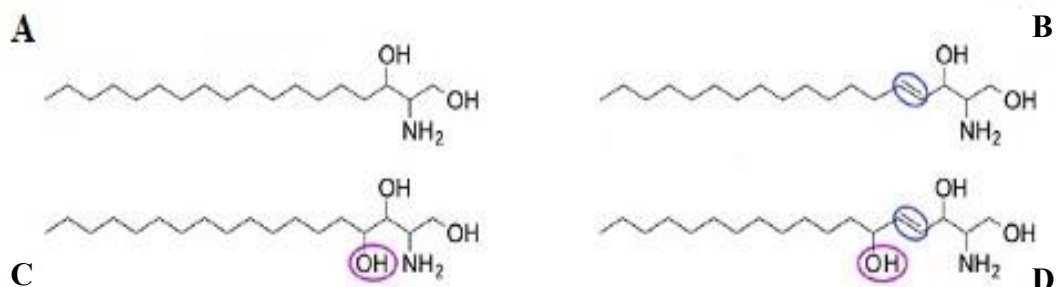


Figura 1. Estrutura das bases esfingóides dos esfingolípido. A: Esfinganina; B: Esfingosina; C: Fitoesfingosina; D: 6-hidroesfingosina (Adaptada de Kihara, 2016).

Nas plantas, a esfinganina sofre uma reação de hidroxilação para produzir a fitoesfingosina. A acilação da fitoesfingosina produz as fitoceramidas. A fosforilação em C1 do grupo hidroxilo da Sph leva à formação da S1P; por outro lado, reações de acilação da Sph com diferentes grupos acil-CoA permitem formar as ceramidas (Kihara, 2016; Kolter, 2011; Merrill e Carman, 2015; Young *et al.*, 2012).

A Sph contém um álcool aminado com uma cadeia hidrocarbonada insaturada de 18 átomos de carbono, pelo que é considerada a base molecular para a formação de novos SLs. A Sph pode ainda sofrer hidroxilação a nível do C4 e C6, o que contribui para a diversidade estrutural deste grupo de moléculas lípidicas. Os ácidos gordos mais frequentemente adicionados a esta molécula são o C18 (ácido esteárico) e o C20 (ácido eicosanóico) (Uchida, 2014).

A Cer é formada por uma Sph modificada por N-acilação a nível do C2, tal como é ilustrado na Figura 2 (Kolter, 2011; Merrill e Carman, 2015; Uchida, 2014; Young *et al.*, 2012).

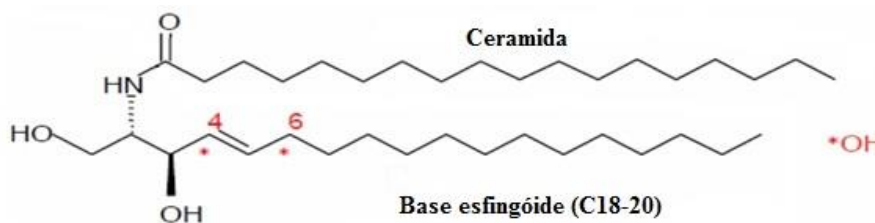


Figura 2. Estrutura da ceramida (Adaptada de Uchida, 2014).

As ceramidas são moléculas precursoras da biossíntese de SLs mais complexos, atuando como substratos em etapas específicas, designadamente na síntese da SM e de glicolípidos. A adição de fosfocolina à Cer permite formar a SM, enquanto que a adição sequencial de monossacarídeos (ou seus derivados) origina a formação dos GSLs. As quatro classes principais de GSLs são os cerebrosídeos (um resíduo de açúcar, Figura 3), os sulfatídeos (um grupo sulfato esterificado a um dos resíduos de açúcar), os gangliosídeos (um ou mais resíduos de ácido siálico, geralmente o ácido N-acetilneuramínico, Figura 4) e os globosídeos (um oligossacarídeo formado por açúcares neutros, geralmente glucose, galactose e N-acetilgalactosamina) (Gault *et al.*, 2010; Kihara, 2016; Kolter, 2011).

No caso dos cerebrosídeos, a adição do açúcar de UDP-glucose ou da UDP- galactose à Cer origina a formação de glucosilceramida (GlcCer) ou galactosilceramida (GalCer,

também designados por glucocerebrosídeo e galactocerebrosídeo, respetivamente (Figura 3). A reação inversa permite produzir a Cer através da ação de hidrolases específicas, as cerebrosidases (Gault *et al.*, 2010; Kihara, 2016; Kolter, 2011).

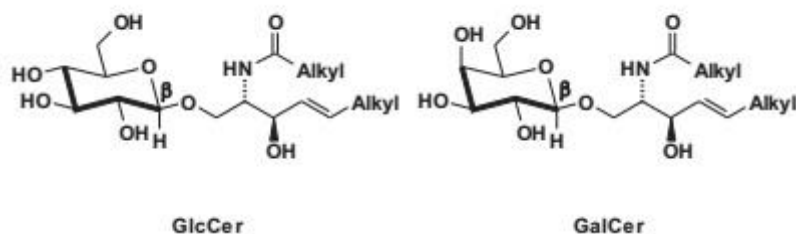


Figura 3. Estrutura dos cerebrosídeos. GlcCer, Glucosilceramida; GalCer, Galactosilceramida (Adaptada de Kolter, 2011).

Ao contrário dos globosídeos, os gangliosídeos são aniónicos a pH 7. Os gangliosídeos formam uma classe de SLs estruturalmente muito heterogénea que inclui mono-, di-, tri- e tetrasialogangliosídeos, respetivamente agrupados em séries M, D, T, e Q (Gault *et al.*, 2010; Kihara, 2016; Kolter, 2011). A estrutura do monosialogangliosídeo 1 (GM1) é ilustrada na Figura 4.

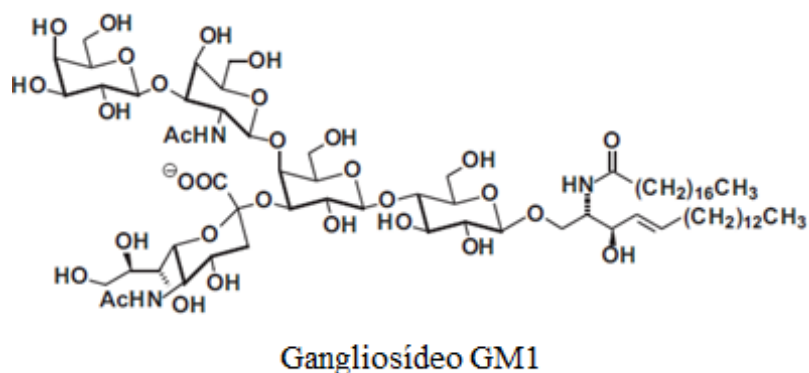


Figura 4. Estrutura do monosialogangliosídeo 1 (GM1) (Adaptada de Kolter, 2011).

2. Aspetos básicos do metabolismo

O metabolismo dos SLs é um processo celular altamente complexo. Ele é caracterizado por uma rede de reações anabólicas e catabólicas que se interligam, envolvendo vários compartimentos celulares (Breslow, 2013; Don *et al.*, 2014; Gault *et al.*, 2010; Merrill, 2011; Young *et al.*, 2012).

Os SLs são sintetizados no retículo endoplasmático (ER) e no complexo de Golgi (GC), e transportados para a membrana plasmática (PM). Através do processo de endocitose, os SLs são incorporados nas membranas de diferentes compartimentos celulares. Deste modo, a composição em SLs da PM pode ser distinta daquela que é observada, por exemplo, em organelos ácidos, na mitocôndria, no ER ou no núcleo (Don *et al.*, 2014; Gault *et al.*, 2010; Young *et al.*, 2012). A Figura 5 ilustra as principais vias metabólicas associadas aos SLs.

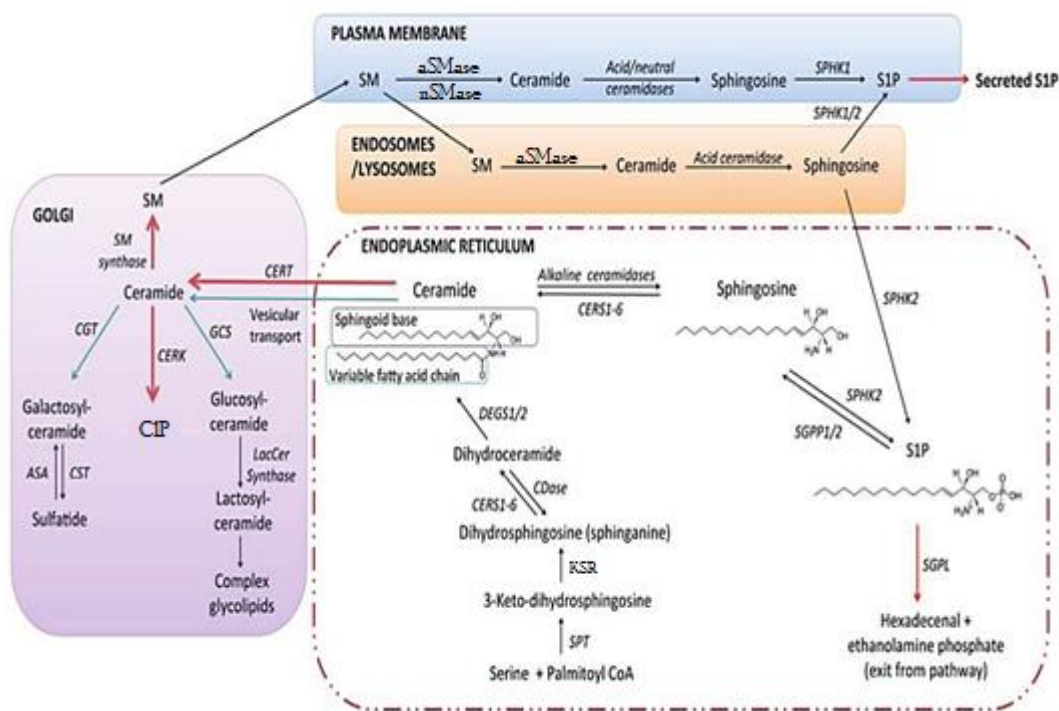


Figura 5. Metabolismo e transporte dos esfingolípidos (Retirado de Don *et al.*, 2014).

A biossíntese inicia-se no ER com a condensação da serina e palmitoil-CoA, através da enzima serina palmitoil transferase (SPT), formando-se a 3-cetodihidroesfingosina. Esta é posteriormente reduzida a dihidroesfingosina (também conhecida por esfinganina) pela enzima 3-cetoesfingosina redutase (KSR). A transferência de ácidos gordos de cadeia variável para um grupo amino livre da esfinganina forma a dihidroceramida. Esta reação é catalisada por um grupo de seis enzimas, as ceramidas sintetases (CerS 1-6). Por ação catalítica da dihidroceramida desaturase (DEGS), a dihidroceramida é convertida em Cer. As CerS têm preferência por substratos distintos, possibilitando a formação de vários tipos de dihidroceramidas. Este facto contribui para a heterogeneidade molecular das ceramidas que, por isso, podem apresentar cadeias acilo com comprimento e grau de insaturação variáveis (Don *et al.*, 2014; Gault *et al.*, 2010; Young *et al.*, 2012).

Tal como referido anteriormente, a Cer atua como precursor biossintético de moléculas esfingolipídicas mais complexas. A presença de várias enzimas em diferentes compartimentos celulares possibilita que a Cer origine SM, cerebrosídeos ou gangliosídeos. A Cer pode, ainda, ser diretamente fosforilada por ação da ceramida cinase (CerK) para formar a C1P (Don *et al.*, 2014; Gault *et al.*, 2010; Young *et al.*, 2012).

No ER, a Cer é usada na síntese de GalCer por ação da enzima galactosilceramida sintetase. Por ser uma molécula que apresenta baixa solubilidade em ambiente aquoso a Cer necessita de um meio de transporte de uma membrana para a outra. Desta forma, as células apresentam duas vias alternativas de transporte: vesicular ou mediado pela proteína de transferência da ceramida (CERT). Através da via vesicular a Cer é transportada do ER para o cis-Golgi. No cis-Golgi, a Cer é convertida em GlcCer por ação da enzima glucosilceramida sintetase (GCS). A GlcCer pode ser transportada das membranas do cis-Golgi para as membranas do trans-Golgi (TGN) através de uma proteína específica capaz de reconhecer a GlcCer, nomeadamente a FAPP2 (*four-phosphate adaptor protein 2*). No TGN, a GlcCer é usada na biossíntese de outros GSLs mais complexos, por exemplo a lactosilceramida pela adição de uma molécula de galactose à GlcCer. A presença de glicosiltransferases transmembranares, como as sialiltransferases no lúmen do GC, permitem a formação de outros GSLs a partir da

GlcCer, os quais são, posteriormente, transportados para a PM. A CERT é responsável pelo transporte da ceramida do ER para o GC, especificamente para o TGN, onde ocorre a síntese da SM (D'Angelo *et al.*, 2013; Gault *et al.*, 2010; Young *et al.*, 2012). Em conclusão, a síntese da GalCer ocorre no ER enquanto que a síntese de GlcCer (e seus derivados) e da SM ocorre a nível do GC.

Os GSLs podem ser transportados da PM para os lisossomas, onde ocorre o catabolismo lisossomal. Este processo progride à medida que os resíduos de açúcar são sequencialmente removidos até à formação de moléculas mais simples, como é o caso dos cerebrosídeos (GlcCer e GalCer). Através de enzimas específicas, tais como as β -glucosidases e β -galactosidases, estas moléculas são hidrolisadas formando novamente a Cer. A Cer lisossomal pode ser hidrolisada em Sph e ácido gordo por ação da ceramidase ácida. A Sph é exportada para o citoplasma e eventualmente transportada para o ER para participar na síntese de SLs. Este processo é conhecido por via de reciclagem (Don *et al.*, 2014; Gault *et al.*, 2010; Young *et al.*, 2012).

No âmbito da via catabólica, a via da esfingomielinase (SMase) é particularmente importante para a homeostasia celular dos SLs. Diferentes SMases catalisam a hidrólise da SM em Cer e no seu grupo funcional, a fosfocolina. Este processo ocorre a nível do sistema endossomal-lisossomal ou a nível da PM (D'Angelo *et al.*, 2013; Young *et al.*, 2012). Presentemente, são conhecidos cinco tipos diferentes de SMases (Adada *et al.*, 2016; Gault *et al.*, 2010; Taniguchi e Okazaki, 2014). Esta família de enzimas será abordada no capítulo seguinte deste trabalho.

3. Função

Os SLs são uma das maiores famílias de lípidos presentes nas membranas biológicas de eucariotas. Encontram-se principalmente na parte externa do folheto da PM, na face luminal da membrana de organelos intracelulares e em algumas lipoproteínas (Kihara, 2016; Merrill, 2011; Young *et al.*, 2012). Tal como anteriormente mencionado, os SLs representam uma classe heterogénea de lípidos que compreende moléculas tipicamente anfipáticas, os GSLs. Os GSLs são constituídos por segmentos de glicanos que

estabelecem ligações O-glicosídicas à parte lipofílica da Cer. De facto, estes segmentos têm um papel crucial na interação celular e na sinalização membranar uma vez que estão numa posição favorável (camada externa da PM) para atuarem como recetores de toxinas e hormonas (Don *et al.*, 2014; Kolter, 2011; Russo *et al.*, 2016).

Os GSLs encontram-se em todos os tecidos humanos. No entanto, estas moléculas são particularmente abundantes na superfície das células do sistema nervoso central. Como tal, são essenciais para a mielinização, transmissão de impulsos nervosos e para a integridade dos axónios neuronais (Kolter, 2011). Por exemplo, a SM é o constituinte principal da bainha de mielina do sistema nervoso central (Gault *et al.*, 2010).

Os SLs têm um papel ativo em processos importantes para a homeostasia das células e dos organismos, tais como a apoptose, diferenciação, sinalização celular, inflamação, angiogénese, endocitose e senescência celular (Gault *et al.*, 2010; Merrill, 2011; Young *et al.*, 2012).

Esta heterogeneidade funcional resulta não só da diversidade estrutural mas também da possibilidade de formação, juntamente com o colesterol, de microdomínios membranares estruturalmente densos designados por “*lipid rafts*” ou cavéolas. Em conjunto com o colesterol, os SLs modulam a fluidez e a espessura das membranas biológicas. Para além disso, os SLs mostram uma elevada capacidade de se associarem entre si nas membranas celulares, protegendo a membrana de danos químicos e mecânicos. Adicionalmente, estas plataformas membranares funcionam como centros de recrutamento, ligação e concentração de proteínas funcionalmente muito distintas (Don *et al.*, 2014; Iwabuchi *et al.*, 2015).

Relativamente aos gangliosídeos, a sua associação a várias doenças humanas, incluindo as Esfingolípídeos, realça a sua importância fisiológica. A maioria das Esfingolípídeos resulta da presença de mutações em genes que codificam enzimas, cofatores proteicos ou transportadores que, globalmente, asseguram a digestão e a reciclagem lisossomal. Estas proteínas são essenciais para a degradação sequencial dos GSLs. Deste modo, as Esfingolípídeos são caracterizadas pela acumulação de metabolitos específicos que resultam de uma deficiência(s) enzimática(s), do defeito

numa proteína(s) ativadora(s) ou de transporte deficiente de produtos catabólicos. A maioria destas doenças são autossômicas recessivas com a exceção da Doença de Fabry que é uma doença ligada ao cromossoma X (Kolter, 2011; Schulze e Sandhoff, 2014). A relação das Esfingolípídeos com os respetivos défices enzimáticos e substratos acumulados é representada na Figura 6.

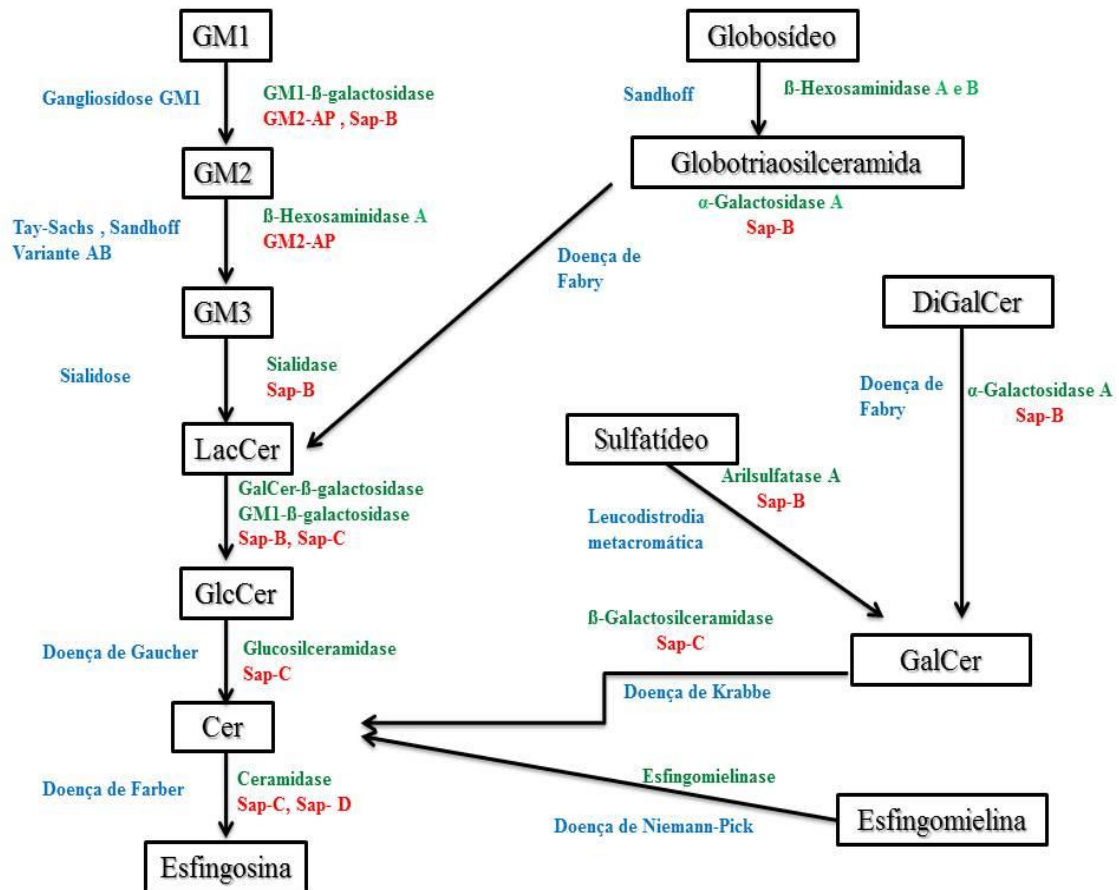


Figura 6. Degradação dos GSLs e Esfingolípídeos. As enzimas estão representadas a verde e as respetivas proteínas ativadoras a vermelho. Quando ocorre uma mutação no gene que codifica uma dessas enzimas ou proteínas ativadoras, esta torna-se ausente ou deficiente originando diversas doenças metabólicas que estão representadas a azul (Adaptada de Schulze e Sandhoff, 2014).

As saposinas (SAPs) são proteínas não enzimáticas que auxiliam a degradação dos GSLs. Tal como ilustrado na Figura 6, as SAPs compreendem cinco proteínas ativadoras: Sap-A, Sap-B, Sap-C, Sap-D e GM2-AP (proteína ativadora do GM2). A

proteína precursora comum das proteínas SAP é a prosaposina. A deficiência em prosaposina origina a acumulação simultânea de vários SLs resultando em morte prematura. Adicionalmente, estudos efetuados em ratinhos revelaram que a deficiência desta proteína está relacionada com a perda da permeabilidade cutânea (Schulze e Sandhoff, 2014).

A prevenção destas doenças hereditárias do metabolismo esfingolípido pode ser efetuada através do diagnóstico pré-natal. Apesar de não existir presentemente cura para estas patologias, é possível atuar no sentido de diminuir a progressão da doença, nomeadamente nas formas sem envolvimento neurológico, recorrendo, por exemplo, à terapia de reposição enzimática, à terapia de redução de substrato e/ou terapia com chaperonas (Kacher e Futerman, 2006).

III. CERAMIDAS

1. Diversidade Estrutural

As ceramidas, tal como já referido anteriormente, são estruturalmente constituídas por cadeias longas de bases esfingóides e por cadeias longas de ácidos gordos que se encontram unidas através de uma ligação amida. No entanto, qualquer tipo de base esfingóide apresenta sempre dois grupos hidroxilo, em C1 e C3, e um grupo amina, em C2 (Figura 1). A classificação das diferentes espécies de ceramida reflete as características estruturais destes dois componentes (Kihara, 2016). A classificação dos FAs é, geralmente, efetuada de acordo com o comprimento da cadeia de carbonos. Com base na informação de artigos de revisão recentes, é proposto o seguinte critério de classificação dos FAs: cadeia curta (C2-C4), média (C5-C10), longa (C11-C20) ou muito longa / ultralonga (\geq C21). A nomenclatura usada “Cer (XY) ” permite discriminar as diferentes classes de ceramidas com base na natureza química do FA (X) e do LCB (Y) (Kihara, 2016; Sahle *et al.*, 2015; Tessema *et al.*, 2017).

A dihidroesfingosina é observada em todos os tecidos mas a sua quantidade é, geralmente, muito reduzida. A Sph encontra-se distribuída de forma ubíqua em todos os tecidos e representa a maior fração de LCBs nos mamíferos. Esta observação reflete o facto de a Sph ser produzida nas duas vias metabólicas, anabólica e catabólica, dos SLs. A fitoesfingosina encontra-se presente apenas em alguns tecidos, designadamente epiderme, intestino e fígado. A 6-hidroesfingosina é observada apenas na epiderme. Deste modo, a epiderme representa o único local onde estas quatro bases esfingóides estão presentes (Kihara, 2016; Tessema *et al.*, 2017).

A diversidade das ceramidas tem especial relevância na epiderme humana. Neste tecido humano as ceramidas são constituídas por em 3 tipos de ácidos gordos: ácido não-hidroxilado, ácido α -hidroxilado e ácido esterificado e ω -hidroxilados. Até à data, foram identificadas na epiderme pelo menos 12 classes de ceramidas (Tabela 1) (Kihara, 2016; Sahle *et al.*, 2015; Tessema *et al.*, 2017).

Tabela 1. Nomenclatura das diferentes classes de ceramidas na epiderme¹.

			Acil-Cers
LCBs \ FAs	Não-hidroxiado (N)	α-hidroxiado (A)	Esterificado ω-hidroxiado (EO)
Dihidroesfingosina (DS)	NDS	ADS	EODS
Esfingosina (S)	NS	AS	EOS
Fitoesfingosina (P)	NP	AP	EOP
6-hidroxi esfingosina (H)	NH	AH	EOH

¹ Tabela adaptada de Kihara, 2016.

O processo de alongação dos FAs permitir a formação de cadeias muito longas ou ultralongas. Este processo requer o uso de enzimas específicas designadas por elongases (ELOVL1-7). Estas enzimas são responsáveis pela produção das acil-ceramidas representadas na Tabela 1. As elongases diferenciam-se pelo padrão de distribuição nos tecidos humanos e pela especificidade para o substrato. A sua ação origina a formação de acil-ceramidas que variam estruturalmente quanto ao comprimento da cadeia e ao grau de insaturação. O processo de produção de ceramidas aciladas pode ocorrer em 3 compartimentos celulares, nomeadamente no citosol, na mitocôndria e no ER, e compreende 4 etapas essenciais: condensação, redução, desidratação e novamente redução (Jump, 2009; Kihara, 2016; Tessema *et al.*, 2017).

As acil-ceramidas específicas da epiderme são a EODS; EOSph; EOP e a EOH. Estruturalmente diferenciam-se pela presença de um ácido gordo ω -hidroxiado (cadeia

longa) esterificado a outro ácido gordo, frequentemente o ácido linoleico (C18:2). A Figura 7 ilustra a heterogeneidade estrutural das ceramidas. Na maioria dos tecidos, as acil-ceramidas apresentam entre C16 a C30 átomos de carbonos. No entanto, tanto nas células da epiderme como nas células espermatogénicas dos testículos observam-se acil-ceramidas de cadeias ultralongas (≥ 30 carbonos) (Kihara, 2016; Tessema *et al.*, 2017).

Em conclusão, a heterogeneidade estrutural das ceramidas resulta não só da presença de diferentes tipos de bases esfingóides mas também da enorme diversidade observada a nível dos ácidos gordos. Esta diversidade estrutural tem implicações não só a nível da fisiologia celular mas também terapêuticas, e estes aspetos serão desenvolvidos em secções posteriores do presente trabalho.

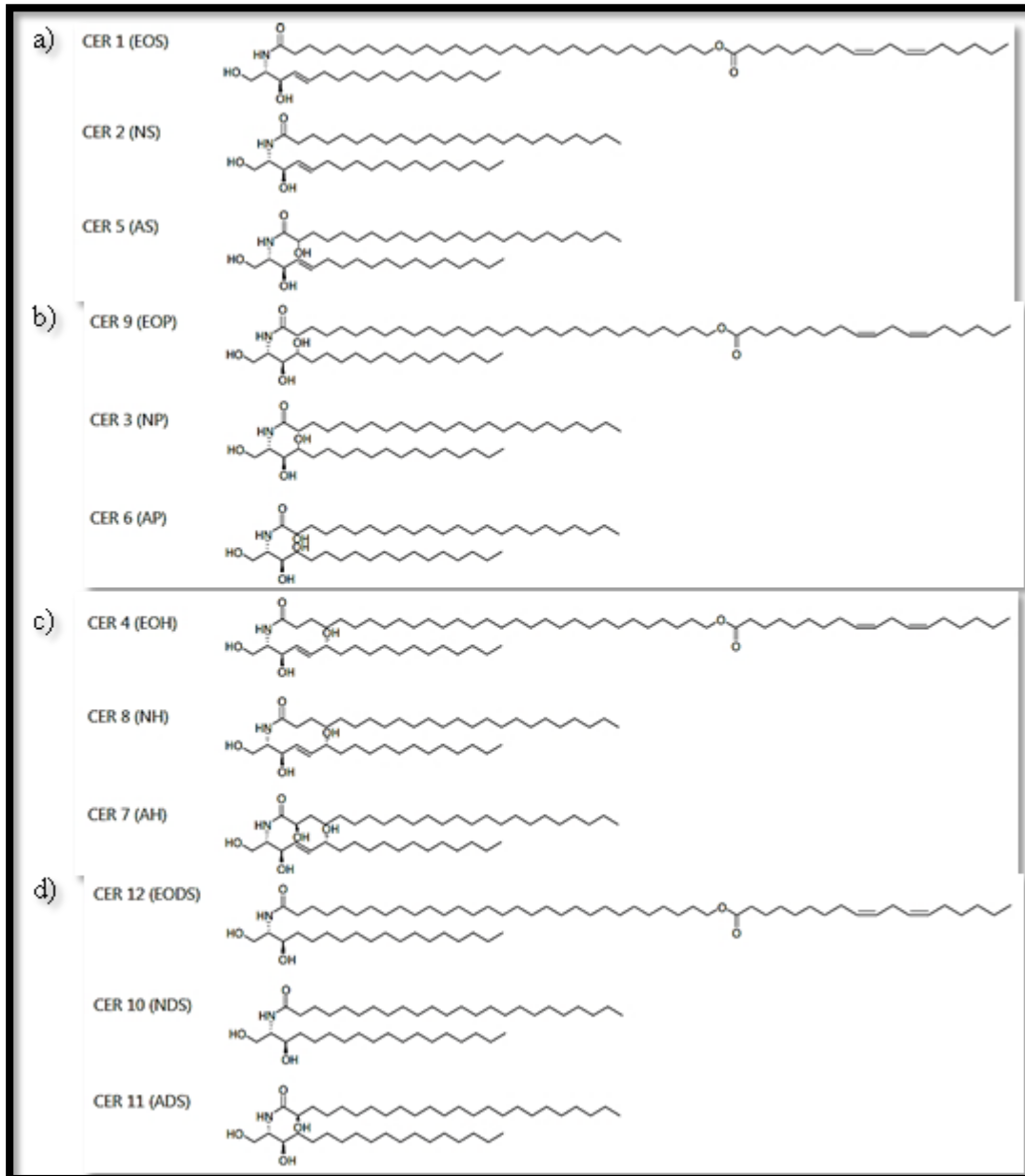


Figura 7. Heterogeneidade estrutural das ceramidas. Vários autores renomearam a nomenclatura das ceramidas visando a sua simplificação (Adaptada de Tessema *et al.*, 2017).

2. Síntese de *novo* e o ciclo da esfingomielina

Tal como anteriormente referido, a Cer pode ser produzida através de três vias metabólicas, designadamente a síntese de *novo*, a via catabólica e a via de reciclagem. Existe uma quarta via metabólica conhecida por ciclo da esfingomielina (Figura 5) que decorre na PM. No ciclo da esfingomielina participam duas famílias de enzimas, as esfingomielinases e as ceramidases, que também atuam num outro compartimento celular, o sistema endossomal-lisossomal (Don *et al.*, 2014; Gault *et al.*, 2010; Young *et al.*, 2012).

A SM é o SL mais abundante nas células eucarióticas, bem como o principal constituinte da PM. Tanto a síntese como o catabolismo da SM são processos importantes para a homeostasia celular uma vez que o défice em SM causado por deficiência na síntese de *novo* ou por mutações no gene codificante da proteína CERT, ou o excesso de SM causado por mutações no gene codificante da esfingomielinase ácida (Figura 5) podem ser responsáveis pela morte celular (Bienias *et al.*, 2016; Don *et al.*, 2014; Gault *et al.*, 2010).

A síntese de SM ocorre através da ação de diferentes esfingomielinas sintetases (SMS), a SMS1 e SMS2. Estas enzimas promovem a transferência do grupo funcional fosfocolina da fosfatidilcolina (PC) para o grupo hidroxilo da Cer, originando a formação de SM e diacilglicerol (DAG). Ambas as enzimas estão localizadas no lúmen do *trans*-Golgi mas apenas a SMS2 está presente na PM, regulando diretamente os níveis de SM, Cer, DAG e PC nesse compartimento celular (Bienias *et al.*, 2016; Gault *et al.*, 2010).

No ciclo da esfingomielina participam diferentes SMases (também conhecidas por esfingomielina fosfodiesterases, EC 3.1.4.12) que tipicamente se distinguem pela localização subcelular, pH ótimo de atividade enzimática e dependência de catiões divalentes. As 3 formas principais (Tabela 2) são a SMase ácida (aSMase), a SMase alcalina (Alk-SMase) e a SMase neutra (nSMase). A atividade da nSMase resulta da expressão de 4 genes diferentes. A MA-nSMase (nSMase associada à mitocôndria,

Tabela 2) é a nSMase mais recentemente identificada (Airola e Hannun, 2013; Gault *et al.*, 2010; Taniguchi e Okazaki, 2014).

Tabela 2. A família das esfingomielinases humanas.¹

Esfingomielinase	Gene²	Cromossoma³	Localização celular⁴
aSMase	<i>SMPD1</i>	11	Lisossoma e PM
Alk-SMase	<i>ENPP7</i>	17	Folheto externo da PM
nSMase1	<i>SMPD2</i>	6	PM
nSMase2	<i>SMPD3</i>	16	PM e GC
nSMase3	<i>SMPD4</i>	2	ER
MA-NSMase	<i>SMPD5</i>	8	Mitocôndria

¹ Informação retirada de Adada *et al.*, 2016; Airola e Hannun, 2013; ^{2,3,4} Informação retirada de GeneCards.

No lisossoma, a SM é degradada em Cer e fosfocolina através da ação da aSMase. Na PM, a SM também pode ser degradada por SMases e a Cer produzida reutilizada na síntese de SM pela SMS2, razão pela qual esta relação entre a SM e a Cer é conhecida pelo ciclo da esfingomielina (Figura 8) (Adada *et al.*, 2016; Bienias *et al.*, 2016; Gault *et al.*, 2010; Taniguchi e Okazaki, 2014).

A importância fisiológica do ciclo da esfingomielina é evidenciada, por exemplo, pela sua desregulação em algumas patologias do sistema nervoso central, por exemplo a doença de Niemann-Pick (Figura 6) que é caracterizada pela acumulação lisossomal de SM em virtude da atividade enzimática da aSMase ácida se encontrar deficiente (Bienias *et al.*, 2016; Gault *et al.*, 2010).

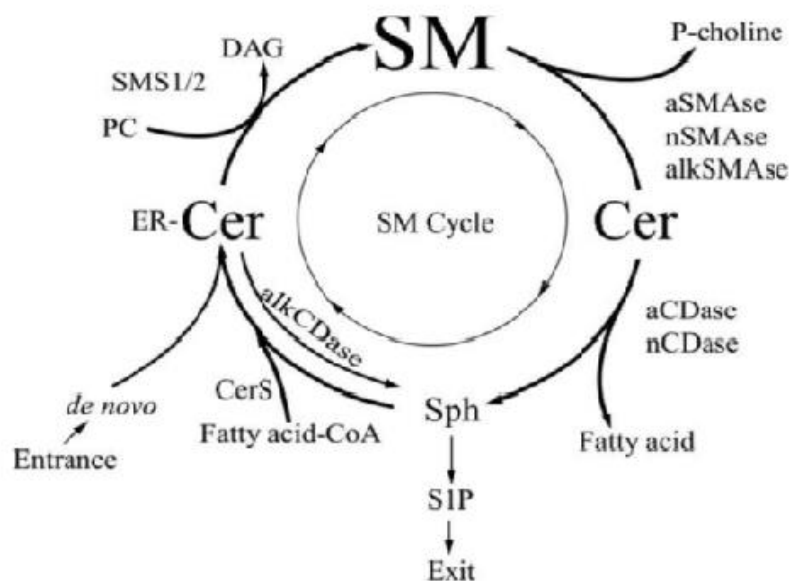


Figura 8. Ciclo da esfingomielina (Retirado de Adada *et al.*, 2016).

3. Fisiopatologia da ceramida/ceramidase

À semelhança da participação das SMases na degradação da SM, também o nível intracelular das ceramidas depende da ação de enzimas específicas, as ceramidases (CDases, N-acilesfingosina desacilase, EC 3.5.1.23). As ceramidases degradam a ceramida em Sph e ácido gordo (Coant *et al.*, 2017). A esfingosina produzida por ação das CDases pode ser usada na síntese *de novo* de SLs (via de reciclagem) ou atuar como substrato para a produção de S1P através da ação de esfingosinas cinases (SPHK 1 e SPHK2) (Coant *et al.*, 2017; Don *et al.*, 2014; Gault *et al.*, 2010).

As CDases apresentam diferenças quanto à especificidade para o substrato, pH ótimo de atividade enzimática e localização subcelular. As Tabelas 3 e 4 resumem a informação principal relativa às cinco ceramidases já identificadas e caracterizadas: ácida (aCDase), neutra (nCDase) e alcalina (AlkCDase) (Coant *et al.*, 2017).

Tabela 3. A família de ceramidases humanas.¹

Ceramidase	Gene	Cromossoma	pH	Localização celular
aCDase	<i>ASAH1</i>	8	4,5	Lisossoma
nCDase	<i>ASAH2</i>	10	7,0	PM
AlkCDase1	<i>ASAH3</i>	19	8,5	ER
AlkCDase2	<i>ASAH3L</i>	9	9,0	GC
AlkCDase3	<i>PHCA</i>	11	9,5	GC/ER

¹ Adaptado de Coant *et al.*, 2017; Mao, 2008.

A aCDase é a única ceramidase que se encontra no compartimento lisossomal e, por isso, a sua atividade é extremamente importante na regulação do nível intracelular de Cer e metabolitos derivados, designadamente a Sph. Esta enzima é responsável por desacilar espécies de Cer que são produzidas por degradação de SLs provenientes da PM e exibe uma maior atividade enzimática com ceramidas C12 e C14. Verifica-se que a sobreexpressão desta enzima está na causa de doenças como melanoma; cancro da cabeça, pescoço, próstata e peito; diabetes tipo II; e na doença de Alzheimer. Por outro lado, o défice da atividade enzimática causado por mutações genéticas no gene *ASAH1* é responsável pela doença de Farber (Figura 6) (Coant *et al.*, 2017; Mao, 2008).

A nCDase associada à PM é essencial para a regulação da produção da Sph e S1P neste compartimento celular. A ausência desta enzima resulta na acumulação de Cer e reduz significativamente o crescimento celular (Coant *et al.*, 2017; Mao, 2008).

As AlkCDases compreendem 3 formas codificadas por genes distintos (Tabela 3). A AlkCDase 1 é expressa, principalmente, na epiderme, especificamente nos queratinócitos, enquanto que as restantes duas formas são expressas em vários tecidos (Tabela 4). A AlkCDase 1 tem especificidade para ceramidas C24 e C24:1; no entanto, não apresenta atividade enzimática com a dihidroceramida ou fitoceramida. Como a pele é enriquecida em fitoceramidas, esta característica deverá ser fundamental para manter um nível intracelular adequado desta espécie de ceramida na pele. A AlkCDase

2 exibe especificidade para ceramidas C16, C18 e C20, cadeias longas de dihidroceramida e fitoceramidas com cadeia insaturada de acilo. A AlkCDase 3 apenas catalisa a hidrólise de fitoceramidas, dihidroceramidas e ceramidas com ácidos gordos insaturados \leq C20 (Coant *et al.*, 2017; Mao, 2008).

Tabela 4. Fisiopatologia das ceramidases humanas.¹

Ceramidases	Expressão tecidual	Função biológica	Doença
aCDase	Coração; Rim; Placenta; Pulmões e Músculo-esquelético ² ; Pele ³	Apoptose; Ciclo celular; Diferenciação celular e Autofagia	Doença de Farber; Melanoma; Cancro da cabeça, pescoço, próstata e mama; Diabetes tipo II e Alzheimer
nCDase	Intestino; Colón; Rim; Fígado; Cérebro; Pulmões; Coração	Apoptose; Ciclo celular; Necroptose	Cancro do cólon; Isquemia
AlkCDase 1	Pele	Homeostasia das células da pele	Desconhecido
AlkCDase 2	Em todos os tecidos	Apoptose; Necrose; Adesão celular	Desconhecido
AlkCDase 3	Em todos os tecidos	Apoptose; Proliferação celular	Leucemia mielóide aguda; Cancro do cólon e Colite

¹ Adaptado de Coant *et al.*, 2017; ² Resultados de Northern Blot em extratos de tecidos humanos (Li *et al.*, 1999); ³ Atividade enzimática em extratos de estrato córneo (Jin *et al.*, 1994).

Esta família de enzimas participa na regulação de vários processos biológicos, tais como proliferação celular, diferenciação celular, apoptose e autofagia. Mutações nos genes que codificam estas enzimas têm sido associadas a diversas doenças inflamatórias, neurodegenerativas e tumorais (Tabela 4) (Coant *et al.*, 2017; Don *et al.*, 2014; Gault *et al.*, 2010). A implicação das CDases em processos fisiopatológicos tão diversos é

explicada, pelo menos em parte, pelo seu envolvimento no reóstato Cer/S1P. A Cer e S1P participam de forma distinta na sinalização celular: a Cer é pró-apoptótica enquanto que a S1P é anti-apoptótica. Este mecanismo é regulado de forma coordenada através de enzimas responsáveis pela inter-conversão entre Cer e S1P e essa regulação visa controlar o destino das células (apoptose ou proliferação celular). A degradação da Cer através da ação enzimática de CDases origina a produção de Sph que, por sua vez, pode ser convertida em S1P pela ação enzimática da SPHK. No entanto, a S1P pode ser degradada através da ação enzimática da S1P liase (processo irreversível) ou ser desfosforilada através da ação de esfingosina-1-fosfato fosfatases (SGPP1) e 2 (SGPP2) originando a formação de Sph. A Sph proveniente da ação direta das CDases ou da hidrólise de S1P pode ser acilada produzindo Cer. Se a atividade enzimática da S1P liase estiver aumentada, o nível intracelular de S1P diminui e, inversamente, se a atividade enzimática da S1P liase estiver inibida, o nível de S1P aumenta. Do mesmo modo, um déficit ou excesso de CDases pode estar associado a um excesso ou déficit de ceramidas, respetivamente, ou seja, à doença de Farber ou ao cancro (Japtok *et al.*, 2014; Newton *et al.*, 2015).

IV. METABOLISMO, FUNÇÃO E PATOLOGIA DAS CERAMIDAS NA EPIDERME

1. Anatomia e fisiologia da pele - aspetos básicos

A pele é o maior órgão do corpo humano. As características anatómicas principais da pele são ilustradas na Figura 9. A pele é constituída por duas grandes camadas: a epiderme e a derme. A hipoderme, também conhecida por tecido celular subcutâneo, é a camada mais profunda e espessa da pele; não faz parte da pele por ser constituída por tecido conjuntivo laxo e maioritariamente por adipócitos que são responsáveis pelo isolamento e armazenamento térmico (Sahle *et al.*, 2015).

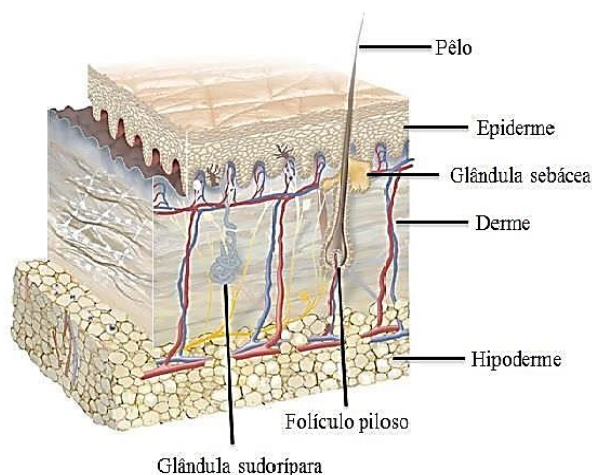


Figura 9. Representação esquemática da anatomia da pele. As estruturas anexas da pele são o pêlo, o folículo piloso e as glândulas (Adaptada de Beiersdorf, 2017).

A epiderme é um epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, que assenta numa membrana basal. Ela constitui a fase mais externa da pele e a sua espessura varia de acordo com a região do corpo. Apesar de estarem presentes várias terminações nervosas, a epiderme é avascularizada pelo que os nutrientes atingem este epitélio por difusão através dos vasos sanguíneos presentes na derme. A diferenciação da epiderme é efetuada de acordo com a profundidade, maturação e morfologia, compreendendo cinco estratos ou camadas celulares distintas: camada córnea, camada lúcida, camada

granulosa, camada espinhosa e camada basal (Figura 10). A maioria das células são queratinócitos que produzem a queratina e conferem resistência e permeabilidade à epiderme. Outros tipos celulares, presentes em minoria, são as células de Langerhans, células de Merkel e os melanócitos (Seeley *et al.*, 2003).

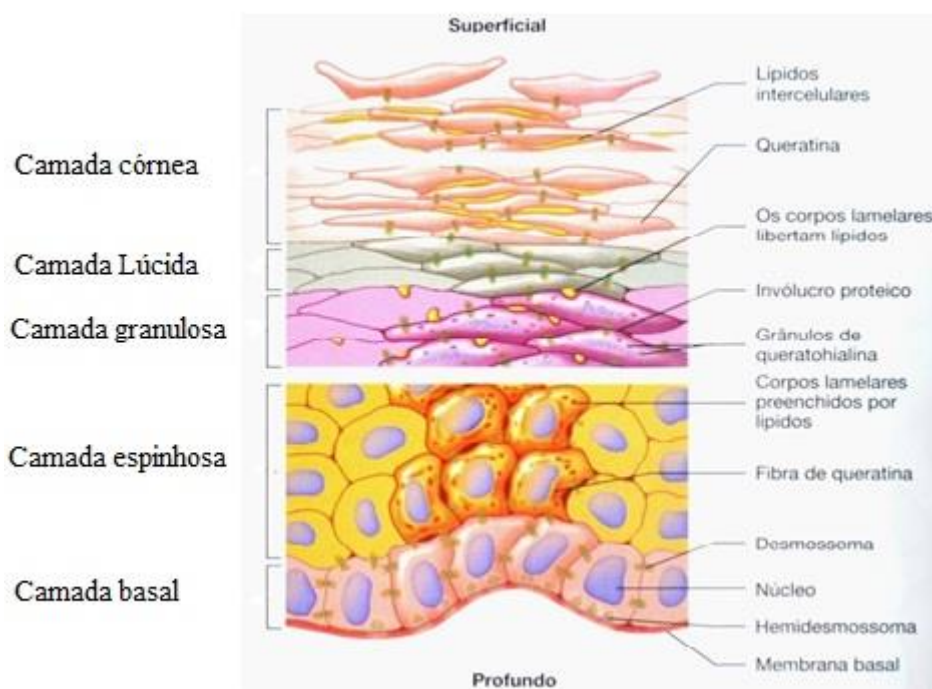


Figura 10. Anatomia da epiderme (Adaptada de Seeley *et al.*, 2003).

A camada córnea (ou estrato córneo, SC) é a camada mais externa da epiderme. Esta camada é composta por cerca de vinte e cinco camadas de células queratinócitos cornificadas que se designam por corneócitos. O desenvolvimento destas células termina com a descamação cutânea que é dependente da ação de enzimas específicas (proteases) localizadas no espaço extracelular. Os desmossomas que unem os corneócitos passam a designar-se por corneodesmossomas devido à incorporação da enzima corneodesmosina. Estes são responsáveis pela coesão entre os corneócitos (Coderch *et al.*, 2003; Elias, 2008; Seeley *et al.*, 2003).

A camada lúcida, constituída por queratinócitos que estão firmemente aglomerados, encontra-se apenas presente em algumas regiões do corpo (palmas das mãos e zona

plantar dos pés). É uma camada fina e quase transparente devido à querato-hialina se encontrar dispersa em torno das fibras de queratina (Seeley *et al.*, 2003).

A camada granulosa localiza-se entre a camada córnea e a camada espinhosa, apresentando duas a cinco camadas de células queratinócitas. Estas contêm grânulos de querato-hialina que são constituídos maioritariamente pela proteína precursora da filagrina (FLG, proteína associada aos filamentos intermédios), a pró-filagrina. É constituída também pelos corpos lamelares que no seu interior contem lípidos como colesterol, fosfolípidos, SM e GSLs, e várias enzimas que são responsáveis por converter estes lípidos em lípidos sem segmentos polares, tais como ácidos gordos e ceramidas. Estas moléculas lípidicas particularmente hidrófobas são essenciais para a manutenção da permeabilidade da barreira cutânea (Feingold, 2014; Kim e Leung, 2012).

A camada espinhosa apresenta oito a dez camadas de células multifacetadas que à medida que migram para a superfície vão ficando mais achatadas. É composta por células queratinócitas diferenciadas unidas por desmossomas e por um cimento intercelular de lipoproteínas e glicoproteínas (Seeley *et al.*, 2003).

A camada basal é a camada mais profunda da epiderme e está localizada acima da membrana basal. É constituída apenas por uma linhagem de células cúbicas ou cilíndricas onde ocorre a proliferação e constante replicação das células queratinócitas. Os queratinócitos são responsáveis por produzir queratina e citoquinas envolvidas em reações inflamatórias e imunológicas da pele. Estes queratinócitos encontram-se ancorados à membrana basal através dos hemidesmossomas e a coesão entre estes é feita por desmossomas (Seeley *et al.*, 2003).

A derme é constituída por uma camada de tecido conjuntivo de suporte à epiderme. Este tecido é composto por elementos celulares, tais como fibroblastos, células adiposas e macrófagos. A derme compreende duas camadas: a camada reticular com tecido conjuntivo denso não modelado e a camada papilar que corresponde às papilas dérmicas com tecido conjuntivo frouxo. O tecido conjuntivo contém componentes essenciais para a pele, designadamente ácido hialurónico e proteínas, tais como o colagénio, a elastina e

a FLG, que conferem resistência, firmeza e flexibilidade à pele. São também observadas glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas, vasos sanguíneos e linfáticos, terminações nervosas e os músculos eretores do pêlo. Esta camada é altamente vascularizada tornando-se responsável pela nutrição e termorregulação da pele (Seeley *et al.*, 2003).

A constituição da pele está adaptada à sua atuação como primeira linha de defesa contra agressões internas e externas. A sua função depende do equilíbrio dinâmico que se estabelece entre as suas propriedades físicas, químicas e mecânicas, e que se refletem na sua capacidade de resposta a processos inflamatórios, imunitários e metabólicos. A integridade da barreira cutânea é essencial para a manutenção de uma permeabilidade adequada que evite não só a perda de água e de eletrólitos pela derme, mas também que impeça a entrada de substâncias ativas ou de microrganismos que possam ser prejudiciais à saúde humana. Modificações a nível da constituição da pele podem, por isso, originar o aparecimento de alterações cutâneas que, eventualmente, poderão conduzir a doenças da pele (Li *et al.*, 2016; Sahle *et al.*, 2015).

2. Papel dos lípidos na barreira cutânea

O SC é formado por corneócitos e lípidos (Figura 11). A formação do SC implica uma série de eventos sequenciais que estão bem estabelecidos. Resumidamente, a permeabilidade da membrana celular do queratinócito aumenta, tornando-se mais permeável a iões, especialmente o cálcio, que ativam peptidases que convertem a profilagrina em FLG. Esta proteína está presente nos grânulos de querato-hialina e é responsável por agregar a queratina e outras proteínas nas camadas mais superficiais da pele para a formação do SC. Com a degeneração do núcleo celular, as células achatam e o alinhamento de moléculas de queratina cria o envelope cornificado (CE). Para além disso, as transglutaminases (TGases) são enzimas dependentes de cálcio responsáveis por catalisar a ligação de proteínas importantes na formação do CE, tais como a loricrina, involucrina e uma pequena proteína rica em prolina. Deste modo, o CE forma-se na fase final de diferenciação dos queratinócitos que passam a denominar-se corneócitos. Os aminoácidos resultantes da degradação posterior da FLG são utilizados na formação dos fatores naturais de hidratação (NMFs) que são responsáveis pela hidratação da camada córnea e pela manutenção do pH ácido da pele. Durante a

formação dos corneócitos, as células da camada granulosa libertam o conteúdo lípidico dos corpos lamelares para o espaço extracelular formando a matriz lamelar lípida. Esta matriz, composta por ceramidas, ácidos gordos livres e colesterol numa quantidade equimolar é importante para a homeostasia celular e manutenção da permeabilidade cutânea. Os corneócitos presentes no CE oferecem a coesão necessária a esta estrutura epidérmica, evitando a perda de água transepidérmica (TEWL) e a entrada de alergénios, produtos químicos e agentes infecciosos. Qualquer disfunção na renovação e diferenciação celular pode provocar alterações cutâneas graves (Elias e Schmuth, 2009; Feingold e Elias, 2014; Hitomi, 2005; Holleran *et al.*, 2006; McLean, 2016; Tessema *et al.*, 2017; Zeeuwen, 2004).

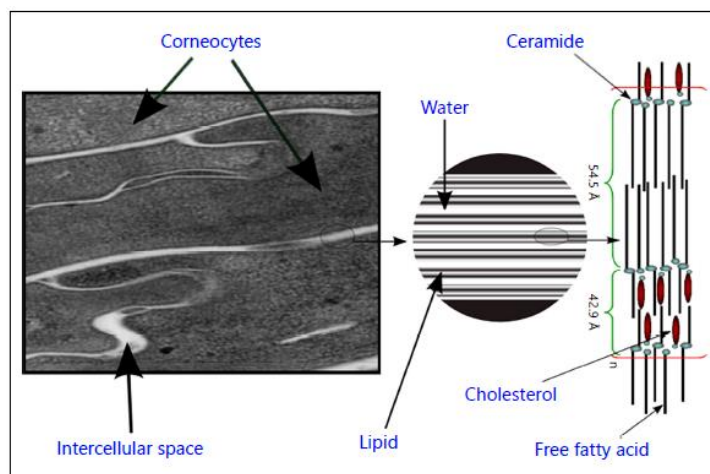


Figura 11. Esquema representativo da secção do estrato córneo (Retirado de Sahle *et al.*, 2015).

A nível das moléculas lípidicas, os queratinócitos produzem pela via da síntese *de novo* grandes quantidades de glucocerebrosídeos e SM. Estas moléculas lípidicas são secretadas na camada córnea onde são convertidas em várias espécies de ceramidas. Estas moléculas de Cer, ou seus derivados, participam em processos diversos, tais como proliferação, diferenciação e/ou apoptose, e são responsáveis pela manutenção da integridade da barreira cutânea e pela redução de TEWL (Feingold e Elias, 2014). De facto, a Cer é responsável por regular não só as funções dos queratinócitos, mas também a função das células do sistema imunitário da pele uma vez que tem impacto no reóstato

Cer/S1P. Deste ponto de vista, a redução desta razão induz a diferenciação dos queratinócitos o que está de acordo com as suas propriedades anti-apoptóticas, atuando de forma antagonista às ceramidas (Japtok *et al.*, 2014). A S1P desempenha, ainda, um papel fundamental na homeostasia das células dendríticas (células apresentadoras do antígeno aos linfócitos T após o seu processamento intracelular) por modelar diversas funções desde a apresentação dos antígenos à interação com os linfócitos T (Japtok *et al.*, 2014).

Em conclusão, os SLs desempenham um papel fundamental a nível da barreira cutânea, assumindo funções estruturais e biológicas indispensáveis à viabilidade da epiderme. Alterações nestas moléculas lípidicas constituintes do SC podem originar manifestações cutâneas e, subsequentemente, várias doenças inflamatórias da pele (Coderch *et al.*, 2003; Elias, 2008). Deste ponto de vista, alterações no nível de Cer, e de outros SLs metabolicamente interligados, têm sido associadas a várias dermatoses cutâneas (Elias e Schmuth, 2009; Japtok *et al.*, 2014). As implicações patológicas e terapêuticas dessas alterações serão a seguir abordadas.

3. Ceramida e doenças inflamatórias da pele

i. Dermatite atópica

A dermatite atópica (AD) ou eczema atópico é uma dermatose inflamatória crónica da pele que está associada a uma deficiência na barreira cutânea e ao aumento da TEWL (McLean, 2016). De acordo com Li *et al.*, a AD é uma das dermatoses inflamatórias mais comuns, afetando cerca de 15% a 20% das crianças e 1% a 3% dos adultos que apresentam dermatoses (Li *et al.*, 2016).

Características clínicas

O diagnóstico da AD baseia-se essencialmente na observação das manifestações clínicas típicas da doença no corpo e na zona do rosto (Figura 12). A identificação da doença em idade precoce é muito importante para possibilitar atuar o mais precocemente possível

no controlo da sintomatologia e, desse modo, atenuar os sintomas até à fase adulta (Li *et al.*, 2016).



Figura 12. Ilustração da dermatite atópica no rosto (Adaptada de Beiersdorf, 2017).

Clinicamente, a sintomatologia desta doença inclui prurido intenso, eritemas, pápulas, vesículas, escoriações e crostas. Um dos sintomas mais prevalentes na pele atópica é a xerose que muitas das vezes é acompanhada por lesões descamativas. A patogenicidade desta dermatose é complexa e multifatorial, não se encontrando ainda bem esclarecida. No entanto, tem sido associada, principalmente, à deficiência na barreira cutânea, debilidade do sistema imunológico e reações alérgicas, fatores genéticos e fatores ambientais. Todos estes fatores parecem interagir entre si agravando esta doença. O uso excessivo de detergentes, bem como o uso inadequado de cosméticos tópicos, provocam irritações cutâneas que podem agravar esta patologia. Portanto, é de esperar que se torne difícil determinar se a disfunção na barreira cutânea é um fator primário da AD ou apenas um evento secundário resultante da alteração de vários fatores endógenos e/ou exógenos (Brown, 2017; Holleran *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2016).

Mecanismos patogénicos

Até à data, muitos são os estudos que sugerem que a patogenia da AD possa estar associada a fatores genéticos, imunológicos ou metabólicos. A complexidade dos

mecanismos patogénicos subjacentes à AD e a possível relação entre eles é ilustrada na Figura 13.

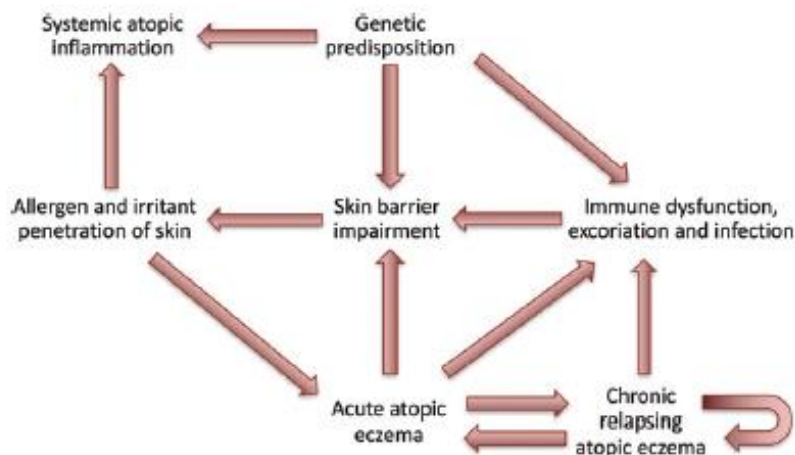


Figura 13. Mecanismos patogénicos da dermatite atópica (Retirado de Brown, 2017).

Durante a diferenciação da epiderme ocorrem, sequencialmente, processos de proliferação, diferenciação e morte celular. Cada um destes processos é caracterizado pela expressão de um conjunto de proteínas específicas. Mutações nos genes codificantes dessas proteínas poderão afetar a fisiologia da barreira cutânea e, desse modo, contribuir para o aparecimento e/ou evolução da AD (Li *et al.*, 2016; Lyons *et al.*, 2015). Tal como mencionado anteriormente, a pró-filagrina (proteína precursora da FLG) é uma das principais proteínas constituintes dos grânulos de queratina da epiderme. Mutações no gene *FLG* que está localizado no cromossoma 1q21.3 constituem um importante fator de risco para o desenvolvimento da AD. O défice de FLG tem como efeito primário a incapacidade de retenção de água transepidérmica por parte dos corneócitos o que resulta numa diminuição da hidratação do SC (Elias, 2008; Lyons *et al.*, 2015). Para além da proteína FLG, outras duas proteínas, a corneodesmosina e a desmogleína-1, ambas constituintes dos desmossomas, estão associadas à AD. Tal como mencionado anteriormente, os desmossomas conferem proteção e coesão epidérmica. Segundo Lyons *et al.*, mutações nos respetivos genes codificantes foram observadas em doentes com formas severas de AD (Lyons *et al.*, 2015).

O sistema imunológico também desempenha um papel importante na patogênese da AD. Estudos recentes demonstraram que doentes portadores de mutações patogênicas no gene *FLG* têm não só um risco maior de desenvolvimento precoce da doença como também são mais suscetíveis ao desenvolvimento de alergias (alimentares, asma, rinite alérgica, entre outras), apresentando níveis elevados de anticorpos IgE. Por outro lado, no caso de progenitores afetados com essas alergias, os filhos têm maior suscetibilidade para o desenvolvimento da AD. Este estudo relaciona, assim, a inflamação com alterações na barreira cutânea (Elias e Schmuth, 2009; Lyons *et al.*, 2015). Segundo Lyons *et al.*, em doentes com alterações nos genes codificantes da corneodesmosina e desmogleína-1 foi observado o desenvolvimento de vários tipos de alergia, tais como a asma e a rinite alérgica (Lyons *et al.*, 2015). Em doentes com AD também foi observada uma desregulação no balanço dos linfócitos T *helper* (Th1 e Th2). De salientar que tanto as citocinas das células Th1 como as das células Th2 podem influenciar diretamente os níveis de Cer no SC provocando, conseqüentemente, uma disfunção da barreira cutânea (Borodzicz *et al.*, 2016; Lyons *et al.*, 2015; Sawada *et al.*, 2012).

Tal como referido anteriormente, as ceramidas constituem o lípido intercelular mais abundante no SC. Na AD, a composição qualitativa e quantitativa das ceramidas e acilceramidas encontra-se alterada: enquanto que o nível de NH, NP, EOS, EOP e EOH está diminuído, especialmente NP e EOH, o nível de AS, AH, AP e ADS está aumentado (nomenclatura apresentada na Tabela 1). A Figura 14 mostra as várias alterações metabólicas conducentes à deficiência de Cer no SC de indivíduos com AD (Holleran *et al.*, 2006; Kihara, 2016; Li *et al.*, 2016; Tessema *et al.*, 2017).

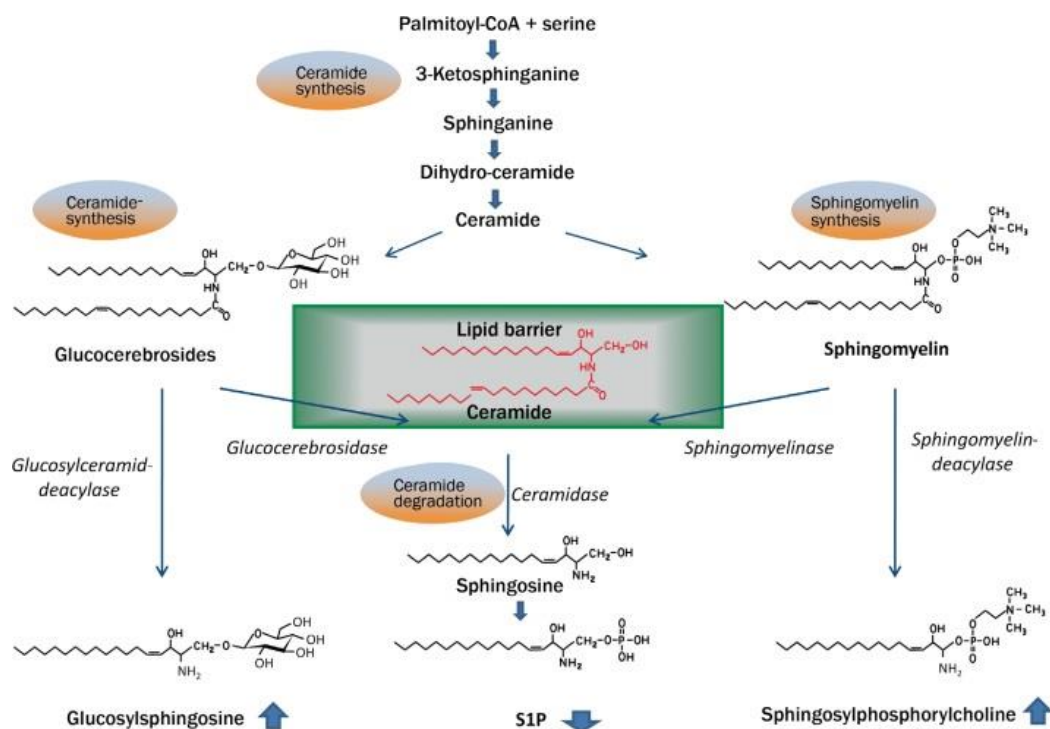


Figura 14. Metabolismo da ceramida na dermatite atópica (Retirado de Japtok *et al.*, 2014).

As ceramidas presentes no SC podem ser obtidas através da síntese de *novo*, pela conversão da palmitoil-CoA e da serina em 3-cetoesfinganina através da ação da enzima SPT, ou pela hidrólise da GlcCer e da SM pela β -glucocerebrosidase e aSMase, respetivamente. Os níveis de Cer são também regulados pelas CDases. A manutenção do equilíbrio dinâmico entre a biossíntese e a degradação das ceramidas é importante para a homeostasia da barreira epidérmica uma vez que alterações nesse equilíbrio podem conduzir ao aparecimento da AD (Tessema *et al.*, 2017).

O nível reduzido de ceramidas no SC de doentes com AD pode ser explicado por uma atividade elevada da enzima esfingomielina desacilase que é responsável pela desacilação da SM em esfingosilfosforilcolina. O mesmo se verifica em relação à GlcCer que ao ser degradada pela respetiva desacilase origina a glucosil-sfingosina. Os SLs desacilados são conhecidos por liso esfingolípido. Consequentemente, estes produtos resultantes da ação das desacilases, isto é os liso esfingolípido, também estão aumentados, o que poderá explicar a diminuição de Cer e Sph (efeito da competição de

2 enzimas para o mesmo substrato) (Borodzicz *et al.*, 2016; Holleran *et al.*, 2006). Adicionalmente, também as atividades enzimáticas da aSMase e nSMase encontram-se significativamente reduzidas, podendo este efeito ser explicado por uma deficiência na prosaposina. Esta diminuição também conduz a um défice de Cer. A AlkCDase é altamente expressa na epiderme mas o seu nível de expressão não está significativamente alterado em doentes com AD. Curiosamente, a atividade enzimática da aCDase está diminuída e esta observação é consistente com a redução do nível de Sph (Holleran *et al.*, 2006). Outros autores referem, ainda, que a atividade aumentada da enzima S1P liase, com concomitante diminuição da concentração de S1P, também pode estar associada à AD (Japtok *et al.*, 2014).

A nível das alterações no metabolismo da Cer, a redução do nível de Sph tem sido associada a alterações na permeabilidade cutânea. Como a Sph apresenta propriedades antimicrobianas, a diminuição do nível de Sph aumentam a probabilidade não só de colonização bacteriana, mas também de desenvolvimento de infeções bacterianas, principalmente por *Staphylococcus aureus*, resultando no agravamento do fenótipo clínico. O facto desta bactéria secretar a enzima esfingosina desacetilase (responsável pela conversão da Sph no respetivo liso esfingolípido) contribui, adicionalmente, para a redução do nível de Sph (Elias, 2008; Lyons *et al.*, 2015; Sawada *et al.*, 2012; Yamazaki *et al.*, 2017).

Tratamento

Apesar dos avanços científicos registados a nível do conhecimento sobre a AD, ainda não estão completamente bem estabelecidas as suas causas, assim como a sequência dos eventos que desencadeia o aparecimento dos sinais e sintomas desta doença. Em virtude disso, presentemente não existe cura para a AD (Sawada *et al.*, 2012; Tessema *et al.*, 2017).

Muitas das estratégias para o tratamento da AD têm por objetivo diminuir e/ou controlar os sintomas da doença. A xerose, um dos sintomas mais prevalentes na AD, e a irritação cutânea provocam uma rutura na barreira cutânea levando ao aumento da TEWL e, conseqüentemente, à inflamação. Assim, o uso de hidratantes tópicos, sobretudo sob a

forma de pomadas permite não só uma melhor absorção do fármaco como a formação de uma camada oclusiva na pele (de Bruin Weller *et al.*, 2013; Hon *et al.*, 2013; Lyons *et al.*, 2015; Sugiura *et al.*, 2014). Estes hidratantes apresentam três propriedades fundamentais: emoliente, humectante e oclusivo (Hon *et al.*, 2013). Em casos mais severos e quando o uso de hidratantes é insuficiente, recorre-se à utilização de corticosteróides tópicos que podem ser administrados de forma isolada ou em associação com outras substâncias anti-inflamatórias. Apesar dos corticosteróides serem reconhecidos como terapia anti-inflamatória de primeira linha, é evidente que quanto maior a sua potência maior o risco de efeitos adversos. Esses efeitos adversos incluem erupções acneicas, telangiectasias, atrofia cutânea, taquifilaxia e estrias, bem como eventuais efeitos sistêmicos (atraso no crescimento das crianças e supressão da glândula supra-renal) devido ao uso prolongado e/ou inadequado. Para prevenir estes efeitos, o seu uso deve ser restringido às zonas de pele lesada e por um curto período de tempo (5-7 dias) (Berke *et al.*, 2012; Lyons *et al.*, 2015; Plotz *et al.*, 2014).

No caso dos hidratantes, vários são os ingredientes ativos usados no tratamento da pele atópica. Uma vez que o presente trabalho explora especificamente as ceramidas e o défice destas moléculas lípidicas se encontra fortemente relacionado com disfunções da barreira cutânea e com o aumento da TEWL (Hon *et al.*, 2013), a análise dos ingredientes dos hidratantes será essencialmente focada no potencial terapêutico das ceramidas.

As ceramidas encontram-se em quantidades muito baixas na natureza pelo que o seu uso na indústria farmacêutica era, inicialmente, muito limitado. Para ultrapassar esta limitação foram, então, desenvolvidas pseudoceramidas. As pseudoceramidas são estruturalmente idênticas às diversas classes de ceramidas presentes na natureza, diferindo apenas na ausência de base esfingóide e/ou na presença de uma amina terciária, tal como é mostrado na Figura 15. Na epiderme, elas são capazes de formar lamelas estruturais iguais às das ceramidas endógenas e poderão substituir ou diminuir a utilização de corticóides tópicos (Meckfessel e Brandt, 2014).

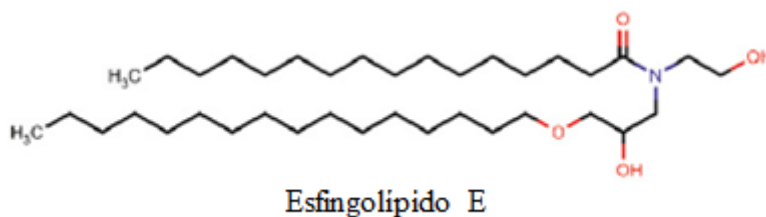


Figura 15. Estrutura da pseudoceramida esfingolípido E (Adaptada de Meckfessel e Brandt, 2014).

Recentemente, formulações ricas em ceramidas ou com misturas lípidicas que incluem o colesterol e ácidos gordos, têm sido usadas no tratamento da AD. Os estudos efetuados mostram que em doentes com AD é observada uma melhoria significativa da integridade e da função da barreira cutânea. Este efeito é mais evidente no caso dos emolientes oclusivos que, por formarem uma camada lípidica sobre a pele, facilitam a penetração desses lípidos no SC reduzindo a TEWL (Feingold e Elias, 2014; Kezic *et al.*, 2014; Meckfessel e Brandt, 2014; Varothai *et al.*, 2013).

Como já referido anteriormente, a NP é a espécie de Cer que se encontra em maior quantidade no SC e também a menos abundante na pele afetada com AD. Atualmente, várias são as marcas dermocosméticas que apresentam na sua constituição essa ceramida como agente terapêutico para a pele atópica, designadamente Eucerin® 5% ureia creme e Eucerin® loção 12% ómega dos laboratórios Beiersdorf (Meckfessel e Brandt, 2014; Varothai *et al.*, 2013).

A hidroxipalmitoil esfinganina é um tipo de ceramida que têm vindo a despertar interesse na indústria cosmética devido à elevada capacidade terapêutica que tem sido demonstrada em vários estudos clínicos que integram doentes com AD. Como mostra Figura 16, a hidroxipalmitoil esfinganina é estruturalmente idêntica à Cer (AS) diferindo apenas no tipo de base esfingóide (Meckfessel e Brandt, 2014).

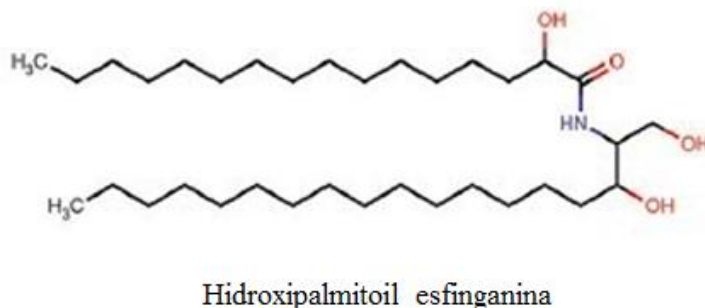


Figura 16. Estrutura da hidroxipalmitoil esfinganina (Adaptada de Meckfessel e Brandt, 2014).

Numa pele lesada com AD, a hidroxipalmitoil esfinganina aumenta significativamente os níveis das ceramidas EOS, NS e NP presentes no SC. Para além disso, esta molécula induz a produção de ceramidas endógenas aumentando, deste modo, os níveis de ceramidas originalmente deficientes no SC e que são essenciais à sua reestruturação. Esta ceramida tem sido formulada essencialmente em cremes e loções hidratante, por exemplo Cetaphil® RestoraDerm hidratante corporal, Cetaphil® RestoraDerm creme de duche hidratante e Cetaphil® Derma Control hidratante com fator de proteção 30, dos laboratórios Galderma (Chang *et al.*, 2017; Meckfessel e Brandt, 2014).

Atualmente, muitas são as gamas cosméticas que introduzem nas suas formulações ceramidas, estando clinicamente comprovado que têm um papel fundamental na reparação da barreira cutânea e na sua hidratação. Além disso, já foi evidenciado em modelos animais que o tratamento tópico com S1P produz um efeito anti-inflamatório. À medida que os estudos forem avançando, a possibilidade de incorporar este SL em protocolos de tratamento tópico proporcionará uma nova dinâmica na indústria farmacêutica, possibilitando a formulação de produtos específicos para cuidados diferenciados de pele, quer para doenças cutâneas quer para outras condições específicas (Meckfessel e Brandt, 2014).

ii. Psoríase

A psoríase é uma doença inflamatória crónica, não infecciosa, e recidivante. Esta doença é caracterizada por uma anomalia de queratinização da pele. A sua patogénese ainda não está totalmente esclarecida. No entanto, é evidente que a epiderme e a proliferação capilar estão afetadas devido à interação entre fatores genéticos, imunológicos e ambientais (Pradhan *et al.*, 2013).

Características clínicas

De uma forma geral, a psoríase é classificada de acordo com a localização anatómica e a morfologia das lesões cutâneas. Segundo o “*International Psoriasis Council*”, esta doença pode ser dividida em 4 tipos principais: psoríase em placa, psoríase gutata, psoríase pustulosa e psoríase eritrodérmica. Esta última é a forma mais grave de psoríase conhecida até à data e é caracterizada pela evolução rápida da doença com aparecimento de eritemas disseminados em várias zonas do corpo. Normalmente, esta é uma situação de urgência hospitalar uma vez que o doente apresenta um risco de desidratação maior pelo facto da barreira cutânea estar funcionalmente comprometida (Di Meglio *et al.*, 2014; Pradhan *et al.*, 2013).

O quadro clínico da psoríase manifesta-se pela presença de lesões com placas em áreas extensas que evoluem para uma lesão sem placa, descamação, eritema, pústulas assépticas (raro) e, eventualmente, pela presença de prurido. Geralmente, as lesões são observadas em zonas mais queratinizadas da pele, tais como os joelhos, cotovelos e couro cabeludo. A Figura 17 é representativa de uma lesão psoriática com placa (Di Meglio *et al.*, 2014).

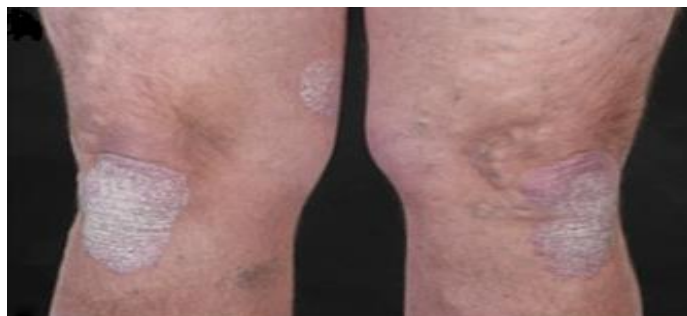


Figura 17. Aspeto clínico de uma lesão psoriática com placa (Retirado de Di Meglio *et al.*, 2014).

Mecanismos patogénicos

As lesões psoriáticas apresentam um nível elevado de péptidos antimicrobianos. Estas moléculas são constituintes da barreira cutânea, atuando contra infeções na medida em que sinalizam os leucócitos quanto à presença da infeção e estimulam a libertação de citocinas por parte dessas células. Deste modo, o aumento do nível de péptidos antimicrobianos observado na psoríase pode explicar o mecanismo da doença: desenvolvimento de uma resposta imunológica descontrolada e anormal que visa compensar a deficiência registada a nível da barreira cutânea. A proteína citoplasmática, conhecida por proteína ativadora da transcrição e transdutora de sinal 3 (Stat3), exerce funções importantes a nível da proliferação e angiogénese em várias células do organismo humano. Estudos realizados em ratinhos demonstram que a sobreexpressão desta proteína nos queratinócitos conduz à deficiência da barreira cutânea. Assim, a patogenicidade da psoríase é caracterizada por alterações na barreira cutânea e no sistema imunológico, e que poderão estar associados a uma predisposição genética (Sano, 2015). A Figura 18 ilustra o ciclo da psoríase. Na psoríase em placa, as alterações que decorrem no SC culminam com uma redução do nível de cálcio que é uma molécula sinalizadora responsável por regular, também, processos celulares específicos, tais como a proliferação, diferenciação e apoptose (Pimentel e Benaim, 2012).

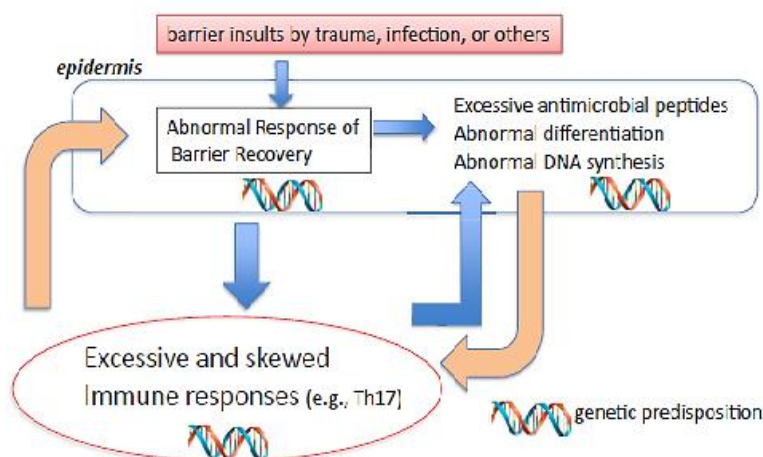


Figura 18. Representação esquemática do ciclo da psoríase (Retirado de Sano, 2015).

Alterações na composição das ceramidas epidérmicas, geralmente associadas a este tipo de doenças, podem também originar a formação de lesões psoriáticas. De facto, na psoríase em placa as alterações que decorrem no SC culminam com uma redução dos fatores naturais de hidratação. A diminuição das ceramidas epidérmica poderá ocorrer em resposta a essa redução e, deste modo, representar um mecanismo compensatório para repor o equilíbrio hídrico (Pimentel e Benaim, 2012). Neste âmbito, foi observada a redução da expressão da SPT que é responsável pelo aumento da TEWL, pela redução da biossíntese de ceramidas e pela formação de lesões psoriáticas, tais como a hiperqueratose. Adicionalmente, estudos realizados em doentes com psoríase revelaram a redução do nível das ceramidas EOS, NP e AP e um aumento do nível das ceramidas AS e NS. A redução da ceramida EOS é bastante significativa e, por isso, deverá desempenhar um papel importante na diminuição da função da barreira cutânea (Borodzicz *et al.*, 2016; Sano, 2015; van Smeden *et al.*, 2014). A diminuição do nível de SPT pode também estar na base de processos inflamatórios, conduzindo a um desequilíbrio a nível das células imunitárias. Está documentado que a psoríase está associada a valores elevados de marcadores inflamatórios inespecíficos, tais como as citocinas próinflamatórias (fator de necrose tumoral - TNF e interferão γ - IFN γ) e linfócitos T (Th1 e Th17). Vários autores sugerem que a presença do interferão γ possa ser responsável pela redução da expressão da enzima elongase necessária à produção de

cadeias muito longas de ácidos gordos representando, por isso, um possível fator causal da redução deste tipo de ceramidas (Borodzicz *et al.*, 2016; Sano, 2015).

Segundo Borodzicz *et al.*, os níveis das bases esfingóides esfingosina e esfinganina estão aumentados nas lesões dos doentes com psoríase. Estes dois SLs resultantes da degradação da Cer atuam como lípidos mensageiros secundários responsáveis por mediar efeitos antiproliferativos e apoptóticos através da ativação de moléculas sinalizadoras como a proteína quinase C-alfa (PKC- α) e a c-jun N-terminal quinase (JNK) (Borodzicz *et al.*, 2016; Moon *et al.*, 2013). Um estudo feito por Lew *et al.*, 2006 demonstrou que numa pele psoriática também estas moléculas sinalizadoras referidas se encontram diminuídas, sugerindo que a redução nos níveis de ceramidas induz uma baixa regulação na sinalização da apoptose numa pele psoriática (Lew *et al.*, 2006).

A falta de prosaposina é, também, evidente nas lesões psoriáticas, resultando na diminuição das enzimas envolvidas na degradação da GlcCer e da SM em Cer. Segundo Moon *et al.*, os níveis de ceramida são regulados pelo balanço entre a atividade da CerS e da CDase. O estudo reportado por este autor demonstra um desequilíbrio neste balanço causado pelo aumento da expressão da proteína CDase, mas não de CerS. Assim, pode-se concluir que os níveis reduzidos de ceramidas encontram-se diretamente correlacionados com o aumento da CDase, Sph e esfinganina (Moon *et al.*, 2013).

Tal como demonstrado anteriormente na AD, também a S1P deverá desempenhar um papel fundamente na patogénese da psoríase. Nas lesões psoriáticas foi observado o aumento da expressão e da atividade enzimática de SGPP2, o que pode justificar a redução dos níveis de S1P e o aumento do nível da Sph. O aumento da atividade enzimática de SGPP2 é maior quando acontecem estímulos inflamatórios, sugerindo que possa estar envolvida na sinalização de processos inflamatórios e, provavelmente, numa das vias que contribui para a patogénese da psoríase (Japtok *et al.*, 2014).

Tratamento

Atualmente não existe cura para a psoríase. Por isso, o objetivo do tratamento visa aumentar o tempo de remissão, controlando as lesões no sentido da sua diminuição e/ou desaparecimento. O tratamento da psoríase é definido pelo protocolo conhecido por “índice de PASI” (*Psoriasis area severity index*). Este protocolo classifica os tipos de psoríase com base na avaliação do número de lesões e da sua extensão. Quando a psoríase é de grau suave, o tratamento consiste, geralmente, no uso de emolientes, corticóides tópicos, vitamina D3 (calcitriol) e análogos da vitamina D (calcipotriol e tacalcitol). No caso de se tratar da forma severa, recorre-se ao uso de tratamentos sistémicos (psoríase eritrodérmica), fototerapia e tratamento oral com imunossupressores (Di Meglio *et al.*, 2014; Pasch, 2016).

Tal como referido anteriormente na AD, a aplicação de emolientes permite formar uma camada lípida oclusiva sobre a pele que facilita a entrada de lípidos no SC reduzindo, subsequentemente, a TEWL que é um dos fatores patogénicos mais evidenciados, também nesta patologia. Estes emolientes têm, normalmente, na sua composição NMFs e ceramidas que, em conjunto, aumentam a hidratação do SC, justificando o seu uso regular. Agentes queratolíticos, tais como o ácido salicílico e a ureia, promovem a dissolução das placas de queratina e agentes queratoplásticos, tal como o ditranol, permitem a regeneração do SC, conferindo, desta forma, eficácia no tratamento das lesões psoriáticas com placa. Estes agentes, em associação com corticóides, reduzem os eritemas, prurido e descamação (Chang *et al.*, 2017; Sugiura *et al.*, 2014; Torsekar e Gautam, 2017).

A indústria farmacêutica, atualmente, já reconhece a importância das ceramidas nas fórmulas dermocosméticas e, conseqüentemente, vários produtos já apresentam estas moléculas lípidicas na sua composição. Como já referido anteriormente no caso do tratamento da AD, a Cer que demonstra elevada eficácia é constituída de fitoesfingosina (NP) e, por isso, é esta a espécie que se encontra maioritariamente nas diferentes formulações. De facto, a sua aplicação tópica proporciona uma potente capacidade de retenção hídrica da pele e de hidratação, restaurando a função natural da barreira cutânea. Vários produtos têm na sua composição estes compostos, entre aos quais se

destacam: Eucerin® UreaRepair PLUS Loção 10% Ureia e Eucerin® UreaRepair PLUS Creme de Mãos 5% Ureia (Beiersdorf, 2017; Di Meglio *et al.*, 2014).

iii. Síndrome de Netherton

A síndrome de Netherton (NS, OMIM 256500) é uma doença genética rara da pele com um padrão de transmissão autossômico recessivo. Estima-se que em cerca de 20% dos indivíduos afetados com esta síndrome ocorra morte prematura (Bingol *et al.*, 2011).

Características clínicas

Esta síndrome é caracterizada pela presença de uma tríade de sintomas: eritrodermia com áreas de descamação, atopia e uma anormalidade na haste dos pêlos do couro cabeludo conhecida por *tricorhexis invaginata* (Figura 19). Este defeito consiste na invaginação da parte distal sobre a proximal da haste pilosa e o aspeto do cabelo é conhecido como cabelo em bambu. No entanto, nem todos os casos manifestam simultaneamente estes sintomas o que, por vezes, dificulta o diagnóstico (Bingol *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2016).

Esta patologia é caracterizada por uma dermatite atópica severa. As manifestações clínicas dos doentes com NS incluem todas as que se observam na AD mas de forma mais exacerbada e, ainda, hiperqueratose, diminuição ou perda da camada granulosa, hipereosinófilia e valores elevados de IgE característicos de uma inflamação crónica da pele (Bingol *et al.*, 2011; Choudhary *et al.*, 2009; Lyons *et al.*, 2015). No período neonatal, estas manifestações clínicas são extremamente sérias devido ao aumento da suscetibilidade a infeções, desidratação, hipernatrémica, perda significativa de peso e hipotermia que, em muitos casos, conduz à morte (Bingol *et al.*, 2011).



Figura 19. Eritrodermia generalizada num bebé com Síndrome de Netherton (Retirado de Nevet *et al.*, 2017).

Mecanismos patogénicos

Esta patologia associa-se a um defeito genético no gene *SPINK5* (inibidor da serina protease Kazal-tipo5) localizado no cromossoma 5q32. Este gene codifica a proteína LEKTI (inibidor linfoepitelial relacionado ao tipo Kazal). Em 13 famílias com NS foram detetadas 11 mutações no gene *SPINK5*, das quais 9 produzem codões de terminação prematuros que, provavelmente, conduzirão à instabilidade do respetivo mRNA (Chavanas *et al.*, 2000). As mutações descritas neste gene estão associadas ao aumento da atividade enzimática de uma série de enzimas conhecidas por calicreínas e que pertencem a um subgrupo de proteases de serina. Estas enzimas, nomeadamente a calicreína 5 e 7, regulam o processo de descamação celular e estão presentes no SC. A deficiência da proteína LEKTI inibe este processo, promovendo uma deficiência na barreira cutânea e originando o aparecimento de eritema (Elias e Schmuth, 2009; Hachem *et al.*, 2006; Lyons *et al.*, 2015). A proteína LEKTI, sendo um inibidor das proteases de serina, é responsável por controlar a atividade enzimática das calicreínas no SC. Por isso, existe uma associação entre as alterações de queratinização e o quadro atópico uma vez que tanto a ausência como uma disfunção destes inibidores desregulam a diferenciação celular. Para além das alterações das calicreínas, a ausência da proteína LEKTI na epiderme e no cabelo provocam alterações na expressão de outras proteínas, especialmente as transglutaminases 1 e 3. Estas enzimas exercem um papel importante na formação do CE bem como na diferenciação celular. Deste modo, alterações no nível

das transglutaminases justificam a deficiência observada no CE de doentes com NS. Mutações no gene *SPINK5* estão, assim, diretamente relacionadas com as diversas anomalias que são observadas no SC de doentes com NS. De referir, ainda, que alguns estudos sugerem que variantes genéticas de *SPINK5* podem estar associadas com a patogénese da AD. Esta observação realça a importância da manutenção de um balanço adequado entre proteases e os respetivos inibidores para a fisiologia da pele (Choudhary *et al.*, 2009).

Em doentes com NS foram observadas alterações significativas no padrão lípidico do SC, designadamente a redução do comprimento das cadeias dos ácidos gordos livres e o aumento do nível de ácidos gordos monoinsaturados. O estudo também revelou uma diminuição no número total de ceramidas, bem como o aumento dos níveis das ceramidas muito longas, C32 e C38 (Hachem *et al.*, 2006; van Smeden *et al.*, 2014; Zeeuwen, 2004). A maioria dos doentes com NS apresenta variações na expressão de enzimas específicas, designadamente a esteroil-CoA desaturase-1 (conversão de ácidos gordos livres em ácidos gordos monoinsaturados), elongases ELOVL 1 e 6 (responsáveis pela formação de cadeias muito longas de ácidos gordos), β -glucocerebrosidase e aSMase. Estas observações reforçam novamente a ideia de que a manutenção normal da barreira cutânea depende de um balanço adequado entre moléculas lípidicas e, por isso, da realização concertada de inúmeras reações enzimáticas. Qualquer transtorno a este nível pode desencadear o aparecimento de uma alteração cutânea, designadamente a NS (Li *et al.*, 2016; van Smeden *et al.*, 2014). Adicionalmente, também todas as espécies de acil-Cers estão diminuídas. Mais uma vez é enfatizada a ideia de que as acil-ceramidas exercem um papel marcante no SC, justificando a sua redução nas 3 principais doenças cutâneas: AD, psoríase e NS (Li *et al.*, 2016).

Tratamento

Tal como as outras doenças cutâneas abordadas anteriormente, a NS não tem cura. O tratamento para esta patologia é adaptado às manifestações clínicas do doente. Mais uma vez o uso de emolientes hidratantes que contenham Cer na sua composição é essencial para formar uma camada oclusiva por forma a promover a hidratação da pele e

a reposição lípida. Atualmente, e apesar de ser conhecida a base genética desta patologia, ainda não existe no mercado nenhuma formulação dirigida apenas ao NS. No entanto, é conhecido que as mutações associadas ao NS provocam alterações lípidicas, designadamente a nível das ceramidas do SC. Esta observação salienta, assim, a necessidade de realização de estudos clínicos para estabelecer os benefícios da utilização destes lípidos em protocolos terapêuticos da NS (Meckfessel e Brandt, 2014).

V. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

O conhecimento sobre a diversidade estrutural e funcional dos SLs tem registado um notável avanço nas últimas décadas. A nível destas moléculas lípidicas, a Cer é o SL mais simples, sendo constituída por uma base esfingóide, geralmente a esfingosina, e por um ácido gordo unidos através de uma ligação amida. As ceramidas incluem moléculas muito diversas que se diferenciam pelo tipo de base esfingóide e pelo comprimento e modificações do ácido gordo. Em termos metabólicos, a Cer ocupa uma posição central, intervindo na via biossintética, via catabólica, via de reciclagem e ciclo da esfingomiéline. Estas diferentes vias metabólicas interligam diferentes compartimentos celulares, recrutando uma considerável diversidade de enzimas e proteínas não enzimáticas que deverão atuar de forma concertada para assegurar a manutenção da homeostasia celular (Don *et al.*, 2014; Young *et al.*, 2012). Alterações enzimáticas em etapas específicas deste metabolismo podem romper o equilíbrio entre moléculas esfingolípídicas inter-relacionadas, originando a acumulação de metabolitos específicos e, eventualmente alterações celulares patológicas. De facto, o metabolito diretamente derivado da Cer é a Sph e alterações no nível de equilíbrio Cer/S1P podem desencadear proliferação ou morte celular (Breslow, 2013; Gault *et al.*, 2010; Kihara, 2016).

Paralelamente, ao longo das últimas décadas tem sido evidenciado o papel de moléculas esfingolípídicas específicas na patogénese de diversas doenças, incluindo as doenças crónicas da pele. Simultaneamente, o aumento da prevalência das patologias atópicas ao longo dos anos tem vindo a intensificar a sua investigação, nomeadamente quanto ao papel dos SLs nestas doenças.

A pele, designadamente a epiderme, encontra-se exposta diariamente a vários fatores ambientais que podem alterar aspetos anatómicos e fisiológicos específicos. Neste contexto, a capacidade de adaptação da barreira cutânea é importante para a manutenção da sua função de proteção física, química e imunológica e ela depende, em grande parte, da fisiologia dos queratinócitos. Os queratinócitos apresentam na sua composição SLs, nomeadamente as ceramidas e as acil-ceramidas, que desempenham um papel importante na regulação da função da barreira epidérmica. Alterações no metabolismo

da Cer explicam, pelo menos em parte, o aparecimento e desenvolvimento dos sinais e sintomas característicos das doenças crônicas da pele, tais como a presença de xerose cutânea, uma maior vulnerabilidade à penetração de patógenos e fenómenos de inflamação cutânea. Deste modo, nas doenças inflamatórias cutâneas, nomeadamente a dermatite atópica, psoríase e Síndrome de Netherton, essas alterações lípidicas representam potenciais fatores etiopatogénicos (Jump, 2009; Kihara, 2016; Tessema *et al.*, 2017). Atualmente, vários laboratórios farmacêuticos já comercializam cremes emolientes, pomadas e loções que contêm na sua formulação ceramidas específicas, isoladas ou em combinação com misturas lípidicas, e que são usados como tratamento de primeira linha para restaurar a hidratação da pele atenuando, dessa forma, os sintomas dessas doenças (Elias e Schmuth, 2009; Kezic *et al.*, 2014; Lyons *et al.*, 2015). No entanto, apesar dos avanços registados neste domínio, a compreensão dos mecanismos envolvidos na patogénese de algumas dermatoses cutâneas não é, ainda, clara. Um longo caminho terá, ainda, de ser percorrido até que sejam completamente esclarecidos os mecanismos de ação dos SLs na epiderme e seja possível a translação desse conhecimento para a prática clínica. De facto, a recente associação do microbiota à patogénese da AD é ilustrativa da complexidade destas patologias e do desafio que representam para a identificação de uma estratégia terapêutica eficaz para todos os doentes (Yamazaki *et al.*, 2017).

VI. BIBLIOGRAFIA

Adada, M., Luberto, C. e Canals, D. (2016). Inhibitors of the sphingomyelin cycle: Sphingomyelin synthases and sphingomyelinases. *Chemistry and Physics of Lipids*, 197, pp. 45-59.

Airola, M. V e Hannun, Y.A. (2013). Shingolipid metabolism and neutral sphingomyelinases. *Handb Exp Pharmacol*, 215, pp. 57-76.

Beiersdorf. [Em linha]. Disponível em <<http://www.eucerin.pt/>>. [Consultado em 20/9/2017].

Berke, R., Singh, A. e Guralnick, M. (2012). Atopic dermatitis: an overview. *Am Fam Physician*, 86, pp. 35-42.

Bienias, K., *et al.* (2016). Regulation of sphingomyelin metabolism. *Pharmacological Reports*, 68, pp. 570-581.

Bingol, B., *et al.* (2011). Prenatal diagnosis of Comel-Netherton syndrome with PGD, case report and review article. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28, pp. 615-620.

Borodzicz, S., *et al.* (2016). The role of epidermal sphingolipids in dermatologic diseases. *Lipids in Health and Disease*, 15, pp. 13-21.

Breslow, D. K. (2013). Sphingolipid Homeostasis in the Endoplasmic Reticulum and Beyond. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5, pp. a013326-a013342.

Brown, S. J. (2017). Molecular mechanisms in atopic eczema: insights gained from genetic studies. *J Pathol*, 241, pp. 140-145.

Chang, A. L. S., *et al.* (2017). A daily skincare regimen with a unique ceramide and filaggrin formulation rapidly improves chronic xerosis, pruritus, and quality of life in older adults. *Geriatric Nursing*, pp. 1-5.

Chavanas, S., *et al.* (2000). Mutations in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome. *Nature Genetics*, 25, pp. 141-142.

Choudhary, S., *et al.* (2009). Bamboo hair in netherton's syndrome. *International Journal of Trichology*, 1, pp. 143-144.

Coant, N., *et al.* (2017). Ceramidases, roles in sphingolipid metabolism and in health and disease. *Advances in Biological Regulation*, 63, pp. 122-131.

Coderch, L., *et al.* (2003). Ceramides and Skin Function. *American Journal of Clinical Dermatology*, 4, pp. 107-129.

D'Angelo, G., *et al.* (2013). Glycosphingolipids: synthesis and functions. *FEBS Journal*, 280, pp. 6338-6353.

de Bruin Weller, M. S., *et al.* (2013). Evaluation of the adult patient with atopic dermatitis. *Clinical & Experimental Allergy*, 43, pp. 279-291.

Di Meglio, P., Villanova, F. e Nestle, F. O. (2014). Psoriasis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4, pp. a015354-a015384.

Don, A., Lim, X. e Couttas, T. (2014). Re-Configuration of Sphingolipid Metabolism by Oncogenic Transformation. *Biomolecules*, 4, pp. 315-353.

Elias, P. M. (2008). Skin barrier function. *Curr Allergy Asthma Rep*, 8, pp. 299-305.

Elias, P. M. e Schmuth, M. (2009). Abnormal skin barrier in the etiopathogenesis of atopic dermatitis. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 9, pp. 437-446.

Feingold, K. R. e Elias, P. M. (2014). Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier. *Biochim Biophys Acta*, 1841, pp. 280-294.

Gault, C., Obeid, L. e Hannun, Y. (2010). An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Adv Exp Med Biol*, 688, pp. 1-23.

GeneCards: the human gene database. [Em linha]. Disponível em <<http://www.genescard.org>>. [Consultado em 6/9/2017].

Hachem, J. P., *et al.* (2006). Serine protease activity and residual LEKTI expression determine phenotype in Netherton syndrome. *J Invest Dermatol*, 126, pp. 1609-1621.

Hitomi, K. (2005). Transglutaminases in skin epidermis. *Eur J Dermatol*, 15, pp. 313-319.

Holleran, W. M., Takagi, Y. e Uchida, Y. (2006). Epidermal sphingolipids: metabolism, function, and roles in skin disorders. *FEBS Lett*, 580, pp. 5456-5466.

Hon, K. L., Leung, A. K. C. e Barankin, B. (2013). Barrier Repair Therapy in Atopic Dermatitis: An Overview. *American Journal of Clinical Dermatology*, 14, pp. 389-399.

Iwabuchi, K., *et al.* (2015). Role of Ceramide from Glycosphingolipids and Its Metabolites in Immunological and Inflammatory Responses in Humans. *Mediators of Inflammation*, 2015, pp. 1-10.

Japtok, L., Bäumer, W. e Kleuser, B. (2014). Sphingosine-1-phosphate as signaling molecule in the skin. *Allergo Journal International*, 23, pp. 54-59.

Jin, K., *et al.* (1994). Analysis of beta-glucocerebrosidase and ceramidase activities in atopic and aged dry skin. *Acta Derm Venereol*, 74, pp. 337-340.

Jump, D. B. (2009). Mammalian Fatty Acid Elongases. *Methods in Molecular Biology*, 579, pp. 375-389.

Kacher, Y. e Futerman, A. H. (2006). Genetic diseases of sphingolipid metabolism: Pathological mechanisms and therapeutic options. *FEBS Letters*, 580, pp. 5510-5517.

Kezic, S., *et al.* 2014. Skin barrier in atopic dermatitis. *Frontiers in bioscience*, 19, pp. 542-556.

Kihara, A. (2016). Synthesis and degradation pathways, functions, and pathology of ceramides and epidermal acylceramides. *Progress in Lipid Resear*, 63, pp. 50-69.

Kim, B. E. e Leung, D. Y. M. (2012). Epidermal Barrier in Atopic Dermatitis. *Allergy, Asthma and Immunology Research*, 4, pp. 12-16.

Kolter, T. (2011). A view on sphingolipids and disease. *Chemistry and Physics of Lipids*, 164, pp. 590-606.

Lew, B-L., *et al.* (2006). Ceramides and Cell Signaling Molecules in Psoriatic Epidermis: Reduced Levels of Ceramides, PKC- α , and JNK. *J Korean Med Sci*, 21, pp. 95-99.

Li, C. M., *et al.* (19 99). The human acid ceramidase gene (ASAH): structure, chromosomal location, mutation analysis, and expression. *Genomics*, 62, pp. 223-231.

Li, S., Ganguli-Indra, G. e Indra, A. K. (2016). Lipidomic analysis of epidermal lipids: a tool to predict progression of inflammatory skin disease in humans. *Expert Review of Proteomics*, 13, pp. 451-456.

Lyons, J. J., Milner, J. D. e Stone, K. D. (2015). Atopic Dermatitis in Children. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 35, pp. 161-183.

Mao, C. (2008). Ceramidases: regulators of cellular responses mediated by ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1781, pp. 424-434.

McClean, W. H. I. (2016). Filaggrin failure - from ichthyosis vulgaris to atopic eczema and beyond. *British Journal of Dermatology*, 175, pp. 4-7.

Meckfessel, M. H. e Brandt, S. (2014). The structure, function, and importance of ceramides in skin and their use as therapeutic agents in skin-care products. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 71, pp. 177-184.

Merrill, A. H. (2011). Sphingolipid and Glycosphingolipid Metabolic Pathways in the Era of Sphingolipidomics. *Chemical Reviews*, 111, pp. 6387-6422.

Merrill, A. H. e Carman, G. M. (2015). Introduction to Thematic Minireview Series: Novel Bioactive Sphingolipids. *Journal of Biological Chemistry*, 290, pp. 15362-15364.

Moon, S. H., *et al.* (2013). Altered levels of sphingosine and sphinganine in psoriatic epidermis. *Ann Dermatol*, 25, pp. 321-326.

Newton, J., *et al.* (2015). Revisiting the sphingolipid rheostat. Evolving concepts in cancer therapy. *Experimental Cell Research*, 333, pp. 195-200.

Nevet, M. J., *et al.* (2017). A case of Netherton syndrome with intestinal atresia, a novel SPINK5 mutation, and a fatal course. *International Journal of Dermatology*, 56, pp. 1055-1057.

Pasch, M. C. (2016). Nail Psoriasis: A Review of Treatment Options. *Drugs*, 76, pp. 675-705.

Pimentel, A. A. e Benaim, G. (2012). El Ca²⁺ y los esfingolípidos como moduladores de la apoptosis y el cáncer. *Investigación Clínica*, 53, pp. 84-110.

Plotz, S. G., *et al.* (2014). What is new in atopic dermatitis/eczema? *Expert Opin Emerg Drugs*, 19, pp. 441-458.

Pradhan, M., Singh, D. e Singh, M.R. (2013). Novel colloidal carriers for psoriasis: Current issues, mechanistic insight and novel delivery approaches. *Journal of Controlled Release*, 170, pp. 380-395.

Russo, D., Parashuraman, S. e D'angelo, G. (2016). Glycosphingolipid-Protein Interaction in Signal Transduction. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, pp. 1732-1753.

Sahle, F. F., *et al.* (2015). Skin Diseases Associated with the Depletion of Stratum Corneum Lipids and Stratum Corneum Lipid Substitution Therapy. *Skin Pharmacology and Physiology*, 28, pp. 42-55.

Sano, S. (2015). Psoriasis as a barrier disease. *Dermatologica Sinica*, 33, pp. 64-69.

Sawada, E., *et al.* (2012). Th1 cytokines accentuate but Th2 cytokines attenuate ceramide production in the stratum corneum of human epidermal equivalents: an implication for the disrupted barrier mechanism in atopic dermatitis. *J Dermatol Sci*, 68, pp. 25-35.

Schulze, H. e Sandhoff, K. (2014). Sphingolipids and lysosomal pathologies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1841, pp. 799-810.

Seeley, R. *et al.*, (2003). *Anatomia e Fisiologia*. Loures, Lusociência.

Sugiura, A., *et al.* (2014). Reevaluation of the non-lesional dry skin in atopic dermatitis by acute barrier disruption: an abnormal permeability barrier homeostasis with defective processing to generate ceramide. *Arch Dermatol Res*, 306, pp. 427-440.

Taniguchi, M. e Okazaki, T. (2014). The role of sphingomyelin and sphingomyelin synthases in cell death, proliferation and migration-from cell and animal models to human disorders. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1841, pp. 692-703.

Tessema, E. N., *et al.* (2017). Potential Applications of Phyto-Derived Ceramides in Improving Epidermal Barrier Function. *Skin Pharmacology and Physiology*, 30, pp. 115-138.

Torsekar, R. e Gautam, M. (2017). Topical therapies in psoriasis. *Indian Dermatology Online Journal*, 8, pp. 235-245.

Uchida, Y. (2014). Ceramide signaling in mammalian epidermis. *Biochim Biophys Acta*, 1841, pp. 453-462.

van Smeden, J., *et al.* (2014). The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1841, pp. 295-313.

Varothai, S., Nitayavardhana, S. e Kulthanan, K. (2013). Moisturizers for patients with atopic dermatitis. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 31, pp. 91-98.

Xu, M., *et al.* (2016). Rare case of Netherton syndrome with generalized lentigines. *The Journal of Dermatology*, pp. 1-2.

Yamazaki, Y., Nakamura, Y. e Núñez, G. (2017). Role of the microbiota in skin immunity and atopic dermatitis. *Allergology International*, 66, pp. 539-544.

Young, S. A., *et al.* (2012). Sphingolipid and Ceramide Homeostasis: Potential Therapeutic Targets. *Biochemistry Research International*, 2012, pp. 248135-248147.

Zeeuwen, P. (2004). Epidermal differentiation: The role of proteases and their inhibitors. *European Journal of Cell Biology*, 83, pp. 761-773.