RAQUEL LEÃO ORFALI

**Avaliação da resposta proliferativa das
células mononucleares do sangue periférico às
enterotoxinas A e B do *Staphylococcus aureus* e
dos níveis de interleucina-18 na
dermatite atópica do adulto**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Dermatologia
Orientadora: Profa. Dra. Valéria Aoki

São Paulo
2005

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Orfali, Raquel Leão

Avaliação da resposta proliferativa das células mononucleares do sangue periférico às enterotoxinas A e B do *Staphylococcus aureus* e dos níveis de interleucina-18 na dermatite atópica do adulto / Raquel Leão Orfali. -- São Paulo, 2005.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Dermatologia.

Área de concentração: Dermatologia.

Orientadora: Valéria Aoki.

Descritores: 1.DERMATITE ATÓPICA/imunologia 2.DERMATITE ATÓPICA/fisiopatologia 3.ENTEROTOXINAS 4.STAPHYLOCOCCUS AUREUS 5.INTERLEUCINAS 6.ADULTO

USP/FM/SBD-391/05

Dedicatória

*Ao meu esposo **Fabio**, por seu importante auxílio através dos seus conhecimentos matemáticos e, principalmente, por todo seu amor, carinho, paciência, apoio e dedicação.*

*À minha mãe **Zelma**, meu avô **Oscar** e minha irmã **Valéria**, que são minha fortaleza, e sem os quais eu não seria quem sou e nem estaria onde estou.*

*À minha amada avó **Wanda**, que sempre foi minha luz e esteja onde estiver, estou certa de que continua iluminando os meus caminhos.*

Agradecimentos especiais

À **Profa. Dra. Valéria Aoki**, minha orientadora, pela sua amizade, dedicação, paciência, incentivo, confiança e pela sua constante disposição em me ensinar e auxiliar.

À **Profa. Dra. Maria Notomi Sato**, por todo seu apoio, paciência e, principalmente, por me ensinar a dar os primeiros passos dentro do laboratório e acreditar em mim.

Ao **Dr. Roberto Takaoka**, por sua amizade, pelo exemplo de dedicação a esta tão sofrida doença e, principalmente, por me ensinar a ser mais humana ao lidar com os doentes.

Agradecimentos

Ao querido colega **Dr. Daniel Lorenzini**, por seu companheirismo e paciência nesta jornada da pós-graduação.

Às queridas amigas **Viviane Y. Nojima** e **Mayce Helena Azor** por sua importante contribuição na realização deste trabalho e pela grande amizade que daí surgiu.

À **Prof. Dra. Celina Wakisaka Maruta** e às **Dras. Maria Teresa R. Y. Lascane** e **Beatriz Lacerda Averbach** pelo diário incentivo e companheirismo.

Aos **Profs. Drs. Evandro A. Rivitti, Alberto José da S. Duarte** e **Gil Benard** por sua honrosa contribuição na elaboração deste trabalho.

À **Prof. Dra. Mirian Nacagomi Soto** pelo grande incentivo e apoio durante a realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Luiz Carlos Cucé** por ter me recebido na pós-graduação.

À querida amiga **Dra. Bhertha Miyuki Tamura** por ter sempre me estendido sua mão em todos os momentos de minha vida dermatológica.

À **Prof. Dra. Olga Fishman Gompertz**, grande inspiradora e incentivadora do meu ingresso na vida acadêmica.

À **Soraya Ogusuku e Camila Rodrigues Cécere**, que com muita paciência me ensinaram e auxiliaram com os ensaios de linfoproliferação.

À **Ana Maria Gonçalves da Silva**, que com grande empenho e persistência, finalmente conseguiu finalizar a compra da IL-18.

A **Rosângela Maria Araújo e Eliazib Sales Bueno** por sua grande contribuição na coleta de sangue.

Ao **Daniel Tapias Morales**, que com brilhante precisão e dedicação, auxiliou com a ilustração desta dissertação.

Às maravilhosas secretárias **Ângela e Nádia** pela dedicação, amizade e, principalmente, pela paciência com as minhas constantes trocas de horário no consultório devido à pós-graduação.

A todos amigos do **LIM 56** que de uma forma ou de outra contribuíram com a realização deste trabalho.

A todos os **doentes do ambulatório de Dermatite Atópica** do HC-FMUSP, em especial àqueles que, apesar de suas atribuições cotidianas, dispuseram de seu tempo e tornaram este trabalho possível.

Esta dissertação está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

	página
Lista de abreviaturas	xvi
Lista de símbolos	xviii
Lista de figuras	xix
Lista de tabelas	xx
Lista de gráficos	xxii
Resumo	xxiii
Summary	xxv
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	5
3 REVISÃO DA LITERATURA	7
3.1 Histórico	8
3.2 Diagnóstico	9
3.3 Gravidade da doença	10
3.4 Epidemiologia	10
3.5 Etiopatogenia	12
3.5.1 Fatores genéticos	13
3.5.2 Alterações imunológicas	15
A. Alterações nas lesões cutâneas da DA	15
1. Padrão bifásico da expressão de citocinas na DA	15
2. Células de Langerhans e macrófagos associados à IgE	19
3. Mastócitos, basófilos e macrófagos	20
4. Eosinófilos	21
5. Queratinócitos epidérmicos	21
6. Células endoteliais	22
7. Auto-alergia na DA	22
8. “Skin-homing”: migração órgão-específica dos LTh2	23
B. Anormalidades do sangue periférico	23
1. IgE sérica	23
2. Perfil de produção de citocinas na DA	24
3. IL-18 na DA	25
3.5.3 Alterações da fosfodiesterase	28
3.5.4 Fatores psicológicos	28
3.5.5 Neuropeptídeos	29
3.5.6 Papel do <i>Staphylococcus aureus</i> na DA	29
4 MÉTODOS	35
4.1 Seleção dos indivíduos	36
4.2 Avaliação dos doentes	37
4.2.1 Avaliação geral	37
4.2.2 Dosagem de IgE sérica	37
4.2.3 Obtenção das células mononucleares do sangue periférico	38

4.2.4 Cultura das células mononucleares do sangue periférico	39
4.2.5 Curva dose-resposta para SEA e SEB	40
4.2.6 ELISA (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”) para dosagem da IL-18	41
4.3 Ética	42
4.4 Estatística	42
5 RESULTADOS	43
5.1 Análise dos doentes	44
5.2 Dosagem de IgE sérica	49
5.3 Análise da resposta proliferativa das células mononucleares do sangue periférico dos doentes e controles a mitógenos e antígenos	51
5.3.1 Curva dose-resposta para SEA e SEB	51
5.3.2 Análise da resposta proliferativa das células mononucleares do sangue periférico dos doentes e controles após estímulo com mitógenos	52
5.3.3 Análise da resposta proliferativa das células mononucleares do sangue periférico dos doentes e controles após estímulo com antígenos CMA e TT	54
5.4 Análise dos níveis de IL-18 em sobrenadantes de culturas de células mononucleares do sangue periférico dos doentes e controles	55
5.4.1 Níveis de IL-18 nos sobrenadantes de cultura	55
5.4.2 Correlação entre níveis de IL-18 nos sobrenadantes de cultura e respostas proliferativas das PBMC após estímulo com SEA e SEB	56
5.4.3 Dosagem de IL-18 nos sobrenadantes de culturas das PBMC em condições basais e após estímulo com SEA e SEB conforme a gravidade da doença	57
5.5 Análise de IL-18 no soro	58
5.5.1 Correlação entre os níveis de IL-18 e de IgE no soro dos doentes adultos com DA	59
6 DISCUSSÃO	60
7 CONCLUSÕES	71
8 ANEXOS	74
Anexo A - Critérios diagnósticos da Dermatite Atópica	75
Anexo B - EASI - “Eczema Area and Severity Index”	77
Anexo C - Termo de consentimento livre e esclarecido	78
Anexo D - Aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa	82
Anexo E - Distribuição dos doentes adultos com DA conforme sexo, idade, cor, associação ou não com doença respiratória, período de início da enfermidade, escore de gravidade e fase da doença	83

Anexo F - Distribuição dos doentes adultos com DA conforme gravidade da doença, dosagem de IgE sérica, resposta proliferativa para SEA e SEB, dosagem de IL-18 em sobrenadantes de cultura sem estímulo e após estímulo com SEA e SEB e dosagem de IL-18 no soro	84
9 REFERÊNCIAS	85

Listas

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Células apresentadoras de antígeno
<i>Apud</i>	Citado por
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclica
CC	Subfamília de quimiocina
CD	Moléculas de superfície celular designadas por números
CGRP	Gene relacionado a calcitonina
CL	Células de Langerhans
CLA	Antígeno linfocitário cutâneo
CMA	<i>Candida albicans</i>
Δ cpm	Média aritmética das triplicatas
DA	Dermatite atópica
EASI	“Eczema Area and Severity Index”
ELISA	Ensaio imunoenzimático (“Enzyme-linked immunosorbent assay”)
et al.	E outros
FC ϵ RI	Receptor de alta afinidade para imunoglobulina E
GM-CSF	Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
^3H	Timidina tritiada
ICAM	Molécula de adesão intracelular
ICCAD	Consenso Internacional de Dermatite Atópica
IDEC	Célula dendrítica epidérmica inflamatória
IE	Índice de estimulação
IFN- γ	Interferon-gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina

LB	Linfócitos B
LPS	Lipopolissacáride
LT	Linfócitos T
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MR	Manifestação respiratória
NP	Neuropeptídios
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PDE	Fosfodiesterase
PHA	Fitohemaglutinina
PWM	“Pokeweed”
RANTES	Quimiocina regulada sob ativação de célula T normal expressa e secretada
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SCORAD	Escore de gravidade da dermatite atópica
SEA	Enterotoxina estafilocócica tipo A
SEB	Enterotoxina estafilocócica tipo B
SP	Substância P
TCR	Receptor de célula T
TGF	“Transformation growth factor”
Th	Células T auxiliares
TNF	Fator de necrose tumoral
TSST-1	Toxina da síndrome do choque tóxico
TT	Toxóide tetânico
V β	Regiões variáveis da cadeia beta
VCAM	Molécula de adesão celular vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

$\bar{x}$	Média aritmética
%	Por cento
↓	Diminuição
↑	Aumento
μCi	Microcurie
μg	Micrograma
<	Menor que
=	Igual a
>	Maior que
°C	Graus Celsius
KDa	Quilodalton
Lf/mL	Unidade de floculação
mL	Mililitro
n	Tamanho da amostra
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
pg	Picograma
rpm	Rotações por minuto
UI	Unidade internacional

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Dermatite atópica: fase aguda	17
Figura 2 - Dermatite atópica: fase crônica	18
Figura 3 - Mecanismo de ação do <i>Staphylococcus aureus</i>	34
Figura 4 - Teste de estimulação linfocitária	40
Figura 5 - Dermatite atópica do adulto: acometimento cérvico-facial	45
Figura 6 - Dermatite atópica do adulto: acometimento de membros inferiores	46

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Possíveis genes relacionados à dermatite atópica.....	14
Tabela 2 - Dermatite atópica: resposta proliferativa das PBMC a mitógenos e antígenos.....	66
Tabela 3 - Dosagem da IL-18 na DA.....	69

LISTA DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1 - Distribuição dos doentes adultos com dermatite atópica conforme a idade de início da doença.....	47
Gráfico 2 - Distribuição dos doentes adultos com dermatite atópica conforme a etnia.....	47
Gráfico 3 - Distribuição dos doentes adultos com dermatite atópica segundo o escore de gravidade da doença (EASI).....	48
Gráfico 4 - Distribuição dos doentes de acordo com a fase de atividade da dermatite atópica	48
Gráfico 5 - Distribuição dos doentes conforme a associação da dermatite atópica com manifestação respiratória.....	49
Gráfico 6 – Níveis séricos de IgE nos doentes com DA e associação com manifestação respiratória.....	50
Gráfico 7 - Correlação entre os níveis séricos de IgE, gravidade da doença e percentagem de eosinófilos no sangue.	50
Gráfico 8 - Curva dose-resposta para SEA e SEB.....	51
Gráfico 9 - Respostas proliferativas das PBMC dos doentes adultos com DA comparados com controles após estímulo com SEA e SEB.....	52
Gráfico 10 - Respostas proliferativas das PBMC dos doentes adultos com DA comparados com controles após estímulo com PHA e PWM.....	53
Gráfico 11 - Respostas proliferativas das PBMC dos doentes adultos com DA comparados com controles após estímulo com CMA e TT.....	54
Gráfico 12 - Níveis de IL-18 em sobrenadantes de cultura em situação sem estímulo e após estímulo com SEA e SEB.....	55
Gráfico 13 - Correlação entre níveis de IL-18 em sobrenadantes de culturas e resposta proliferativa das PBMC após estímulo com SEA e SEB	56

Gráfico 14 -	Dosagem de IL-18 em sobrenadantes de culturas e resposta proliferativa das PBMC em condições basais e após estímulo com SEA e SEB conforme gravidade da doença.....	57
Gráfico 15 -	Dosagem de IL-18 sérica dos adultos com DA e controles.....	58
Gráfico 16 -	Correlação entre IL-18 e IgE no soro dos doentes....	59

Resumo

Orfali RL. *Avaliação da resposta proliferativa das células mononucleares do sangue periférico às enterotoxinas A e B do Staphylococcus aureus e dos níveis de interleucina-18 na dermatite atópica do adulto* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. 94p.

INTRODUÇÃO: A dermatite atópica é uma doença inflamatória crônica de alta prevalência e etiopatogenia multifatorial. O *Staphylococcus aureus* está presente em cerca de 80 -100% dos doentes e, possivelmente, está relacionado com a patogênese dessa enfermidade. **OBJETIVOS:** Avaliar a resposta proliferativa das células mononucleares do sangue periférico às enterotoxinas estafilocócicas A e B e a secreção da interleucina-18 nos atópicos adultos. **MÉTODOS:** As células mononucleares do sangue periférico de 29 doentes com dermatite atópica e 25 controles sadios foram estimulados com mitógenos: enterotoxinas estafilocócicas A e B, fitohemaglutinina, “pokeweed”, e antígenos: toxóide tetânico e *Candida albicans*. A interleucina-18 foi dosada por ELISA nos sobrenadantes de cultura e no soro dos doentes com dermatite atópica e controles. **RESULTADOS:** Os doentes com dermatite atópica apresentaram uma significativa inibição da resposta proliferativa das células mononucleares do sangue periférico à enterotoxina estafilocócica A, bem como à fitohemaglutinina, toxóide tetânico e *Candida albicans*. Além disso, foi ainda detectado um aumento nos níveis de interleucina-18 tanto nas amostras de soro quanto nos sobrenadantes de cultura dos atópicos adultos. **CONCLUSÕES:** Este estudo demonstrou um importante estado de imunossupressão nos doentes adultos com dermatite atópica, confirmado pela reduzida resposta para mitógenos e antígenos. Além disso, esses achados sugerem a participação da enterotoxina estafilocócica A e da interleucina-18 na patogênese da DA em adultos, possivelmente através de mecanismos imunológicos independentes.

Descritores: 1.DERMATITE ATÓPICA/imunologia 2.DERMATITE ATÓPICA/fisiopatologia 3.ENTEROTOXINAS 4.STAPHYLOCOCCUS AUREUS 5.INTERLEUCINAS 6.ADULTO

Summary

Orfali RL. *Evaluation of the proliferative response of peripheral blood mononuclear cells to Staphylococcus aureus enterotoxins A and B and of interleukin-18 levels in adult atopic dermatitis* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2005. 94p.

INTRODUCTION: Atopic dermatitis is a chronic, inflammatory disease with a high prevalence and complex etiopathogenesis. *Staphylococcus aureus* is present in 80 -100% of atopic dermatitis patients, and might be related to the pathogenesis of this disease. OBJECTIVE: To evaluate the proliferative response of peripheral blood mononuclear cells to staphylococcal enterotoxins A and B and interleukin-18 levels in adults with atopic dermatitis. METHODS: Peripheral blood mononuclear cells of 29 adult patients with atopic dermatitis and 25 healthy controls were stimulated with mitogens: staphylococcal enterotoxins A and B, phytohemagglutinin, pokeweed, and with antigens such as tetanus toxoid and *Candida albicans*. Interleukin-18 levels were measured by ELISA in culture supernatants and in sera of patients and controls. RESULTS: A significant inhibition of peripheral blood mononuclear cells proliferative response to staphylococcal enterotoxin A, phytohemagglutinin, tetanus toxoid and *Candida albicans* in patients with atopic dermatitis was detected. Moreover, an increased level of interleukin-18 was detected both in serum samples and culture supernatants of atopic patients. CONCLUSIONS: The present data demonstrated a remarkable immunosuppression in adults with atopic dermatitis, which was revealed by a reduced response to mitogens and antigens. Our findings also support a role of staphylococcal enterotoxin A and of interleukin-18 in the pathogenesis of atopic dermatitis in adults, most likely through independent immunological mechanisms.

Descriptors: 1.ATOPIC DERMATITIS/immunology 2.ATOPIC DERMATITIS/physiopathology 3.ENTEROTOXINS 4.STAPHYLOCOCCUS AUREUS 5.INTERLEUKINS 6.ADULTS

1 Introdução

Dermatite atópica (DA) é uma enfermidade cutânea inflamatória de caráter crônico, recidivante, e apresenta freqüentemente prurido intenso e xerose cutânea. É uma dermatose que se inicia geralmente na infância, e pode surgir em pessoas com história familiar de asma, rinite alérgica e/ou dermatite atópica. A doença afeta cerca de 10 a 15% das crianças e 1 a 3% dos adultos em muitas partes do mundo, sendo que essa prevalência está rapidamente aumentando nas últimas décadas (Wüthrich, 1999; Hanifin, Saurat, 2001; Leung et al., 2004).

A maioria dos doentes de DA melhoram até o início da adolescência e cerca de 20 a 40% continuam a apresentar a dermatite na vida adulta. Há relatos de casos em que o quadro cutâneo pode se iniciar na fase adulta, quando gera muitas dúvidas quanto ao diagnóstico da enfermidade (Hanifin, 1982; Sandström, Faergemann, 2004). Um novo subgrupo de DA foi recentemente descrito com início na fase adulta da vida, podendo apresentar, além das lesões com localizações típicas como localização flexural e modelo eczematoso, morfologias e localizações atípicas (Ozkaya, 2005).

A DA se manifesta por uma complexidade de características clínicas, destacando-se como principais as lesões pruriginosas e a pele seca. Estas

podem estar acompanhadas por mãos disidróticas ou eczema nos pés, alterações na queratinização (queratose folicular ou ictiose vulgar), tendência a desenvolver catarata subcapsular e ceratocone, alta susceptibilidade a infecções cutâneas (Hanifin, Saurat, 2001). Não há marcadores laboratoriais específicos e o diagnóstico é feito com base nessas características clínicas, utilizando-se os critérios maiores e menores estabelecidos por Hanifin e Rajka (1980).

A etiopatogenia da dermatite atópica é multifatorial: fatores genéticos, ambientais, psicológicos, alterações do sistema autônomo, do sistema imunológico, da barreira lipídica, bem como as infecções contribuem para o seu desencadeamento (Leung, 1999; Kang et al., 2003).

As alterações imunológicas na DA parecem ser as principais responsáveis pelo aumento da imunoglobulina E (IgE) sérica e da desregulação dos linfócitos T (LT). O aumento da IgE sérica, entretanto, não ocorre na totalidade dos doentes de DA. Em cerca de 20-30% dos casos são relatados níveis normais de IgE, sugerindo que outros fatores (não-imunológicos) possam também desencadear a resposta inflamatória (Leung, Soter, 2001).

Estudos com seguimentos de 15 a 20 anos na DA geralmente concordam que 40% dos doentes mostram melhora das lesões de dermatite atópica, enquanto aqueles com a doença mais grave são mais propensos a ter a doença persistente (Wüthrich, 1999).

A grande maioria dos trabalhos sobre dermatite atópica é descrita em crianças. Quando mencionam adultos, apenas é citado que raramente são vistos casos da dermatite começando nessa faixa etária. Por isso, é difícil o seu preciso diagnóstico, pois deve ser diferenciada de outras dermatoses (Hanifin, 1982).

Não existem publicações que concluam se a DA do adulto inicia-se na infância precoce ou tardia, ou se tem início tardio e com maior gravidade (Hanifin, 1982). Estudos epidemiológicos recentes sobre a prevalência da DA em adultos demonstram que estes correspondem a 30% da população dos atópicos, sem diferença significativa entre os sexos, e que constituem um importante problema social (Muto et al., 2003).

A partir da avaliação dos trabalhos publicados e da observação de que a população adulta com DA, freqüentadora do Ambulatório de Dermatite Atópica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), vem aumentando substancialmente nos últimos anos, resolveu-se estudar esses doentes, na tentativa de melhor delineá-los do ponto de vista clínico e imunológico.

2 Objetivos

Os objetivos do estudo ora proposto são avaliar e melhor definir o perfil clínico e laboratorial da dermatite atópica do adulto. Com a execução deste projeto, espera-se:

1. Definir o perfil clínico-epidemiológico da dermatite atópica do adulto no Ambulatório da Clínica Dermatológica do Hospital das Clínicas da FMUSP, baseando-se no levantamento de prontuários durante o período de julho de 2004 a julho de 2005.
2. Correlacionar os níveis séricos de IgE com a gravidade da doença.
3. Verificar a capacidade proliferativa das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) dos doentes adultos com DA aos mitógenos: enterotoxinas A e B do *Staphylococcus aureus* (SEA e SEB), fitohemaglutinina (PHA) e “pokeweed” (PWM), e aos antígenos específicos: *Candida albicans* (CMA) e toxóide tetânico (TT).
4. Dosar a interleucina-18 (IL-18) no soro e nos sobrenadantes de cultura das PBMC dos doentes com DA.

3 Revisão da Literatura

3.1 HISTÓRICO

A dermatite atópica (DA) foi inicialmente descrita por von Hebra ^{*} em 1844. Em 1891, Brocq e Jaquet ^{*} estabeleceram os termos: neurodermatite localizada e disseminada. Besnier ^{*}, em 1892, apresentou três doentes para demonstrar uma condição distinta que ainda tem a nomenclatura de “prurigo de Besnier” na Europa. Em 1923, Coca e Cooke ^{**} usaram o termo atopia para descrever condições de hipersensibilidade como asma e febre do feno e, depois, incluíram o “eczema atópico” neste grupo (*apud* Hanifin, 1982). A palavra atopia vem do grego *atopos* e significa estranho ou incomum (Kang et al., 2003).

Wise e Sulzberger ^{***}, em 1933, sugeriram o termo “dermatite atópica” para descrever tanto a pele ressecada e liquenificada vista em adultos, quanto as lesões exsudativas e eczematosas mais características da infância. Em 1935, Hill e Sulzberger ^{****} descreveram os estágios evolutivos

^{*} Chenowith BR, Lobitz WC Jr, Dobson RL. In: *Clinical Dermatology*, Hangerstown, MD, 1980, Harper & Row, Publishers, Inc., vol. 3, 13-2.

^{**} Coca AF, Cooke RA. On the classification of the phenomena of hypersensitiveness. *J Immunol* 1923; 8: 163-182.

^{***} Wise F, Sulzberger MB. Editorial remarks in: *Year book of dermatology and syphilology*. Chicago, 1933, Year Book Medical Publishers, Inc. p. 59.

^{****} Hill LW, Sulzberger MB. Evolution of atopic dermatitis. *Arch Dermatol* 1935; 32: 451-63.

da doença como “eczema infantil” (do nascimento até 2 anos de idade), “neurodermatite da infância” (de 2 até 12 anos de idade) e a forma adulta (*apud* Hanifin, 1982).

3.2 DIAGNÓSTICO

A DA é um problema clínico, difícil de se definir devido à sua morfologia, distribuição variáveis e também ao curso intermitente. Desta forma, a criação de critérios diagnósticos tornou-se uma medida necessária, especialmente para a investigação clínica (Williams, 2005).

Em 1980, Hanifin e Rajka propuseram os critérios diagnósticos da DA, baseados nas principais características clínicas da doença e constituídos por critérios maiores e menores (**Anexo A**).

Em Roma (novembro de 1999), foi realizado o primeiro Consenso Internacional de Dermatite Atópica (ICCAD) (Hanifin, Saurat, 2001), com o objetivo de discutir sobre sua história natural, espectro clínico e genético, alterações do sistema imune, barreira cutânea e função dos lipídios na pele com DA. O segundo ICCAD (Ellis et al., 2003) foi realizado em New Orleans (2002), onde foram abordados temas como a fisiopatologia e a epidemiologia da DA, com o intuito de desenvolver um algoritmo para tratamento da enfermidade.

3.3 GRAVIDADE DA DOENÇA

O trabalho pioneiro envolvendo a criação de escores de gravidade foi publicado por Rajka e Langeland em 1989. Estes autores propuseram uma graduação da DA em leve, moderada e grave, baseando-se na extensão das lesões, curso da doença e intensidade das lesões cutâneas. Em 1993, em um consenso realizado pela Força Tarefa Européia em Dermatite Atópica, foi validado um escore de gravidade (SCORAD), que combina extensão das lesões, gravidade e sintomas subjetivos. Hanifin et al. (2001) propuseram e validaram o EASI (“Eczema Area and Severity Index”), por considerarem o SCORAD mais direcionado para crianças, e que misturava observações de sinais e avaliação de sintomas (**Anexo B**).

Williams (2005) atenta para o fato de existirem inúmeras escalas de gravidade, geralmente não adequadas para um rápido acesso na prática clínica, mas importantes para tomada de conduta no tratamento da DA e para auxiliar a análise dos ensaios clínicos.

3.4 EPIDEMIOLOGIA

Estudos populacionais revelam que a DA vem aumentando substancialmente nas últimas décadas. A doença ocorre geralmente antes dos 7 anos de idade em 80-90% dos casos e, conseqüentemente, a

epidemiologia da DA vem sendo mais estudada em crianças. Antes de 1960, apenas 2-3% das crianças apresentavam DA; nos anos 60, esses dados aumentaram para 4-8%, e atingiram índices de 9-12% dos indivíduos estudados após 1970 (Larsen, Hanifin, 1992).

Larsen et al. (1996), em um estudo investigativo da ocorrência de DA no Norte da Europa, analisaram crianças de 7 anos de idade e verificaram que o aumento da prevalência da DA tem sido confirmado (16%), especialmente no sexo feminino.

Wüthrich (1999) verificou que nos anos 90 houve um aumento da prevalência da DA para 10-15%. Mostrou ainda que a maior associação de DA ocorreu com manifestações respiratórias como rinite e asma (40-60% dos casos) e que a persistência do quadro após a puberdade (40-60%) era mais elevada do que se imaginava. Em 2000, Williams descreveu que os estudos epidemiológicos mostraram que a DA é mais comum em famílias menores e mais ricas, com a prevalência aumentada nos grupos migrantes; ressalta que o aumento desta prevalência pode estar fortemente ligado a fatores ambientais, determinando assim, a expressão da doença.

Um estudo realizado com crianças na Cingapura (Tay et al., 2002), verificou que a alta prevalência da DA é semelhante à observada nos demais países desenvolvidos, corroborando a hipótese de que fatores ambientais têm um importante papel na doença.

Muto et al. (2003), estudando a prevalência da DA em adultos japoneses, verificaram que não houve diferenças significativas entre os

sexos e que cerca de 2,8 - 3,1% dos adultos estudados, que moravam em área urbana, tinham DA, reforçando a teoria da interferência dos fatores ambientais na DA. Sandström e Faergemann (2004) mostraram que o início precoce da DA, ou seu início na adolescência, aumentam o risco de DA persistente na vida adulta. Nesse estudo, a associação de DA persistente no adulto, com manifestação respiratória, foi de 69%.

O início da dermatite atópica na fase adulta constitui um novo subgrupo recentemente descrito (Ozkaya, 2005), no qual, além das lesões flexurais e eczematosas de localizações típicas, pode ocorrer distribuição não flexural e outras variantes morfológicas (ex.: lesões numulares ou prurigo-símile).

3.5 ETIOPATOGENIA

A etiopatogenia da dermatite atópica é multifatorial: fatores genéticos, ambientais, psicológicos, alterações do sistema autônomo, do sistema imunológico, e da barreira lipídica, bem como as infecções contribuem para o seu desencadeamento (Leung, 1999). Alguns destes aspectos serão discutidos a seguir.

3.5.1 Fatores Genéticos

A influência da genética na DA é indiscutível. Quando um dos pais tem DA, a probabilidade de um filho ser atópico é de 56%; caso ambos os pais tenham DA, esta probabilidade aumenta para 81%. Estudos realizados em gêmeos com DA, verificando a predisposição genética, mostraram que gêmeos monozigóticos apresentam razão de concordância para DA de 0,72, enquanto que em gêmeos dizigóticos foram detectados essa mesma razão ao redor de 0,23 (Larsen, 1993). Essas observações sugerem que a DA representa uma doença geneticamente complexa (Novak et al., 2003).

Os estudos genéticos são importantes não só para investigar doenças complexas com componente genético, mas também para se entender melhor a enfermidade. O grande polimorfismo genético observado na DA pode estar correlacionado com características específicas da doença e pode ser usado para definir subgrupos da doença, bem como um melhor ou pior prognóstico, ou, ainda, uma resposta particular a determinados tratamentos. Estudos mostram que o eczema resulta de uma interação entre os genes e fatores ambientais, mas o seu mecanismo ainda é desconhecido (Cookson, 2001).

Em revisão sobre a patogenia da DA, Leung (1999) descreve que, apesar de haver mais de 20 genes aparentemente envolvidos no desenvolvimento das doenças alérgicas, há um particular interesse no papel do cromossomo 5q31-33. Este cromossomo contém um agrupamento de

genes de famílias de citocinas como: interleucina-3 (IL-3), IL-4, IL-5, IL-13 e fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), as quais são expressas pelas células T auxiliares tipo 2 (Th2).

Wollenberg e Bieber (2000) concluíram em sua revisão que há numerosos relatos de associação entre genes e atopia, mas existem muitos resultados contraditórios publicados. Esses relatos são mais direcionados aos níveis séricos de IgE, pouco associados com doença respiratória, e, raramente, específicos para manifestações cutâneas da DA. Há dificuldade em se determinar um único gene associado com a patogênese da DA, devido ao grande número de genes envolvidos que, possivelmente, não seguem os padrões mendelianos.

Na **Tabela 1** estão sintetizados os principais genes relacionados com a etiopatogenia da DA.

Tabela 1 - Possíveis genes relacionados à dermatite atópica

Localização Cromossômica	Genes Candidatos	Estudos
3q21	Ativação LT (CD80/86)	Lee, 2000
5q31-33	IL-4	Kawashima, 1998
11q13	Subunidade β do receptor de alta afinidade para IgE (Fc ϵ RI)	Folster-Host, 1998
13q12-14	Não identificado	Beyer, 2000
14q11, 2	Quimase do mastócito	Mao, 2000
1q21, 17q25, 20p	Genes da inflamação dérmica?	Cookson, 2000

Adaptado de: Maclean JA, Eidelman FJ. *Arch Dermatol* 2001; 137: 1474-6.

3.5.2 Alterações imunológicas

As alterações imunológicas na DA parecem ser as principais responsáveis pelo aumento da IgE sérica e da desregulação dos LT. O aumento da IgE sérica, entretanto, não ocorre na totalidade dos doentes de DA; em cerca de 20-30% dos casos são relatados níveis normais de IgE, sugerindo que outros fatores (não-imunológicos) possam também desencadear a resposta inflamatória (Leung, 2001). As principais alterações imunológicas na DA serão discutidas a seguir.

A. Alterações nas lesões cutâneas de DA

1. Padrão bifásico da expressão de citocinas na DA

O padrão de citocinas presentes no momento da exposição antigênica é um dos maiores determinantes que conduz o direcionamento fenotípico Th1 ou Th2 de um linfócito T auxiliar (Th). As células Th1 são estimuladas pela IL-12 produzidas por macrófagos e células dendríticas, enquanto a IL-4 estimula as células tipo Th2. A expressão do receptor de IL-12 é induzida por IL-12, IFN- α e IFN- γ e inibida pela IL-4 que, por sua vez, inibe a produção de IFN- γ desviando a resposta para o padrão Th2 (Leung, 1999; Stevens, Cooper, 2000; Banfield et al., 2001).

Existem padrões distintos de expressão de citocinas na pele do atópico, dependendo da fase do processo inflamatório (Leung, Soter, 2001):

- pele não acometida: predomínio de células que expressam IL-4 e IL-13 (padrão Th2).
- fase aguda: predominância da expressão de IL-4 e IL-13, citocinas de padrão Th2 (**Figura 1**).
- fase crônica: o padrão predominante é de IFN- γ (citocina de padrão Th1) e de IL-5 (Th2). Também há maior expressão do GM-CSF, importante para a manutenção do processo crônico (**Figura 2**).

A mudança de um padrão Th2 para o padrão Th1 pode ser mediada pela infiltração de eosinófilos e de macrófagos que produzem IL-12. Ainda, quimiocinas CC como o RANTES (regulado sob ativação de célula T normal expressa e secretada), proteína-3 quimiotática para monócitos e eotaxina estão aumentadas na DA e podem contribuir para a quimiotaxia de eosinófilos para a pele (Leung, 1999; Kang et al., 2003).

Figura 1 - Dermatite atópica: fase aguda

Figura 1: Células de Langerhans (CL) são capazes de capturar e processar alérgenos e auto-antígenos via MHC, e induzem a ativação de linfócitos T nos linfonodos e na pele. Os monócitos produzem $IL-10$ e prostaglandina E_2 (PGE_2), que promovem a diferenciação celular do LT na direção Th2, com expressão aumentada de $IL-4$, 5 e 13. Os LTh2-CLA+ são recrutados para a pele com o auxílio de quimiocinas (CCL17 ou TARC, CCL5 ou eotaxina-1, CCL11 ou RANTES). As células B, estimuladas pela $IL-4$ e $IL-13$ secretadas pelo LTh2, passam a produzir IgE. Os queratinócitos ativados podem ser estimulados por superantígenos e pela coçadura, produzindo $TNF-\alpha$ (fator de necrose tumoral alfa), GM-CSF (fator estimulador de colônia de macrófago/granulócito) e quimiocinas. Mastócitos ativados liberam $TNF-\alpha$, $IL-4$ e $IL-13$, e juntamente com CD40L aumentam a expressão de P-selectina, E-selectina e VCAM-1 (molécula de adesão celular vascular) nas células endoteliais, que por sua vez promoverão o recrutamento de células para a pele a partir do sangue circulante.

Figura 2 - Dermatite atópica: fase crônica

Figura 2: Células de Langerhans capturam e processam alérgenos e auto-antígenos e os apresentam ao LT. A epiderme espessada produz GM-CSF e mantém as CL e a infiltração de células inflamatórias. Os eosinófilos estão elevados no sangue periférico dos doentes de DA, e migram para a derme juntamente com monócitos e LT. Os eosinófilos são fonte de IL-12, permitindo a indução de LTh1 via IFN- γ . Queratinócitos ativados e mastócitos produzem TNF- α , regulando de forma positiva a expressão de P e E-selectinas e VCAM-1 no endotélio, e recrutando mais células inflamatórias. TNF- α age em sinergismo com IFN- γ , promovendo a produção de quimiocinas (CCL9-11) que atuam recrutando células de perfil Th1.

2. Células de Langerhans e macrófagos associados à IgE

Células de Langerhans (CL) e macrófagos que se infiltram nas lesões de DA possuem IgE na sua superfície. As CL que apresentam tal característica são mil vezes mais eficientes do que as que não possuem IgE na sua superfície, pois capturam e internalizam os alérgenos com maior facilidade. A interação da IgE com as CL possibilita a captura de alérgenos ativando LTh2 de memória, mas também migram para linfonodos regionais para estimular células T naíves (Kang et al., 2003).

O receptor de IgE (FcεRI) expresso nas CL não possui a cadeia beta (β) e sua ativação depende de fatores locais. A expressão de FcεRI parece estar relacionada aos níveis séricos de IgE (Stevens, Cooper, 2000; Kang et al., 2003).

Estudos envolvendo a fenotipagem das células dendríticas epidérmicas, obtidas de suspensão de células inflamatórias epidérmicas na DA, através de citometria de fluxo, mostram que há duas populações distintas: as células de Langerhans e as células dendríticas epidérmicas (IDEC). As IDEC são células dendríticas que não possuem grânulos de Birbeck, mas que apresentam fenótipo CD1a⁺ e níveis ainda mais elevados de expressão de FcεRI. Essas células provavelmente exercem uma função de perpetuação da resposta inflamatória (Oppel et al., 2000; Banfield et al., 2001; Kang et al., 2003; Novak et al., 2003).

Os macrófagos possuem receptores de IgE de baixa afinidade, em contraste com os FcεRI das CL, considerados de alta afinidade. Os alérgenos são capazes de agir através de um mecanismo dependente de macrófagos ligados à IgE, estimulando a secreção de leucotrienos, fator de agregação plaquetária, IL-1 e TNF. Além disso, doentes com DA produzem anticorpos anti-IgE, que vão contribuir com a perpetuação da resposta inflamatória (Leung, 1999).

3. Mastócitos, basófilos e macrófagos

Os mastócitos, basófilos e macrófagos estão aumentados nas lesões crônicas de DA e produzem mediadores inflamatórios, tais como leucotrienos, prostaglandinas, proteases e fator ativador de plaquetas. São fontes de TNF- α e, por sua vez, induzem a uma regulação positiva para moléculas de adesão celular tais como a selectina-E, VCAM-1 e molécula de adesão intracelular (ICAM-1), que recrutam células mononucleares e eosinófilos para o local da inflamação (Stevens, Cooper, 2000).

Os mastócitos e basófilos, quando ativados, produzem citocinas Th2 importantes, como a IL-4 e IL-13. Estas células também expressam o ligante para CD40, molécula expressa pelos LB que contribui para a produção de IgE por um mecanismo independente dos LT (Kang et al., 2003).

4. Eosinófilos

Lesões crônicas de DA apresentam depósitos de proteínas granulares que incluem: a proteína básica maior, a proteína eosinofílica catiônica, a neurotoxina derivada do eosinófilo e a peroxidase eosinofílica. Essas proteínas são depositadas nas lesões de DA, através da degeneração citolítica dos eosinófilos e possuem a capacidade de induzir a degranulação de basófilos e de mastócitos, além de poder ocasionar dano tecidual por suas propriedades citotóxicas (Kang et al., 2003; Novak et al., 2003).

Os eosinófilos produzem também um fator quimiotático de linfócitos (IL-16); CCL5 (RANTES), um fator quimiotático para linfócitos e eosinófilos; e CCL11 (eotaxina), um fator quimiotático exclusivo de eosinófilos (Leung, Soter, 2001; Kang et al., 2003; Ring et al., 2005).

5. Queratinócitos epidérmicos

Os queratinócitos participam ativamente da iniciação e amplificação do processo inflamatório na DA através da produção de várias citocinas e quimiocinas. Essas moléculas podem ser liberadas como consequência a qualquer alteração da permeabilidade epidérmica (coçadura, radiação ultravioleta, irritantes, bactérias e viroses) e favorecem o desenvolvimento de reações inflamatórias (Kang et al, 2003; Ring et al., 2005).

O queratinócito é uma fonte de TNF- α e de GM-CSF. O GM-CSF exerce um papel fundamental para a sobrevivência dos monócitos e CL. Na DA há aumento da produção de GM-CSF, e os queratinócitos epidérmicos,

quando estimulados com IFN- γ e TNF- α , produzem níveis elevados de RANTES (CCL5) que, por sua vez, aumentam a quimiotaxia de eosinófilos (Kang et al., 2003).

Estudos recentes evidenciam a presença de quimiocinas CC nos queratinócitos da pele lesada na DA, que podem exercer um papel fundamental no recrutamento dos linfócitos CLA⁺ (antígeno linfocitário cutâneo) de memória. Destacam-se as quimiocinas CCL17 (“thymus and activation-regulated chemokine”, TARC) e a CCL20 (“liver and activation-regulated chemokine”, LARC) (Kang et al., 2003; Novak et al., 2003).

6. Células endoteliais

As células endoteliais das vênulas dérmicas, após ativação, participam do tráfego de células inflamatórias da corrente sangüínea para a pele, expressando moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1, selectina-E) e quimiocinas (IL-8) (Kang et al., 2003).

7. Auto-alergia na DA

Valenta et al., em 1996, verificaram que doentes com lesões cutâneas de DA apresentavam várias proteínas humanas presentes em diferentes tipos celulares com reatividade para IgE. A auto-reatividade da IgE pode ser um fator patogênico mantenedor da resposta inflamatória na DA. O trauma inicial da pele, através da coçadura, leva à liberação de citocinas pró-inflamatórias pelos queratinócitos (IL-1, TNF- α , IL-4,

quimiocinas CC), imprescindíveis para a adesão molecular e direcionamento dos linfócitos, macrófagos e eosinófilos para a pele (Valenta et al., 1996; Leung, Soter, 2001; Ring et al., 2005).

8. “Skin-homing”: migração órgão-específica dos LTh2

Linfócitos T que migram para a pele na DA expressam altos níveis de CLA, uma molécula de adesão celular envolvida neste processo denominado de “skin-homing”. A expressão de CLA pelo LT é regulada por muitas citocinas: TGF- β (“Transformation Growth Factor”), IL-12, IL-6, que aumentam essa expressão; ainda, estudos mostram que LT-CLA+, na DA, secretam IL-5 e IL-13, prolongando a sobrevivência do eosinófilo e induzindo a síntese de IgE. Na presença de superantígenos bacterianos, há estímulo da expressão de CLA, via IL-12 (Leung et al., 1995a; Novak et al., 2003).

B. Anormalidades do sangue periférico

1. IgE sérica

Cerca de 85% dos indivíduos com DA possuem IgE elevada. Os níveis elevados de IgE parecem se relacionar com a gravidade da doença e com manifestação respiratória.

Os níveis séricos de IgE correlacionam-se com a eosinofilia. Níveis séricos elevados da proteína catiônica do eosinófilo e selectina-E solúvel correlacionam-se, por sua vez, com a atividade da doença.

A IgE colabora na patogenia da DA de várias formas (Leung, 1999; Leung, Soter, 2001; Kang et al., 2003):

- liberação de histamina ou outros mediadores por basófilos ou mastócitos, através de ligações da IgE com alérgenos ou produtos microbianos;
- a interação das moléculas de IgE com macrófagos pode induzir a liberação de mediadores inflamatórios quando provocados por alérgenos ou anticorpos da classe IgG contra IgE;
- a interação das moléculas de IgE com receptores de alta afinidade expressos nas CL da epiderme de doentes com DA propicia a apresentação de alérgenos aos LT;
- autoanticorpos IgE contra proteínas humanas (*Hom s 1*, isolada de queratinócitos humanos, 55 kDa) têm sido relatados em doentes com DA grave, sugerindo um possível papel de manutenção da DA crônica.

2. Perfil de produção de citocinas na DA

Na DA, verificamos que há uma produção aumentada das citocinas de padrão de resposta celular tipo Th2 (IL-4, 5 e 13) e redução na expressão das citocinas de padrão Th1 (interferon-gama - IFN- γ). Tais achados são

importantes, uma vez que IL-4, IL-5 e IL-13 são citocinas que promovem a produção de IgE a partir dos LB. As mesmas citocinas, juntamente com o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), e com a IL-1, induzem a expressão da molécula de adesão celular vascular (VCAM-1) pelas células endoteliais, facilitando a migração de linfócitos e eosinófilos para os sítios de inflamação. Isoladamente, a IL-4 está envolvida na diferenciação e desenvolvimento dos LTh2, e a IL-5, na diferenciação, recrutamento e sobrevivência dos eosinófilos. Os LB, na DA, apresentam um aumento da expressão da molécula CD23 (receptor de IgE de baixa afinidade) e da molécula co-estimulatória CD86, que agem como moduladores da produção de IgE (Leung, 1999; Leung, Soter, 2001; Kang et al., 2003).

3. IL-18 na DA

Interleucina-18 (IL-18) é uma citocina de 18 kDa secretada por macrófagos ativados ou células de Kupffer, monócitos, queratinócitos e células dendríticas (Park et al., 2004; Novak et al., 2005).

A IL-18 foi inicialmente descoberta como fator de indução do IFN- γ e tem uma importante influência na resposta Th1, por sua habilidade de induzir a produção de IFN- γ , especialmente em colaboração com a IL-12 (El-Mezzein et al., 2001; Yoshizawa et al., 2002; Holla, 2003). A IL-12 induz a diferenciação das células Th0 em células Th1, estimula a produção de IFN- γ e auto-regula a expressão do receptor de IL-18 nas células Th1, células T e células B. A IL-18 potencializa a função da IL-12 no

desenvolvimento Th1 (Yoshizawa et al., 2002). A IL-18 também é capaz de induzir citocinas Th2 e produção de IgE em sinergismo com IL-2. Essa habilidade diversa da IL-18 em regular a função Th1/ Th2 é também exercida pelas IL-2 e IL-12 (Shikano et al., 2001; El-Mezzein et al., 2001; Holla, 2003; Ohnishi et al., 2003; Higa et al., 2003; El-Mezayen, Matsumoto, 2004).

Recentemente tem sido demonstrado um importante papel da IL-18 na DA. Estudos com polimorfismo genético mostram que o gene para IL-18 humana está localizado no cromossomo 11q22.2-22.3, região que tem sido designada como candidata para atopia. Estes dados revelaram uma associação entre polimorfismos no gene de IL-18 com uma desregulação funcional da produção de IL-18 em doentes com DA, o que pode indicar sua participação na fisiopatologia da doença (Novak et al., 2005).

Shida et al. (2001) demonstraram que altos níveis de IL-18 podem estar correlacionados com os níveis séricos de IgE em doentes com DA. Hon et al., em 2004, verificaram que a concentração sérica de IL-18 está correlacionada com a extensão da doença em crianças com DA. Ainda em 2004, Sohn et al. verificaram uma associação entre níveis de IL-18 com aumento da gravidade da doença em crianças com DA.

Um estudo interessante (Stuyt et al., 2001) demonstra que a IL-18 parece não exercer um papel fundamental na indução de IFN- γ após estímulo com superantígenos (SEB).

Estudos recentes realizados em modelos animais sugerem que a IL-18 poderia contribuir para a patogenia da DA. Dentre os principais estudos, citamos:

- 1- Shiohara et al., 2004: camundongos transgênicos para IL-18 desenvolvem lesões de DA-símile e elevação de IgE sérica.
- 2- Konishi et al., 2002: estudos com camundongos transgênicos para IL-18 revelam que um grande acúmulo de IL-18 pode ser primariamente responsável por indução de doença DA-símile dependente de IgE, e que a determinação dos níveis séricos de IL-18 pode ser importante na DA .
- 3- Culshaw et al., 2005: altos níveis de IL-18 em camundongos, antecedendo a infecção por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), aumenta o risco de septicemia e mortalidade. Estes dados sugerem que níveis elevados de IL-18 encontrados em doentes com doenças inflamatórias crônicas podem refletir um pior prognóstico durante episódios infecciosos.
- 4- Nakano et al., 2003: o transplante de pele de um camundongo transgênico para caspase-1 com lesões ativas de dermatite crônica, para um camundongo tipo selvagem, resultou em aumento de níveis séricos de IL-18 e IL-1 β . Após estímulo com proteína A purificada da parede do *S. aureus*, também se verificou aumento dos níveis séricos de IL-18 e IgE .

3.5.3 Alterações da fosfodiesterase

Monócitos de doentes de DA apresentam atividade aumentada da enzima fosfodiesterase-cAMP (cAMP-PDE) e conseqüentes níveis reduzidos de cAMP (monofosfato de adenosina cíclica), em decorrência de uma hidrólise de cAMP aumentada. Isso leva a um desequilíbrio imune, caracterizado pelo aumento da síntese de IgE pelos LB e produção de IL-4 pelos LT. Também ocorre aumento de IL-10 e prostaglandina E2, o que leva à inibição da produção de IFN- γ . Inibidores da PDE atuam sobre os superantígenos, diminuindo sua atividade, e reduzem a expressão dependente de IL-12 dos receptores CLA⁺ dos LT (Leung, 1999; Stevens, Cooper, 2000; Leung, Soter, 2001; Kang et al., 2003; Novak et al., 2003).

3.5.4 Fatores psicológicos

Hashizume et al. (2005) mostram que o estado de ansiedade nos doentes com DA pode contribuir para um desequilíbrio imunológico no eixo Th1/Th2, acompanhado de elevados níveis séricos de IgE.

3.5.5 Neuropeptídeos

Os neuropeptídeos (NP) são aminoácidos que agem como neurotransmissores ou neuromoduladores. Na pele humana, os NP mais encontrados são o peptídeo vasoativo intestinal (VIP), o gene relacionado à calcitonina (CGRP) e a substância P (SP). O VIP e a CGRP são encontrados ao redor de vasos e glândulas sudoríparas écrinas. Os nervos sensoriais cutâneos que liberam NP podem agir como moduladores das funções dos queratinócitos, CL, mastócitos, células endoteliais e células imunológicas. Além disso, leucócitos mononucleares, mastócitos e eosinófilos são capazes de produzir precursores dos NP (Novak et al., 2003; Kang et al., 2003).

Parece ocorrer uma maior disponibilidade dos neuropeptídeos nas lesões de DA e uma sensibilidade alterada dos mastócitos e dos vasos a esses peptídeos. Os níveis de VIP estão aumentados e os de SP estão reduzidos na pele lesada do atópico, e uma aposição próxima das fibras nervosas com os mastócitos foi observada na DA (Novak et al., 2003; Kang et al., 2003).

3.5.6 Papel do *Staphylococcus aureus* na DA

Uma condição relevante na dermatite atópica é a colonização na pele pelo *S. aureus* em cerca de 80 a 100% dos casos (Leyden et al., 1974; Tomi

et al., 2005), em contraste com indivíduos normais, que apresentam índices de colonização pela bactéria ao redor de 5 a 30% (Aly et al., 1977; Dahl, 1983; Matsui et al., 2000).

O mecanismo pelo qual o *S. aureus* causa exacerbação no quadro de DA é controverso. Admite-se que ele possa aumentar a sua colonização por injúria direta na pele (prurido, variação do pH da pele), ou pela liberação de enterotoxinas que funcionam como superantígenos, induzindo a ativação policlonal de células T (Zollner et al., 2000; Leung et al., 1995b).

A susceptibilidade da pele do atópico à colonização pelo estafilococo parece estar relacionada a diversos fatores, entre os quais a aderência bacteriana. As adesinas são receptores para laminina e fibronectina e estão localizadas na parede do *S. aureus*. Na DA, os receptores para fibronectina parecem estar descobertos, facilitando, assim, a aderência da bactéria. Outro fator seria o defeito na membrana lipídica da pele do atópico, que facilita a penetração bacteriana por entre os espaços intercelulares da epiderme (Leung et al., 1995b).

O *S. aureus* pode secretar várias enterotoxinas (A, B, C, etc.) e a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) que podem atuar como superantígenos, estimulando de forma policlonal linfócitos T e macrófagos, sem a interferência do sistema MHC (complexo principal de histocompatibilidade). O superantígeno interage diretamente com porções constantes da cadeia V β do receptor de linfócitos T (Zollner et al., 2000).

Um outro mecanismo possível seria a geração de anticorpos IgE específicos para as enterotoxinas, ou seja, os superantígenos poderiam atuar como alérgenos, uma vez que 57% dos doentes de DA apresentam IgE dirigida contra enterotoxina estafilocócica tipo A (SEA), enterotoxina estafilocócica tipo B (SEB) e TSST-1. Estudos mostram que existe correlação entre a gravidade da DA e a presença de anticorpos IgE contra esses superantígenos, o que pode significar: 1) que os superantígenos têm um importante papel na patogênese da DA; 2) que eles são também processados como antígenos (Zollner et al., 2000; Breuer et al., 2001; Proft, Fraser, 2003).

Superantígenos são potentes fatores de virulência que estimulam muitos processos imunológicos e possuem uma grande importância na manutenção da inflamação. Um superantígeno se liga como uma proteína não processável, nas regiões não polimórficas das moléculas de classe II do MHC, na superfície da célula apresentadora de antígeno (APC), que são regiões distintas da área habitual de ligação do antígeno convencional (Jappe, 2000). Os superantígenos interagem com um grande número de células T, as quais compartilham seqüências particulares nas regiões variáveis da cadeia β ($V\beta$) do receptor de célula T (TCR) e, por sua vez, estimulam cerca de 20% da população de células T naive (**Figura 3**).

Os superantígenos são moléculas bifuncionais: a porção amino-terminal tem uma alta afinidade de ligação à cadeia α de classe II do MHC

(receptor de superantígeno); já a porção carboxi-terminal é responsável por uma forte ligação com o TCR (Jappe, 2000).

Indivíduos que possuem grande número de células T expressando cadeias V β , que podem interagir com um particular superantígeno, irão desenvolver mais facilmente respostas mais fortes a este superantígeno, em comparação aos indivíduos com pequeno número destas células no seu repertório (Yudate et al., 1996; Jappe, 2000).

Os superantígenos bacterianos são potentes estimuladores da atividade da célula T, levando a altos níveis de citocinas, como por exemplo: TNF, IL-1, IL-2, IL-6, IFN- γ . Eles podem induzir anergia, inflamação, citotoxicidade, deleção de células T e autoimunidade (Leung et al., 1995b; Campbell, Kemp, 1997).

Tem sido demonstrado que SEB pode promover reações inflamatórias, quando aplicada diretamente sobre a pele intacta de indivíduos saudáveis e atópicos. Além disto, tem sido evidenciado que SEB induz uma supressão da resposta proliferativa nas PBMC de doentes atópicos, associada a uma diminuição na secreção de IFN- γ e aumento da produção de IL-4 (Yudate et al., 1996; Tanaka et al., 1996; Campbell, Kemp, 1997; Yoshino et al., 2000). A persistência do *S. aureus* na pele poderia contribuir com a inflamação da mesma, causando ativação contínua de células T e macrófagos. Estudos recentes demonstram que superantígenos estafilocócicos induzem a produção de GM-CSF, resultando na inibição de

apoptose de macrófagos e monócitos, eventos que poderiam perpetuar a cronicidade da DA (Leung et al., 1995b; Campbell, Kemp, 1997).

Outros mecanismos do *S aureus* envolvidos na resposta inflamatória da DA incluem: influência sobre as APC e eosinófilos, modulando a resposta de antígenos de superfície celulares; liberação de toxinas (α -toxinas), que levam ao dano citotóxico em queratinócitos, e estimulam a liberação de TNF- α ; aumento da síntese de IgE e da expressão da molécula CD23 (receptor de baixa afinidade para IgE) *in vitro* ocasionados por componentes da parede bacteriana, como o ácido teicóico ou peptidoglicanas (König et al., 1995).

As concentrações de IgE sérica podem se correlacionar com a atividade da doença na pele e com a colonização de *S. aureus*. Se os antígenos estafilocócicos contribuem para a inflamação alérgica da pele, é esperado que haja aumento na produção de IgE em resposta aos mesmos (Lin et al., 2000; Shida et al., 2001).

Figura 3 - Mecanismo de ação do *Staphylococcus aureus*

Figura 3: O *Staphylococcus aureus* pode atuar como antígeno convencional ou como superantígeno para ativar as células T. Ao contrário dos antígenos, os superantígenos não são processados e podem ligar-se diretamente na superfície da molécula de classe II do MHC, com especificidade pela cadeia Vβ do TCR.

4 Métodos

4.1 SELEÇÃO DOS INDIVÍDUOS

No período de julho de 2004 a julho de 2005, foi realizado um levantamento através de prontuários dos doentes atendidos no período de 1989 a 2000. Destes, foram selecionados 29 doentes de DA (segundo os critérios maiores e menores de Hanifin e Rajka, 1980 – **Anexo A**), com idade acima de 18 anos e de ambos os sexos, com início da DA desde a infância ou de aparecimento tardio. Estes doentes fazem parte do ambulatório especializado de dermatite atópica do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), coordenado pelos Drs. Roberto Takaoka e Valéria Aoki. Foi analisado também um grupo controle não atópico com idade acima de 18 anos. Todos os indivíduos que participaram do estudo leram e concordaram com o termo de consentimento livre e esclarecido (**Anexo C**).

4.2 AVALIAÇÃO DOS DOENTES

O índice de gravidade utilizado foi o EASI (“Eczema Area and Severity Index”) (Hanifin et al., 2001), conforme **Anexo B**. Os doentes foram divididos em dois subgrupos (n = 29): aqueles apenas com DA e um grupo com DA e manifestações respiratórias (rinite e/ou asma alérgica).

Os doentes foram submetidos a uma bateria de exames laboratoriais gerais, realizados no Laboratório Central do Complexo HC-FMUSP:

4.2.1 Avaliação geral

- Dosagem de imunoglobulinas séricas
- Hemograma completo
- Frações C3 e C4 do complemento
- Glicemia sérica
- PPF (protoparasitológico de fezes)
- Urina I

4.2.2 Dosagem de IgE sérica

A dosagem de IgE foi realizada no Laboratório Central do Complexo HC-FMUSP, utilizando-se o reagente N Látex IgE Mono (Dade Behring, Marburg/Germany). Foram considerados níveis normais até 100 UI/mL.

4.2.3 Obtenção das células mononucleares do sangue periférico

As PBMC foram obtidas a partir de amostras de sangue periférico dos indivíduos, coletadas em tubo heparinizado estéril. O sangue foi diluído com solução fisiológica a 0,9%, volume a volume, em tubo plástico. As suspensões das células mononucleares foram obtidas após centrifugação por 20 minutos, a 2000 rpm, em centrífuga refrigerada, através de gradiente de Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Sweden). As células obtidas foram ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640, suplementado com gentamicina (40 µg/mL) e 10% de “pool” de soro humano AB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Para contagem das células foi utilizado contador automático (Cell Dyn 1400, Abbott). A concentração das PBMC foi ajustada para 2×10^5 /poço e o cultivo foi realizado em microplacas de 96 poços (Costar, Cambridge, MA) a 37 °C e 5% de CO₂ na presença de mitógenos como: SEA (0,04 µg/mL; Sigma, St. Louis, MO, USA), SEB (1 µg/mL; Sigma, St. Louis, MO, USA), PHA (2,5 µg/mL; Gibco BRL, NY, USA) e PWM (5 µg/mL; Sigma, St. Louis, MO, USA); e antígenos como: CMA (5 µg/mL; Sanofi-Pasteur, France) and TT (0,04 Lf/mL; Instituto Butantã, São Paulo, Brasil) (Cacere et al., 2002).

4.2.4 Cultura das células mononucleares do sangue periférico

Para o ensaio de linfoproliferação, as células foram incubadas por 3 dias (quando estimuladas com SEA, SEB e PHA) ou 6 dias (quando estimuladas com PWM, CMA e TT) e pulsadas depois de 18 horas de cultivo com 1,0 μCi /poço de timidina tritiada [^3H] (Radiochemical Center, Amersham, UK). Após o término da incubação, as culturas foram aspiradas com auxílio de coletor de células automático (Combicell Harvester, Skatron) em membranas de fibra de vidro (Wallac Oi, Turku, Finland). A radioatividade incorporada foi avaliada por contador Betaplate 1205 (Wallac Oi, Turku, Finland), e o resultado foi apresentado em média aritmética de triplicatas de poços estimulados e não estimulados (Δcpm : média aritmética das triplicatas - média das culturas não estimuladas) ou pelo índice de estimulação (IE: cpm das culturas estimuladas/ cpm das culturas não estimuladas) (Cacere et al., 2002). Toda a metodologia para obtenção e cultura das células mononucleares do sangue periférico está ilustrada na **Figura 4**.

Figura 4 - Teste de estimulação linfocitária

Figura 4: O sangue coletado é diluído em solução salina estéril, transferido para gradiente de concentração Ficoll-Hypaque, e, centrifugado a 2200 rpm. Após separação do sangue, as células mononucleares são coletadas e lavadas, com posterior ajuste em sua concentração. As células são então colocadas nas microplacas para cultivo juntamente com os mitógenos e/ou antígenos. Antes do término do cultivo, as células são pulsadas com timidina tritiada. Após o término do cultivo, as células são aspiradas em filtro de fibra de vidro e a radioatividade incorporada é avaliada por contador Betaplate.

4.2.5 Curva dose-resposta para SEA e SEB

Devido à grande variabilidade de doses utilizadas nos vários ensaios de proliferação encontrados na literatura, houve necessidade de realizar uma curva dose-resposta para as enterotoxinas A e B do *S. aureus* e escolha de uma dose adequada para realização do ensaio de proliferação (König et al., 1995; Tanaka et al., 1996; Yudate et al., 1996; Yoshino et al., 2000).

4.2.6 ELISA (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”) para dosagem de IL-18

As PBMC foram centrifugadas no gradiente de Ficoll-Hypaque, lavadas e cultivadas em microplacas de 96 poços na concentração de 2×10^6 células/poço com SEA, SEB e PHA por 6, 24 e 48 horas em uma estufa umidificada a 37 °C e 5% de CO₂; em seguida, os sobrenadantes de cultura foram coletados e estocados a -70 °C até a realização do ELISA. Amostras de soro foram também coletadas e estocadas a -70 °C. As determinações de IL-18 (MBL, Nagoya, Japan) nos sobrenadantes de culturas e amostras de soro foram realizadas por ELISA de acordo com as instruções do fabricante.

Resumidamente, as amostras foram incubadas nas microplacas que continham anticorpos monoclonais anti-IL-18 humana por 1 hora, em temperatura ambiente. Após um ciclo de quatro lavagens com solução de lavagem, foi adicionado em cada poço um anticorpo monoclonal anti-IL-18 humano conjugado a peroxidase. Depois de mais quatro lavagens, o substrato peroxidase foi misturado com o cromógeno e incubado por mais 1 hora em temperatura ambiente. Solução de ácido sulfúrico foi adicionada em cada poço para finalizar a reação e estabilizar o desenvolvimento da cor. A densidade óptica de cada poço foi então verificada por um leitor de microplaca de ELISA (Molecular Devices, CA, EUA), em 450 nm. A concentração de IL-18 humana foi calibrada por uma curva dose-resposta

baseada nos modelos de referência. O nível limite de detecção de IL-18 foi 25,6 pg/mL.

4.3 ÉTICA

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 14.07.04, sob protocolo de Pesquisa nº 300/04 (**Anexo D**), apresentado ao Departamento de Dermatologia, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Anexo C**).

4.4 ESTATÍSTICA

Para realização da análise estatística dos dados e construção dos respectivos gráficos, foi utilizado o software GraphPad Prism versão 3.00. Os testes não-paramétricos de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis foram utilizados respectivamente para comparar dois ou três grupos de dados. A correlação entre os dados foi estabelecida utilizando-se o teste de correlação não-paramétrico de Spearman. A diferença entre os grupos analisados foi considerada estatisticamente significativa, quando o valor de P foi menor ou igual a 0,05.

5 Resultados

5.1 ANÁLISE DOS DOENTES

Total de doentes que freqüentaram o ambulatório de dermatite atópica no período de 1989 a 2000: n = 1362

- Sexo feminino = 723 (53%)
- Sexo masculino = 639 (47%)
- Doentes maiores que 18 anos = 487 (35,7%)

Dentre os 29 doentes adultos com dermatite atópica incluídos no estudo proposto (**Anexo E**), podemos observar que :

Total de doentes estudados: n = 29

- Sexo feminino = 15 (52%)
- Sexo masculino = 14 (48%)

Média das idades dos doentes = 26,6 anos

- Idade mínima = 18 anos
- Idade máxima = 46 anos

Os doentes estudados (**Figuras 5 e 6**) foram também analisados conforme: idade de início da doença, etnia, escore de gravidade, fase de atividade da doença e associação ou não da doença com manifestação respiratória, conforme podemos observar nos **Gráficos de 1 a 5**.

Figura 5 – Dermatite atópica do adulto: acometimento cérvico-facial

Figura 5: Lesões eritemato-descamativas liquenificadas escoriadas acometendo região cérvico-facial.

Figura 6 – Dermatite atópica do adulto: acometimento de membros inferiores

Figura 6: Lesões liquenificadas escoriadas e exulceradas acometendo região de membro inferior direito.

Gráfico 1 – Distribuição dos doentes adultos com dermatite atópica conforme a idade de início da doença

Gráfico 2 – Distribuição dos doentes adultos com dermatite atópica conforme a etnia

Gráfico 3 – Distribuição dos doentes adultos com dermatite atópica segundo o escore de gravidade da doença (EASI)

EASI = "Eczema Area and Severity Index"
Escore = 0 - 72

Gráfico 4 – Distribuição dos doentes de acordo com a fase de atividade da dermatite atópica

DA = dermatite atópica

Gráfico 5 – Distribuição dos doentes conforme a associação da dermatite atópica com manifestação respiratória

DA = dermatite atópica
MR = manifestação respiratória

5.2 DOSAGEM DE IgE SÉRICA

No **Gráfico 6a** está demonstrada a dosagem de IgE sérica dos doentes adultos com DA. Os altos níveis de IgE sérica não se associaram com manifestação respiratória, como observado no **Gráfico 6b** ($P = 0,7$). Entretanto, houve uma correlação positiva entre os níveis séricos de IgE e a gravidade da doença ($P = 0,01$, $r = 0,46$), como observado no **Gráfico 7a**. Não foi estabelecida uma correlação positiva entre eosinofilia e dosagem sérica de IgE (**Gráfico 7b**) nos doentes analisados ($P = 0,91$, $r = -0,02$).

Gráfico 6 – Níveis séricos de IgE nos doentes com DA e associação com manifestação respiratória

Gráfico 6a: Níveis séricos de IgE nos adultos com DA (secreção média = 36340). Linha representa média aritmética de secreção.

Gráfico 6b: Níveis séricos de IgE nos adultos apenas com história pessoal de DA ($\blacktriangle$) (secreção média = 22700) e nos adultos com história pessoal de DA associada a manifestação respiratória (MR) ($\bullet$) (secreção média = 36530). Linha representa média aritmética de secreção.

Gráfico 7 – Correlação entre os níveis séricos de IgE, gravidade da doença e percentagem de eosinófilos no sangue

Gráfico 7a: Correlação entre os níveis séricos de IgE e o escore de gravidade da doença EASI (“Eczema Área and Severity Index”) dos adultos com DA.

Gráfico 7b: Correlação negativa entre os níveis séricos de IgE e a percentagem de eosinófilos presentes no sangue dos adultos com DA.

5.3 ANÁLISE DA RESPOSTA PROLIFERATIVA DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO DOS DOENTES E CONTROLES A MITÓGENOS E ANTÍGENOS

5.3.1 Curva dose-resposta para SEA e SEB

No **Gráfico 8 (a e b)** verificamos que as doses ideais para utilização das enterotoxinas estafilocócicas nos ensaios de proliferação obtidas foram 0,04 $\mu\text{g/mL}$ para SEA e 1 $\mu\text{g/mL}$ para SEB. Observa-se que a dose ideal coincide com o ponto de início do platô dos gráficos.

Gráfico 8 – Curva dose-resposta para SEA e SEB

Gráfico 8a: Curva dose-resposta para toxina estafilocócica A (SEA). Linha tracejada significa o início do platô dos gráficos.

Gráfico 8b: Curva dose-resposta para toxina estafilocócica B (SEB). Linha tracejada significa o início do platô dos gráficos.

5.3.2 Análise da resposta proliferativa das células mononucleares do sangue periférico dos doentes e controles após estímulo com mitógenos

A. Estímulo com SEA e SEB

A resposta proliferativa das PBMC dos doentes após estímulo com SEA (**Gráfico 9a**) revela diferença significativa (controles $\bar{x}$ IE = 50,94; adultos com DA $\bar{x}$ IE = 30,40) entre os grupos estudados ($P = 0,03$). Após estímulo com SEB (**Gráfico 9b**), a resposta revelou uma tendência de supressão (controles $\bar{x}$ IE = 53,62; adultos com DA $\bar{x}$ IE = 33,38) entre os grupos estudados ($P = 0,05$).

Gráfico 9 – Respostas proliferativas das PBMC dos doentes adultos com DA comparados com controles após estímulo com SEA e SEB

Gráfico 9a: Resposta proliferativa das PBMC para SEA em adultos com DA: resposta proliferativa diminuída das PBMC - comparação entre índice de estimulação (IE) dos controles (○) ($\bar{x} \Delta cpm = 27110$) e dos adultos com DA (●) ($\bar{x} \Delta cpm = 19650$), após estimulação com SEA (0.04 $\mu g/mL$). Linha representa média aritmética de IE.

Gráfico 9b: Resposta proliferativa das PBMC para SEB em adultos com DA: resposta proliferativa diminuída das PBMC - comparação entre índice de estimulação (IE) dos controles (○) ($\bar{x} \Delta cpm = 28090$) e adultos com DA (●) ($\bar{x} \Delta cpm = 25950$), após estímulo com SEB (1 $\mu g/mL$). Linha representa média aritmética de IE.

B. Estímulo com PHA e PWM

A resposta proliferativa das PBMC dos doentes, após estímulo com PHA (**Gráfico 10a**), demonstrou diferença (controles $\bar{x}$ IE = 94,70; adultos com DA $\bar{x}$ IE = 58,14) entre os grupos estudados ($P = 0,02$). No **Gráfico 10b**, observamos o resultado da resposta proliferativa das PBMC dos doentes avaliados, após estímulo com PWM comparado com os controles (controles $\bar{x}$ IE = 81,26; adultos com DA $\bar{x}$ IE = 36,45). Neste caso, a diferença entre os grupos estudados mostrou uma tendência à supressão da resposta ($P = 0,05$).

Gráfico 10 – Respostas proliferativas das PBMC dos doentes adultos com DA comparados com controles após estímulo com PHA e PWM

Gráfico 10a: Resposta proliferativa das PBMC para PHA em adultos com DA: resposta proliferativa diminuída das PBMC - comparação entre índice de estimulação (IE) dos controles (○) ($\bar{x} \Delta cpm = 49490$) e dos adultos com DA (●) ($\bar{x} \Delta cpm = 38750$), após estímulo com PHA. Linha representa média aritmética de IE.

Gráfico 10b: Resposta proliferativa das PBMC para PWM em adultos com DA: resposta proliferativa diminuída das PBMC - comparação entre índice de estimulação (IE) dos controles (○) ($\bar{x} \Delta cpm = 27240$) e adultos com DA (●) ($\bar{x} \Delta cpm = 19840$), após estímulo com PWM. Linha representa média aritmética de IE.

5.3.3 Análise da resposta proliferativa das células mononucleares do sangue periférico dos doentes e controles após estímulo com antígenos CMA e TT

Conforme o **Gráfico 11a**, observamos que a resposta proliferativa das PBMC, após estímulo com CMA, apresentou diferença significativa quando comparada com os controles estudados (controles $\bar{x}$ IE = 13,97; adultos com DA $\bar{x}$ IE = 6,98) ($P = 0,02$). No **Gráfico 11b**, observamos que também houve diferença significativa na resposta proliferativa das PBMC, após estímulo com TT, quando comparada com os controles (controles $\bar{x}$ IE = 7,07; adultos com DA $\bar{x}$ IE = 2,64) ($P = 0,006$).

Gráfico 11 – Respostas proliferativas das PBMC dos doentes adultos com DA comparados com controles após estímulo com CMA e TT

Gráfico 11a: Resposta proliferativa das PBMC para CMA em adultos com DA: resposta proliferativa diminuída das PBMC - comparação entre índice de estimulação (IE) dos controles (○) ($\bar{x}$ Δ cpm = 8738) e dos adultos com DA (●) ($\bar{x}$ Δ cpm = 3754), após estímulo com CMA. Linha representa média aritmética de IE.

Gráfico 11b: Resposta proliferativa das PBMC para TT em adultos com DA: resposta proliferativa diminuída das PBMC - comparação entre índice de estimulação (IE) dos controles (○) ($\bar{x}$ Δ cpm = 3615) e adultos com DA (●) ($\bar{x}$ Δ cpm = 1041), após estímulo com TT. Linha representa média aritmética de IE.

5.4 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE IL-18 EM SOBRENADANTES DE CULTURAS DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO DOS DOENTES E CONTROLES

5.4.1 Níveis de IL-18 nos sobrenadantes de cultura

No **Gráfico 12a** verificamos que a secreção de IL-18 nos sobrenadantes de culturas está aumentada nos doentes em comparação com os controles, tanto em condições basais (sem estímulo), quanto após estímulo com SEA ($P = 0,04$). Tal situação não foi vista após estímulo com SEB ($P = 0,07$) (**Gráfico 12b**).

Gráfico 12 – Níveis de IL-18 em sobrenadantes de cultura em situação sem estímulo e após estímulo com SEA e SEB

Gráfico 12a: Diferenças entre níveis de IL-18 nos sobrenadantes de cultura dos controles (○) (secreção média = 50,71) e adultos com DA (●) (secreção média de 62,92) em condições basais. Observamos que, após 6 horas, os sobrenadantes de cultura dos adultos com DA apresentaram maiores níveis de IL-18 do que os controles. Linha representa média aritmética dos níveis de IL-18.

Gráfico 12b: Diferenças entre a níveis de IL-18 nos sobrenadantes de cultura após 6 horas de estímulo com SEA dos controles (○) e adultos com DA (●) (secreção média de 49,32 para controles e 61,85 para adultos com DA) e SEB (secreção média de 50,32 para controles e 59,61 para adultos com DA). Os sobrenadantes de cultura estimulados com SEA apresentaram maiores níveis de IL-18 do que quando estimulados com SEB. Linha representa média aritmética dos níveis de IL-18.

5.4.2. Correlação entre níveis de IL-18 nos sobrenadantes de cultura e respostas proliferativas das PBMC após estímulo com SEA e SEB

No **Gráfico 13 (a e b)** não foi observada correlação positiva entre resposta proliferativa das PBMC dos doentes para SEA ou SEB, quando comparadas com os níveis de IL-18 em sobrenadantes de culturas dos mesmos ($P = 0,2$) ($r = 0,276$; $r = 0,209$ respectivamente).

Gráfico 13 – Correlação entre níveis de IL-18 em sobrenadantes de culturas e resposta proliferativa das PBMC após estímulo com SEA e SEB

Gráfico 13a: Correlação negativa entre índice de estimulação (IE) da resposta proliferativa das PBMC dos adultos com DA estimuladas com SEA e níveis de IL-18 nos sobrenadantes de culturas dos mesmos, após 6 horas de estímulo com SEA.

Gráfico 13b: Correlação negativa entre índice de estimulação (IE) da resposta proliferativa das PBMC dos adultos com DA estimuladas com SEB e níveis de IL-18 nos sobrenadantes de culturas dos mesmos, após 6 horas de estímulo com SEB.

5.4.3 Dosagem de IL-18 nos sobrenadantes de culturas das PBMC em condições basais e após estímulo com SEA e SEB conforme a gravidade da doença

Não houve diferença significativa entre níveis de IL-18 (sobrenadantes de culturas) e gravidade da doença ($P \geq 0,05$), como mostra o **Gráfico 14 (a e b)**.

Gráfico 14 – Dosagem de IL-18 em sobrenadantes de culturas e resposta proliferativa das PBMC em condições basais e após estímulo com SEA e SEB conforme gravidade da doença

Gráfico 14a: Dosagem de IL-18 nos sobrenadantes de culturas das PBMC, em condições basais (secreção média de 52,47 para DA leve, 69,04 para DA moderada e 56,06 para DA grave), conforme a gravidade da DA nos atópicos adultos (● = DA leve; ▲ = DA moderada; ■ = DA grave). Linha representa média aritmética dos níveis de IL-18.

Gráfico 14b: Dosagem de IL-18 nos sobrenadantes de culturas das PBMC, após 6 horas de estímulo com SEA (secreção média de 51,36 para DA leve, 66,69 para DA moderada e 62,39 para DA grave) (● = DA leve, ▲ = DA moderada, ■ = DA grave) e SEB (secreção média de 50,65 para DA leve, 61,93 para DA moderada e 70,34 para DA grave) (○ = DA leve, △ = DA moderada, □ = DA grave), conforme a gravidade da DA nos atópicos adultos. Linha representa média aritmética dos níveis de IL-18.

5.5 ANÁLISE DE IL-18 NO SORO

No **Gráfico 15a**, os níveis séricos de IL-18 apresentam-se com intensidades distintas nos grupos de doentes e controles ($P = 0,005$). Com relação à gravidade da doença (**Gráfico 15b**), verificamos que quanto mais grave a DA, maiores são os níveis de IL-18 no sangue ($P = 0,04$).

Gráfico 15 – Dosagem de IL-18 sérica dos adultos com DA e controles

Gráfico 15a: Níveis de IL-18 no soro dos controles (○) (secreção média = 168,4) e adultos com DA (●) (secreção média de 334,6). Linha representa média aritmética dos níveis de IL-18.

Gráfico 15b: Níveis de IL-18 no soro dos adultos com DA (secreção média de 171,0 para DA leve, 354,4 para DA moderada e 527,8 para DA grave) (● = DA leve, ▲ = DA moderada, ■ = DA grave). Linha representa média aritmética dos níveis de IL-18.

5.5.1 Correlação entre a níveis de IL-18 e de IgE no soro dos doentes adultos com DA

No **Gráfico 16**, verificamos uma correlação positiva entre níveis de IgE e de IL-18 no soro dos doentes ($P = 0,02$, $r = 0,49$).

Gráfico 16 – Correlação entre IL-18 e IgE no soro dos doentes

Gráfico 16: Correlação entre de IgE (secreção média = 36340) e IL-18 (secreção média = 334,6) séricas nos adultos com DA.

Os resultados relacionados com a resposta proliferativa das PBMC e com os níveis de IL-18, apresentados nos itens 5.2 a 5.5, estão resumidos no **Anexo F**.

6 Discussão

No presente estudo, verificamos que os adultos constituem cerca de 37,5% do total de atópicos que freqüentaram o ambulatório de DA durante um período de 11 anos, e que houve um discreto predomínio do sexo feminino sobre o masculino. Sandström e Faergemann, em 2004, avaliando a população adulta sueca em um período de dez anos, encontraram 59% de DA persistente, sendo de 2:1 a proporção do sexo feminino para o sexo masculino. Wüthrich (1999), em artigo de revisão, descreve a prevalência da DA persistente, após a puberdade, em torno de 40 a 60%. Muto et al. (2003), em um ano de estudo sobre a prevalência da DA na população adulta japonesa, encontraram 3% de DA persistente sem diferenças entre os sexos.

Em nossa análise, observamos que 13/29 doentes (45%) apresentaram início das manifestações clínicas da doença cutânea até os 4 anos de idade e associação da DA com alergia respiratória, concordando com a teoria da marcha atópica.

Estudos clínicos demonstram que as doenças que constituem a tríade atópica (asma, rinite alérgica e dermatite atópica) ocorrem de forma seqüencial em 50% dos indivíduos predispostos, mas ainda não foram encontradas explicações convincentes para as variações no padrão de

evolução desse grupo de doenças. Esses dados constituem a base teórica do conceito de marcha atópica, definida como a história natural das manifestações alérgicas, cujos sinais clínicos de DA precedem o desenvolvimento de asma e rinite alérgica (Spergel, Paller, 2003).

Uma porcentagem considerável dos doentes analisados (28%) apresentou início dos sintomas de DA após os 18 anos de idade. Ozkaya, em 2005, descreveu 16,8% de doentes com início de DA na fase adulta definindo assim, um novo subgrupo da doença.

A maioria dos doentes do presente estudo eram da raça branca, encontravam-se na fase aguda da doença e apresentavam a forma moderada da DA. Segundo Williams (2000), é difícil afirmar que as diferenças encontradas entre os grupos étnicos, descritas na literatura, são fatores que afetam a cronicidade ou a incidência da doença nos vários grupos, pois os resultados variam conforme a localização geográfica da população analisada. Em seu estudo, Ozkaya (2005), encontrou 49,2% dos doentes na forma leve, 39,7% na forma moderada e 11,1% na forma grave da doença, mostrando que esses dados também modificam conforme a população analisada.

Uma das características que fazem parte dos critérios diagnósticos da DA é a avaliação dos níveis séricos de IgE. Todos os 29 doentes analisados apresentaram esses níveis com valores acima do considerado dentro da normalidade (100 UI/mL), mostrando-se mais elevados nos doentes que possuíam DA associada com manifestação respiratória e naqueles com

maior índice de gravidade da doença. Hanifin (1982) relata que os níveis séricos de IgE permanecem elevados mesmo na remissão da DA, e só se normalizam após longos períodos sem a doença. Wüthrich (1999), entretanto, em revisão sobre a patogenia da DA, descreve que 20 a 40% de doentes com DA pura, sem história pessoal ou familiar de atopia, não apresentam níveis de IgE sérica elevados.

Na DA existe um padrão alterado da resposta imune frente a diferentes estímulos, e o papel do *S. aureus* na sua patogênese é imprescindível. Os superantígenos estafilocócicos são proteínas microbianas capazes de ocasionar ativação policlonal de células T (Jappe, 2000). Uma das formas de se avaliar a resposta imune celular é a realização de ensaios para verificar a resposta proliferativa das PBMC a estímulos, tais como: SEA e/ou SEB. O grupo de doentes atópicos adultos avaliados neste estudo expressaram uma supressão na resposta proliferativa das PBMC às enterotoxinas estafilocócicas (SEA e SEB), sugerindo que na DA ocorra uma deficiência da resposta imune celular.

Yoshino et al. (2000) descreveram um aumento na resposta proliferativa e da apoptose das células T para SEB em doentes com DA, enquanto que Yudate et al. (1996) mostraram que as PBMC eram mais responsivas tanto para SEA quanto para SEB, com uma resposta mais elevada para SEA. Kedzierska et al. (2005) verificaram que houve um aumento de apoptose de células T e produção de citocinas pelas PBMC

estimuladas com SEB, fatos estes relacionados à colonização da pele pelo *S. aureus*, mas não com a gravidade da doença.

Acreditamos que as diferenças supracitadas ocorram como consequência das variações laboratoriais das doses utilizadas nos estudos realizados, especialmente o uso de concentrações variadas de SEA e SEB, e a aplicação de diferentes escores de gravidade da enfermidade.

Os dados obtidos no presente estudo mostraram ainda que a resposta proliferativa suprimida das PBMC não se limitou ao estímulo pelas enterotoxinas estafilocócicas. Quando as células dos doentes estudados foram estimuladas por um mitógeno distinto, como PHA, ou por antígenos específicos como CMA e TT, apresentaram uma significativa diminuição da proliferação, sugerindo um estado de imunossupressão na DA. Uma resposta proliferativa diminuída para um mitógeno de célula T como PHA reflete um possível desequilíbrio na ativação das células T. Do mesmo modo, a resposta diminuída a CMA e TT indica uma deficiência da resposta proliferativa antígeno-específica. Ainda, a resposta proliferativa reduzida para TT pode sugerir que as respostas antígeno-específicas de células T de memória estão comprometidas nos adultos com DA.

Outros investigadores, apesar de utilizarem um reduzido número de estímulos antigênicos, reforçam tais achados. Tanaka et al. (1996) concluíram que, em ensaios *in vitro*, os doentes com DA mostraram uma diminuição na resposta proliferativa das PBMC para CMA, em comparação com SEA e SEB. Novak et al., em 2003, sugerem que a perpetuação da

resposta imune inflamatória cutânea na DA, apesar da reduzida resposta proliferativa frente à estimulação superantigênica, pode ser uma consequência da combinação da elevada colonização da pele por agentes microbianos com a defesa inadequada do hospedeiro.

O achado da supressão da resposta proliferativa das PBMC para SEA e/ou SEB encontrada nos adultos estudados é coincidente com a intensidade da colonização por *S. aureus* nas lesões cutâneas e com o aumento dos escores de gravidade da doença (Zollner et al., 2000). A diminuição da resposta proliferativa para SEA e SEB encontrada na nossa análise pode ser conseqüente à imunossupressão dos LT nos adultos com DA, fato corroborado pela inibição da resposta proliferativa para mitógenos de células T, como a PHA. Ainda é possível que as PBMC dos doentes com DA sejam mais suscetíveis à apoptose celular após o estímulo com as enterotoxinas estafilocócicas, contribuindo assim, com a supressão da resposta proliferativa mediada pelas células T.

Na **Tabela 2** estão compiladas as comparações dos principais dados encontrados na literatura com o presente estudo, em relação à resposta proliferativa das PBMC quando estimuladas com mitógenos ou antígenos.

Tabela 2 - Dermatite atópica: resposta proliferativa das PBMC a mitógenos e antígenos

Autor	Faixa etária (anos)	Estímulos	Resposta proliferativa	Considerações
Konig et al. 1995	-	SEA e SEB (0.01, 0.1 e 1µg/mL)	↑ resp. prolif. PBMC dos controles dose dependente (SEB)	-
Tanaka et al. 1996	9 – 40	SEA (0.25µg/mL), SEB (4µg/mL) e CMA (100µg/mL)	↓ resp. prolif. a CMA na DA resp. prolif. a SEA e SEB: DA=controle	↑ IgE e ↓ resp. prolif. sem significância estatística
Yudate et al. 1996	11 – 44	SEA (50pg/mL) e SEB (50ng/mL)	↑ resp. prolif. a SEA e SEB dos doentes com DA	Correlação entre SEA e SEB em ambos os grupos
Campbell e Kemp 1997	8 – 13	SEB (1µg/mL) e PHA (10µg/mL)	PHA: sem diferenças na DA SEB: ↑ resp. prolif. na DA	Provável interferência das diferentes concentrações de SEB usadas em cada estudo
Yoshino et al. 2000	15 – 45	SEB (0.1µg/mL)	> gravidade da DA, < resp. prolif. para SEB	-
Orfali et al. 2005	18 – 56	SEA (0.04µg/mL), SEB (1µg/mL), PHA, TT, PWM, CMA	↓ Resp. prolif. com SEA, CMA, TT, PHA na DA	Sugere imunossupressão na DA

Uma outra maneira de analisar a imunidade celular na DA é através do perfil de produção de citocinas séricas e em sobrenadantes de cultura de PBMC. Nos indivíduos normais, o padrão de produção de citocinas das PBMC frente a mitógenos apresenta o perfil Th1. Na DA, há um perfil de produção de citocinas Th2, quando se realizam ensaios de proliferação com

as PBMC, utilizando-se os mesmos estímulos (König et al., 1995; Campbell, Kemp, 1997).

Dentre as várias citocinas envolvidas no eixo Th1/Th2, podemos citar a importância da IL-18, uma citocina pró-inflamatória da família da IL-1. Estudos mostram que a IL-18 pode estar associada com a gravidade da DA, apesar desse mecanismo ainda permanecer não totalmente elucidado (Ohnishi et al., 2003). A IL-18 pode ainda induzir citocinas Th2 e produção de IgE, fazendo assim uma regulação cruzada no eixo Th1/Th2 (Yoshizawa et al., 2002).

Neste estudo, avaliamos os níveis séricos de IL-18 nos doentes e controles não atópicos. Verificamos que os adultos com DA apresentaram maiores níveis de IL-18 e correlação dos mesmos com gravidade da doença e IgE sérica. Concordando com esses dados, Yoshizawa et al., em 2002, mostraram que os níveis circulantes de IL-18 são significativamente mais altos em doentes com DA do que nos controles saudáveis, e que estes níveis podem estar correlacionados com a gravidade da doença e IgE sérica. Correlação positiva entre níveis de IL-18 e gravidade da DA foram observados por Shida et al. (2001) em seu estudo avaliando doentes com idade acima de 16 anos, e por Hon et al. (2004) estudando crianças.

Quando dosamos os níveis de IL-18 em sobrenadantes de cultura após estímulo com SEA e SEB e em condições sem estímulo, verificamos que em ambas as situações, os adultos com DA apresentaram maiores níveis de IL-18 do que os controles.

Sonh et al., em, 2004, verificaram altos níveis de IL-18 tanto no soro quanto em sobrenadantes de culturas de PBMC de crianças com DA. Observaram ainda correlação entre IL-18 e gravidade da doença. Todavia, El-Mezzein et al. (2001) encontraram níveis de IL-18 em PBMC não estimuladas muito baixos ou incomensuráveis.

Em 2001, Higashi et al. estudando adultos com DA, verificaram que, após estímulo das PBMC com lipopolissacáride (LPS), houve uma diminuição na produção de IL-18 nos sobrenadantes de cultura, acompanhada de uma grande redução de expressão de mRNA para IL-18.

Na fase aguda da DA há um predomínio de citocinas tipo Th2 e, na fase crônica, de citocinas tipo Th1 (Leung e Soter, 2001). O *S. aureus* é capaz de estimular a produção de citocinas tipo Th1 na DA, contribuindo com uma mudança não só no padrão imunológico de resposta, mas também no quadro clínico da enfermidade. Nas lesões cutâneas encontradas na DA há um predomínio de citocinas do tipo Th1 (Leung et al, 1995b). Acreditamos que os elevados níveis de IL-18 sérica, produzidos pela intensa colonização do *S. aureus* nas lesões, seja um dos mecanismos que contribua para a cronicidade das lesões, considerando que é uma citocina indutora de resposta Th1.

De acordo com a presente análise, existe um franco envolvimento de IL-18 e de SEA na patogênese da DA. Entretanto, estes dois fatores maiores devem interferir nesta doença por diferentes mecanismos, uma vez que houve correlação negativa entre secreção de IL-18 no soro e resposta

proliferativa das PBMC nos adultos com DA. Não verificamos ainda, diferenças significativas entre secreção de IL-18 em sobrenadantes de culturas das PBMC em condições basais e após estímulo com SEA e/ou SEB.

A comparação entre os resultados obtidos na dosagem de IL-18 na DA deste estudo com os dados da literatura encontra-se resumida na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Dosagem da IL-18 na DA

Autor	Resultados
Shikano et al. 2001	Resultados sugerem anomalia nos modelos de sinalização de IL-12 e/ou IL-18 como defeito genético nos doentes com DA
Higashi et al. 2001	↓ na produção de IL-18 pelas PBMC dos doentes com DA, sugere participação na patogênese da DA
El-Mezzein et al. 2001	Secreção de IL-18 em sobrenadante de cultura estimulada com LPS ou PHA pelos doentes com DA foi mais alta do que os controles não alérgicos
Ohnishi et al. 2003	Correlação positiva entre IL-18 no plasma e IgE sérica. Níveis de IL-18 na DA moderada a grave mais altos do que o grupo controle
El- Mezayen et al. 2004	O modelo IL-18 / IL-12 / IL-2 tem importante envolvimento na modulação da resposta Th1/Th2 em doenças alérgicas
Culshaw et al. 2005	Modelo animal: ↑ níveis de IL-18 antes do início de infecção por bactérias gram-positivas aumenta risco de septicemia e mortalidade
- IL-18 no soro de adultos com DA	
Orfali et al. 2005	- correlação entre IL-18 no soro e gravidade da DA
	- correlação entre níveis séricos de IL-18 e IgE
	- ↑ IL-18 nos sobrenadantes de cultura de PBMC basal ou estimulados por SEA

Outros estudos devem ser elaborados para melhor elucidar o papel da IL-18 na DA do adulto. A correlação dos níveis séricos de IL-18 com a gravidade da doença e com níveis séricos de IgE reforçam que esta citocina possa atuar como um marcador de atividade da dermatite atópica do adulto. Conseqüentemente, a dosagem sérica de IL-18, através da técnica de ELISA, poderia ser utilizada na rotina clínica para seguimento e controle de tratamento desta enfermidade.

7 Conclusões

O presente estudo nos permitiu alcançar as seguintes conclusões:

1. Nos 29 doentes adultos com dermatite atópica estudados, observamos que não houve diferença com relação ao sexo, mas a raça branca foi a predominante (72%). Treze doentes (45%) apresentaram os primeiros sintomas de DA antes dos 5 anos de idade, e 8 (28%) iniciaram a doença cutânea após os 18 anos. Vinte e três doentes (79%) apresentavam quadro cutâneo associado à manifestação respiratória (asma e/ou rinite alérgica).
2. Houve correlação positiva entre níveis séricos de IgE e escore de gravidade da doença (EASI = “Eczema Area and Severity Index”).
3. Os resultados obtidos na avaliação da resposta proliferativa das PBMC, à estimulação com as toxinas A e B estafilocócicas, mostraram uma redução significativa da proliferação das células mononucleares periféricas no doente atópico adulto, especialmente com a toxina A estafilocócica.
4. A resposta proliferativa diminuída encontrada nos doentes atópicos adultos, para diferentes estímulos (SEA, CMA, TT e PHA), sugeriram um estado de imunossupressão na enfermidade.

5. A resposta proliferativa diminuída à fitohemaglutinina, refletiu um possível desequilíbrio na ativação das células T. As respostas proliferativas diminuídas para *Candida albicans* e toxóide tetânico indicaram uma redução da resposta antígeno-específica na dermatite atópica do adulto. Verificou-se o comprometimento da função dos linfócitos T de memória antígeno-específicos através da resposta diminuída ao toxóide tetânico.

6. A correlação positiva dos níveis séricos de IL-18, IgE e escore de gravidade da doença sugerem que esta citocina seria um marcador de atividade da dermatite atópica do adulto.

8 Anexos

Anexo A - Critérios diagnósticos da Dermatite Atópica**Critérios diagnósticos da dermatite atópica
Hanifin & Rajka****Deve ter 3 ou mais características básicas:**

- () Prurido
- () Morfologias e distribuição típicas:
 - () Liquenificação flexural ou linearidade em adultos
 - () Envolvimento facial e de superfícies extensoras em crianças
- () Cronicidade ou dermatite crônica recorrente
- () História pessoal ou familiar de atopia (asma, rinite alérgica, dermatite atópica)

Além disso, deve ter 3 ou mais das características abaixo:

- () Xerose
- () Ictiose
- () Hiperlinearidade palmar
- () Queratose pilar
- () Reatividade imediata a testes cutâneos (tipo I)
- () IgE sérica elevada
- () Início em idade precoce
- () Tendência a infecções cutâneas (especialmente *Staphylococcus aureus* e herpes simples)
- () Imunidade mediada por células diminuída
- () Tendência a dermatite de mão ou de pé não específica
- () Eczema no mamilo
- () Queilite
- () Conjuntivite recorrente
- () Prega infraorbital de Dennie-Morgan
- () Ceratocone
- () Catarata subcapsular anterior e/ou posterior

- () Escurecimento orbital
- () Palidez facial/eritema facial
- () Pitíriase alba
- () Dobra anterior do pescoço
- () Prurido provocado pelo suor
- () Intolerância a fio de lã e solventes lipídicos
- () Acentuação perifolicular
- () Intolerância alimentar
- () Curso influenciado por fatores ambientais/emocionais
- () Dermografismo branco/branqueamento tardio

Anexo B - EASI – “Eczema Area and Severity Index”**EASI**

	Área envolvida	Sinais			
		Eritema	Pápulas	Escoriações	Liquenificação
Cabeça e pescoço					
MMSS					
Tronco					
MMII					

Adultos:

- Cabeça e pescoço (C): 10% (0,1)
- MMSS (MS): 20% (0,2)
 - Inclui axila externa e mãos
- Tronco (T): 30% (0,3)
 - Inclui axila interna e virilha
- MMII (MI): 40% (0,4)
 - Inclui nádegas e pés

Porcentagem de área envolvida par cada uma das 4 regiões:

- 0 = nenhuma erupção
- 1 = < 10%
- 2 = < 10% – 29%
- 3 = < 30% - 49%
- 4 = < 50%
- 5 = < 70% - 89%
- 6 = > 90% - 100%

Sinais:

Eritema (E), Pápulas, edema (P), Escoriações (Ex), Liquenificação (L).

- 0 = nenhum
- 1 = leve
- 2 = moderado
- 3 = grave

Total:

Soma dos escores de gravidade x escore da área x constante de cada região

Anexo C - Termo de consentimento livre e esclarecido

Anexo I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE
 CEP: TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO.:/...../.....
 ENDEREÇO: Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE:
 CEP: TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Dermatite atópica do adulto: resposta proliferativa e produção de citocinas de células mononucleares frente às enterotoxinas A e B do *Staphylococcus aureus*.....

 PESQUISADOR: .Raquel Leão Souza
 CARGO/FUNÇÃO: .médica..... INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº ..86689.....
 UNIDADE DO HCFMUSP: ...Departamento de Dermatologia.....
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
- SEM RISCO ☐ RISCO MÍNIMO (x) RISCO MÉDIO ☐
 RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐
- (probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : ..2 anos.

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa. Objetivos da pesquisa.
2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais.
3. desconfortos e riscos esperados.
4. benefícios que poderão ser obtidos.
5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo

Objetivos da pesquisa: O estudo tem como objetivo estudar e entender melhor a dermatite atópica que acomete os adultos. A dermatite atópica ou eczema é uma doença crônica que geralmente começa na infância, que causa coceiras e feridas na pele. Geralmente está associada com asma e rinite alérgica. Tem fases de melhora e piora. Pode piorar no inverno, onde há um maior ressecamento da pele, o que é agravado pelos banhos quentes. A maioria dos pacientes melhora com a idade, mas uma minoria continua a ter a dermatite durante a vida adulta. Sendo assim, vamos estudar os adultos, para tentar melhor esclarecer o porque do eczema continuar nesta fase da vida.

Procedimentos a serem realizados: O paciente selecionado para participar do estudo deverá concordar com a sua participação. Durante a consulta de rotina do ambulatório, após ter consentido em fazer parte do estudo, serão feitas algumas perguntas, como: se tem outros casos de eczema, rinite ou asma na família, quando começaram as primeiras feridas na pele, qual a frequência das feridas, quais os medicamentos que já foram utilizados. Será ainda feito um exame geral para verificar quais as partes do corpo estão mais comprometidas. Serão ainda pedidos aos pacientes do estudo, alguns exames de sangue, urina e fezes para ver como está a resistência do corpo e se tem algum exame alterado por causa do eczema.

Os exames serão feitos no próprio hospital das clínicas sem nenhum custo para o paciente, que pode aproveitar o dia das consultas para colher os exames. Os pacientes continuarão a ser acompanhados como sempre no ambulatório de dermatite atópica. Se houver a necessidade de mais algum exame, o paciente que concordar com o estudo poderá ser ainda convocado via telefone ou carta para vir a uma consulta, mesmo antes do seu retorno e terá todos os esclarecimentos e assistência que precisar. Todos os pacientes terão acesso aos resultados de seus exames no momento em que quiserem e com as explicações necessárias para seu entendimento.

O paciente pode em qualquer momento não concordar em fazer os exames que serão pedidos.

Possíveis desconfortos e riscos esperados: Será coletada amostra de sangue de uma veia. Durante a coleta de sangue pode haver uma dor mínima, parecida com uma picada de formiga, e pode ficar uma mancha roxa no local que desaparece em poucos dias. Algumas pessoas podem às vezes sentir tonturas ou até desmaio após a coleta de sangue, e mais raramente pode haver infecção no local que entrou a agulha na pele. No caso da urina e das fezes, o paciente deverá trazê-las de casa e laboratório do hospital fornece os potinhos para o seu transporte.

Benefícios que poderão ser obtidos: O paciente que participar do estudo poderá beneficiar-se ou não do estudo. Pode ser que sejam obtidas respostas para algumas dúvidas que existem sobre o eczema dos adultos ou simplesmente descobrirmos algum dado novo que possa contribuir com futuras pesquisas sobre este assunto.

Procedimentos alternativos: O paciente não é obrigado a realizar estes exames específicos se não quiser, o que não implica que sofrerá alguma penalidade. Mesmo o paciente que não concordar em participar do estudo, terá todos os benefícios de atendimento e de informações sobre novas descobertas com relação à doença, do que qualquer outro paciente que participar do estudo.

Confidencialidade e liberação dos registros médicos: Apenas os médicos envolvidos no estudo terão, além do próprio paciente, acesso aos resultados dos exames, bem como à identificação dos mesmos. Em nenhum momento do estudo o paciente será identificado pelo nome e também em nenhuma publicação resultante do estudo em questão.

Participação: A sua participação neste estudo é totalmente voluntária. Você está ciente que não é obrigado (a) a participar deste estudo e se em algum momento não quiser mais participar ou fazer os exames, deverá entrar em contato com a equipe do estudo, sem nenhuma penalidade por isto.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Dra. Valéria Aoki e Dra. Raquel Leão Souza

End.: Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, 5º. Andar, PAMB-Dermatologia Tel.: (11) 3069-6398

CEP: 05403-000

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 19 .

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

Anexo D - Aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa

Anexo E - Avaliação dos doentes estudados. Distribuição dos doentes adultos com DA conforme sexo, idade, cor, associação ou não com doença respiratória, período de início da enfermidade, escore de gravidade e fase da doença

Doentes	Sexo	Idade	Etnia	AP de DA	AP de DA/Resp	Início DA	EASI	Fase aguda
1	masc	27	B	-	+	Entre 5 e 11 anos	35,4	não
2	masc	28	A	-	+	Antes dos 5 anos	47,1	sim
3	fem	32	B	-	+	Antes dos 5 anos	33,2	sim
4	fem	35	P	+	-	Antes dos 5 anos	47,5	sim
5	fem	21	B	-	+	Entre 5 e 11 anos	38,7	sim
6	masc	22	B	-	+	Após os 18 anos	34,1	sim
7	masc	21	B	-	+	Antes dos 5 anos	33	sim
8	masc	20	B	+	-	Antes dos 5 anos	40,2	sim
9	fem	22	B	-	+	Entre 12 e 18 anos	12,8	não
10	masc	38	A	-	+	Após os 18 anos	58,8	sim
11	masc	26	P	-	+	Antes dos 5 anos	46,1	sim
12	fem	26	B	-	+	Antes dos 5 anos	34,6	não
13	fem	23	B	-	+	Após os 18 anos	39,8	não
14	fem	23	B	-	+	Entre 5 e 11 anos	6,4	não
15	masc	22	P	-	+	Entre 5 e 11 anos	21	não
16	fem	27	B	+	-	Antes dos 5 anos	43,5	sim
17	fem	34	B	-	+	Antes dos 5 anos	61,2	sim
18	masc	18	B	-	+	Entre 5 e 11 anos	27,2	sim
19	fem	27	B	-	+	Antes dos 5 anos	5,3	não
20	fem	33	B	-	+	Antes dos 5 anos	52	sim
21	masc	24	B	-	+	Antes dos 5 anos	36,7	sim
22	fem	20	B	-	+	Entre 5 e 11 anos	14,2	sim
23	fem	21	P	-	+	Após os 18 anos	29,2	sim
24	fem	25	N	-	+	Após os 18 anos	17,4	não
25	masc	46	B	+	-	Após os 18 anos	34,6	sim
26	masc	36	B	+	-	Após os 18 anos	15,4	não
27	masc	30	B	-	+	Entre 5 e 11 anos	47,2	sim
28	masc	20	B	-	+	Antes dos 5 anos	55	sim
29	fem	25	N	+	-	Após os 18 anos	10,6	sim

Masc = masculino; fem = feminino; B = branco; A = amarelo; P = pardo; N = negro; AP de DA = antecedentes pessoais somente de dermatite atópica; AP de DA/Resp = antecedentes pessoais de dermatite atópica associada a manifestação respiratória; + = presente; - = ausente; Início DA = idade de início da dermatite atópica; EASI = *eczema area and severity index*.

Anexo F - Distribuição dos doentes adultos com DA conforme gravidade da doença, dosagem de IgE sérica, resposta proliferativa para SEA e SEB, dosagem de IL-18 em sobrenadantes de cultura sem estímulo e após estímulo com SEA e SEB e dosagem de IL-18 no soro

Pacientes	EASI	IgE (UI/mL)	SEA IE	SEB IE	IL-18 Basal	IL-18 SEA	IL-18 SEB	IL-18 soro
1	35,4	396000	11,3	28,2	32,62	39,89	55,25	371,28
2	47,1	23300	9,26	17,09	48,79	47,57	36,66	356,72
3	33,2	3490	7,4	26,6	48,79	64,14	67,78	nr
4	47,5	19100	9,07	15,9	102,94	77,89	68,99	nr
5	38,7	45900	4,93	12,06	101,33	77,08	67,38	398,59
6	34,1	20800	8,63	12,77	141,34	130,43	109,81	nr
7	33	34300	68,38	210,37	62,53	42,72	61,31	367,64
8	40,2	24500	69,51	199,22	67,78	98,09	83,14	404,05
9	12,8	4850	42,84	76,84	56,46	52,42	62,53	152,83
10	58,8	32500	15,7	26,52	69,80	64,14	86,37	502,35
11	46,1	7400	14,15	11,88	57,27	59,70	57,27	149,19
12	34,6	3350	31,13	25,02	77,89	62,12	62,93	238,39
13	39,8	6950	43,37	30,65	46,76	63,74	46,76	138,26
14	6,4	1410	32,99	30,54	54,85	44,74	27,37	207,44
15	21	2380	21,13	20,37	31,81	52,02	43,53	147,37
16	43,5	9520	9,77	16,09	55,25	37,47	52,42	336,69
17	61,2	37600	41,27	46,23	47,57	48,79	47,57	846,42
18	27,2	6170	57,52	88,82	40,70	50,00	64,95	855,52
19	5,3	5570	29,75	33,05	75,46	71,42	75,46	74,55
20	52	14200	17,64	21,13	nr	nr	nr	234,75
21	36,7	27000	26,82	27,68	108,20	92,03	64,55	251,13
22	14,2	6120	50,8	41,2	52,02	54,04	44,74	nr
23	29,2	38700	20,49	22,92	54,44	71,42	31,41	nr
24	17,4	12000	53,35	45,14	67,38	53,23	33,43	nr
25	34,6	492	31,24	35,67	60,91	48,79	48,79	385,84
26	15,4	43500	43,29	62,83	28,17	47,98	39,49	272,98
27	47,2	71100	37,66	41,05	66,16	70,61	73,44	nr
28	55	39100	36,12	46,68	53,64	35,04	78,69	nr
29	10,6	152	36,07	38,34	50,81	74,25	77,08	nr

EASI = eczema area and severity index; SEA IE = índice de estimulação de reposta proliferativa após estímulo com toxina A estafilocócica; SEB IE = índice de estimulação de reposta proliferativa após estímulo com toxina B estafilocócica; IL-18 basal = dosagem de interleucina-18 em sobrenadante de cultura em condições basais; IL-18 SEA = dosagem de interleucina-18 em sobrenadante de cultura após estímulo com toxina A estafilocócica; IL-18 SEB = dosagem de interleucina-18 em sobrenadante de cultura após estímulo com toxina B estafilocócica; IL-18 soro = dosagem de interleucina-18 nos soros dos doentes adultos com DA; nr = não realizado.

9 Referências

Aly R, Maibach HI, Shinefield HR. Microbial Flora of Atopic Dermatitis. *Arch Dermatol* 1977; 113: 780-782.

Banfield CC, Callard RE, Harper JI. The role of cutaneous dendritic cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Brit J Dermatol* 2001; 144: 940-946.

Breuer K, Kapp A, Werfel T. Bacterial infections and atopic dermatitis. *Allergy* 2001; 56: 1034-1041.

Cacere CR, Romano CC, Giannini MJSM, Duarte AJS, Benard G. The Role of Apoptosis in the Antigen-Specific T Cell Hyporesponsiveness of Paracoccidioidomycosis Patients. *Clin Immunol* 2002; 105 (2): 215-22.

Campbell DE, Kemp AS. Proliferation of interferon-gamma (IFN- γ) and IL-4 production in response to *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal superantigen in childhood atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol* 1997; 107: 392-397.

Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. Severity Scoring of Atopic Dermatitis: The SCORAD Index. *Dermatology* 1993; 186: 23-31.

Cookson WOCM. The genetics of atopic dermatitis: Strategies, candidate genes, and genome screens. *J Am Acad Dermatol* 2001; 45 (1): S7-9.

Culshaw S, Leung BP, Gracie JA, Campbell CC, Thomson D, Gemmel C, et al. *Eur J Immunol* 2005; 35: 1438-44.

Dahl MV. *Staphylococcus aureus* and Atopic Dermatitis. *Arch Dermatol* 1983; 119: 840-846.

Ellis C, Lugger T, Abeck D, Allen R, Graham-Brown RAC, Prost Y, et al. International Consensus Conference on Atopic Dermatitis II (ICCAD II): clinical update and current treatment strategies. *B J Dermatol* 2003; 148 (Suppl. 63): 3-10.

El-Mezayen REH, Matsumoto T. In vitro responsiveness to IL-18 in combination with IL-12 or IL-2 by PBMC from patients with bronchial asthma and atopic dermatitis. *Clin Immunol* 2004; 111: 61-8.

El-Mezzein REH, Matsumoto T, Nomiya H, Miike T. Increased secretion of IL-18 *in vitro* by peripheral blood mononuclear cells of patients with bronchial asthma and atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol* 2001; 126: 193-198.

Hanifin JM, Rajka G. Diagnostic Features of Atopic Dermatitis. *Acta Dermatovener (Stockh)* 1980; Suppl. 92: 44-47.

Hanifin JM, Thurston M, Omoto M, Cherill R, Tofte SJ, Graeber M, et al. The eczema area and severity index (EASI): assessment of reliability in atopic dermatitis. *Exp Dermatol* 2001; 10:11-18.

Hanifin, J, Saurat JH. Understanding atopic dermatitis: Pathophysiology and etiology. *J Am Acad Dermatol* 2001; 45 (1): S1-68.

Hanifin, JM. Atopic Dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 1982; 6 (1): 1-13.

Hashizume H, Horibe T, Ohshima A, Ito T, Yagi H, Takigawa M. Anxiety Accelerates T-Helper 2-Tilted Immune Responses in Patients with Atopic Dermatitis. *B J Dermatol* 2005; 152 (6): 1161-1164.

Higa S, Kotani M, Matsumoto M, Fujita A, Hirano T, Suemura M, Kawase I, Tanaka T. Administration of anti-interleukin 18 antibody fails to inhibit development of dermatitis in atopic dermatitis-model mice NC/Nga. *Br J Dermatol* 2003; 149: 39-45.

Higashi N, Gesser B, Kawana S, Thestrup-Pedersen K. Expression of IL-18 mRNA and secretion of IL-18 are reduced in monocytes from patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108 (4): 607-14.

Holla LI. Interleukin-18 in asthma and other allergies. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 1023-1025.

Hon KLE, Leung TF, Ma KC, Wong CK, Wan H, Lam CWK. Serum Concentration of IL-18 Correlates with Disease Extent in Young Children with Atopic Dermatitis. *Ped Dermatol* 2004; 21 (6): 619-21.

Jappe U. Superantigens and their Association with Dermatological Inflammatory Diseases: Facts and Hypothesis. *Acta Derm Venereol* 2000; 80: 321-328.

Kang K, Poster AM, Nedorost ST, Stevens SR, Cooper KD. Atopic Dermatitis, Papulosquamous and eczematous disorders. In: *Dermatology*. First edition. London. Editors: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP. Mosby, Elsevier Ltd; 2003. p. 199-214.

Kedzierska A, Kaszuba-Zwoinska J, Stodowska-Hajduk Z, Kapinska-Mrowiecka M, Czubak M, Thor P, Pryjma J. SEB-induced T cell apoptosis in atopic patients – correlation to clinical status and skin colonization by *Staphylococcus aureus*. *Arch Immunol Ther Exp* 2005; 53: 63-70.

König B, Neuber K, König W. Responsiveness of Peripheral Blood Mononuclear Cells from Normal and Atopic Donors to Microbial Superantigens. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 106:124-133.

Konishi H, Tsutsui H, Murakami T, Futatsugi SY, Yamanaka K, Tanaka M, et al. IL-18 contributes to the spontaneous development of atopic dermatitis-like inflammatory skin lesion independently of IgE/stat6 under specific pathogen-free conditions. *PNAS* 2002; 99 (17): 11340-45.

Larsen FS, Diepgen T, Svensson A. The occurrence of atopic dermatitis in North Europe: An international questionnaire study. *J Am Acad Dermatol* 1996; 34 (5): 760-764.

Larsen FS, Hanifin JM. Secular Change in the Occurrence of Atopic Dermatitis. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 1992; Suppl. 176: 7-12.

Larsen FS. Atopic dermatitis: a genetic-epidemiological study in a population-based twin sample. *J Am Acad Dermatol* 1993; 28: 719-23.

Leung DYM, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid Q. New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest* 2004; 113 (5): 651-657.

Leung DYM, Gately M, Trumble A, Ferguson-Darnell B, Schlievert PM, Picker LJ. Bacterial superantigens induce T cell expression of the skin-selective homing receptor, the cutaneous lymphocyte-associated antigen, via stimulation of interleukin 12 production. *J Exp Med* 1995a; 181: 747-753.

Leung DYM, Soter NA. Cellular and immunologic mechanisms in atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 2001; 44 (1): S1-S12.

Leung DYM, Travers JB, Norris DA. The Role of Superantigens in Skin Disease. *J Invest Dermatol* 1995b; 105(1): 37S-41S.

Leung DYM. Pathogenesis of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: S99-108.

Leyden JJ, Marples R, Klingman AM. *Staphylococcus aureus* in the lesion of atopic dermatitis. *B J Dermatol* 1974; 90: 525-530.

Lin YT, Yang YH, Hwang YW, Tsai MJ, Tsao PN, Chiang BL, Shau WY, Wang LF. Comparison of serum specific IgE antibodies to staphylococcal enterotoxins between atopic children with and without atopic dermatitis. *Allergy* 2000; 55: 641-646.

Matsui K, Nishikawa A, Suto H, Tsuboi R, Ogawa H. Comparative Study of *Staphylococcus aureus* Isolated from Lesional and Non-Lesional Skin of Atopic Dermatitis Patients. *Microbiol Immunol* 2000; 44 (11): 945-947.

Muto T, Hsieh SD, Sakurai Y, Yoshinaga H, Suto H, Okumura K et al. Prevalence of atopic dermatitis in Japanese adults. *B J Dermatol* 2003; 148: 117-121.

Nakano H, Tsutsui H, Terada M, Yasuda K, Matsui K, Yumikura-Futatsugi S et al. Persistent secretion of IL-18 in the skin contributes to IgE response in mice. *Int Immunol* 2003; 15 (5): 611-21.

Novak N, Bieber T, Leung DY. Immune mechanisms leading to atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: S128-39.

Novak N, Kruse S, Potreck J, Maintz L, Jenneck C, Weidinger S, et al. Single nucleotide polymorphisms of the IL-18 gene are associated with atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115 (4): 828-33.

Ohnishi H, Kato Z, Watanabe M, Fukutomi O, Inoue R, Teramoto T et al. Interleukin-18 is associated with the severity of atopic dermatitis. *Allergol Int* 2003; 52: 123-130.

Oppel T, Schuller E, Günther S, Moderer M, Haberstrok J, Bieber T, et al. Phenotyping of epidermal dendritic cells allows the differentiation between extrinsic and intrinsic forms of atopic dermatitis. *B J Dermatol* 2000; 143: 1193-98.

Ozkaya E. Adult-onset atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 2005; 52 (4): 579-582.

Park HJ, Kim JE, Lee JY, Cho BK, Lee WJ, Kim T, et al. Increased expression of IL-18 in cutaneous graft-versus-host disease. *Immunology Letters* 2004; 95: 57-61.

Proft T, Fraser JD. Bacterial Superantigens. *Clin Exp Immunol* 2003; 133: 299-306.

Rajka G, Langeland T. Grading of the Severity of Atopic Dermatitis. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 1989; Suppl. 144: 13-14.

Ring J, Przybilla B, Ruzicka T, Editors. *Handbook of Atopic Eczema*. 2nd edition. Germany: Springer; 2005.

Sandström MH, Faergemann J. Prognosis and prognostic factors in adult patients with atopic dermatitis: a long term follow-up questionnaire study. *B J Dermatol* 2004; 150: 103-110.

Shida K, Koizumi H, Shiratori I, Matsumoto M, Kikkawa S, Tsuji S, Begum NA, Fukumori Y, Toyoshima K, Seya T. High serum levels of additional IL-18 forms may be reciprocally correlated with IgE levels in patients with atopic dermatitis. *Immunology Letters* 2001; 79: 169-175.

Shikano H, Kato Z, Kaneko H, Watanabe M, Inoue R, Kasahara K et al. IFN- γ production in response to IL-18 or IL-12 stimulation by peripheral blood mononuclear cells of atopic patients. *Clin Exp Allergy* 2001; 31: 1263-1270.

Shiohara T, Hayakawa J, Mizukawa Y. Animal models for atopic dermatitis: are they relevant to human disease? *J Dermatol Sci* 2004; 36: 1-9.

Sohn MH, Lee KE, Kim KE. Interleukin-18 is Associated with Increased Severity of Atopic Dermatitis in Children. *Allergy and Asthma Proc* 2004; 25 (3): 181-4.

Spergel JM and Paller AS. Atopic dermatitis and the atopic march. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: S118-27.

Stevens SR, Cooper KD. Atopic Dermatitis: current trends and future directions. *Curr Probl Dermatol* 2000; March/April: 51-7.

Stuyt RJL, Netea MG, Kim SH, Novick D, Rubinstein M, Kullberg BJ, et al. Differential roles of interleukin-18 (IL-18) and IL-12 for induction of gamma interferon by staphylococcal cell wall components and superantigens. *Infect Immun* 2001; 69: 5025-30.

Tanaka M, Aiba S, Takahashi K, Tagami H. Reduced proliferative responses of peripheral blood mononuclear cells specifically to *Candida albicans* antigen in patients with atopic dermatitis - comparison with their normal reactivity to bacterial superantigens. *Arch Dermatol Res* 1996; 288: 495-499.

Tay YK, Kong KH, Khoo L, Goh CL, Giam YC. The prevalence and descriptive epidemiology of atopic dermatitis in Singapore school children. *B J Dermatol* 2002; 146: 101-106.

Tomi NS, Kränge B, Aberer E. Staphylococcal toxins in patients with psoriasis, atopic dermatitis, and erythroderma, and in healthy control subjects. *J Am Acad Dermatol* 2005; 53 (1): 67-72.

Valenta R, Maurer D, Steiner R. Immunoglobulin E response to human proteins in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 1996; 107: 203-8.

Williams HC. Atopic Dermatitis. *N Engl J Med* 2005; 352: 2314-24.

Williams HC. Epidemiology of atopic dermatitis. *Clin Exp Dermatol* 2000; 25: 522-529.

Wollenberg A, Bieber T. Atopic dermatitis: from the genes to skin lesions. *Allergy* 2000; 55: 205-213.

Wüthrich B. Clinical aspects, epidemiology, and prognosis of atopic dermatitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999; 83 (5): 464-470.

Yoshino T, Asada H, Sano S, Nakamura T, Itami S, Tamura M et al. Impaired Responses of Peripheral Blood Mononuclear Cells to Staphylococcal Superantigens in Patients with Severe Atopic Dermatitis: a Role of T Cell Apoptosis. *J Invest Dermatol* 2000; 114, 2: 281-288.

Yoshizawa Y, Nomaguchi H, Izaki S, Kitamura K. Serum cytokine levels in atopic dermatitis. *Clin Exp Dermatol* 2002; 27: 225-229.

Yudate T, Yamada H, Tezuka T. Role of staphylococcal enterotoxins in pathogenesis of atopic dermatitis: growth and expression of T cell receptor V β of peripheral blood mononuclear cells stimulated by enterotoxins A and B. *J Dermatol Science* 1996; 13: 63-70.

Zollner TM, Wichelhaus TA, Hartung A, Von Mallinckrodt C, Wagner TOF, Brade V et al. Colonization with superantigen-producing *Staphylococcus aureus* is associated with increased severity of atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 994-1000.