Ana Karina Alves Moura

Estudo da imunidade inata na rosácea: células de Langerhans, células dendríticas plasmocitóides, receptores toll-like e expressão da forma induzida da enzima óxido nítrico sintase em biopsias de pele

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de: Dermatologia

Orientadora: Profa. Dra. Mirian Nacagami Sotto

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Moura, Ana Karina Alves

Estudo da imunidade inata na rosácea : células de Langerhans, células dendríticas plasmocitóides, receptores toll-like e expressão da forma induzida da enzima óxido nítrico sintase em biopsias de pele / Ana Karina Alves Moura. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.

Orientadora: Mirian Nacagami Sotto.

Descritores: 1.Rosácea 2.Imunidade inata 3.Células de Langerhans 4.Células dendríticas plasmocitóides 5.Receptores toll-like 6.Óxido nítrico sintase

USP/FM/DBD-409/12

Dedicatória

Dedico este trabalho de forma resumida, e ao mesmo tempo ampla, ao AMOR.
Resumida porque com uma palavra posso substituir uma lista de nomes de
pessoas que representam TUDO para mim.
Ampla porque esta lista inclui não só a minha FAMÍLIA, berço do que sou hoje e
perspectiva do tipo de exemplo que posso vir a estimular amanhã;
Mas também inclui AMIGOS, incansáveis em várias lutas,
companheiros em vários momentos;
E DEUS, que não deixa de firmar suas “pegadas na areia”, mesmo quando não sigo o
modelo cristão que Seus ensinamentos preceituam.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Mirian Nacagami Sotto, não só pela orientação desta Tese, mas por ter sempre incentivado os meus passos desde a residência, não hesitando em me encorajar mesmo nos momentos complicados. Obrigada, Dra Mirian, por manter a confiança mesmo com a distância e com os atropelos. Obrigada, além de tudo, pela sua amizade, que foi muito importante para os passos que dei até aqui. Saiba que a Sra. tem toda a minha admiração e respeito pois além de profissional exemplar, tem um lado humano surpreendente. Muito Obrigada.

À minha mãe, Celeste Alves Moura, por estar sempre disponível para me dar todo o suporte necessário para que eu conseguisse dar andamento a este projeto. Sem você, nada disso teria sido possível. Obrigada, mãe.

Ao meu esposo, Luis Alberto Saraiva Santos, pelo constante incentivo com palavras de estímulo e prontidão para ajudar na confecção e correção dos textos desta tese. Sua incansável dedicação à profissão e ao ensino são exemplos a serem seguidos.

À minha irmã, Ana Claudia Alves Moura; meu pai, José Guilherme Veloso Moura; minha madrinha, Ciléia Alves Menezes; minha avó, Terezinha

de Jesus Barros Alves; meus primos, Marcele e Murilo Alves Menezes e meu cunhado, Marcelo Portugal, por terem se revezado dando apoio à minha mãe nos cuidados com a minha pequenina, para que fosse possível a realização deste objetivo.

À Ana Maria Gonçalves da Silva e Fernanda Guedes pela realização das técnicas de imunoistoquímica desde o início deste projeto.

À Cristina, Jaqueline, Ivete e Lu, pelos cortes das lâminas para imunoistoquímica desta tese, por estarem sempre prontas para separar e buscar lâminas quando necessário e pela gostosa convivência durante todo o tempo que estive no laboratório de Dermatopatologia tanto na residência quanto na colaboração.

Ao Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva, pelo treinamento com o software de imagens e pela sua disposição sempre que necessário para tirar dúvidas.

À Dra Maria Cecília Rivitti, pelos ensinamentos durante a residência acerca do assunto abordado nesta tese, com dedicação, carinho e competência. Sua disposição a ajudar, seu conhecimento e sua preocupação com os pacientes serão sempre, para mim, espelhos da atuação de um bom profissional.

À Dra. Neusa Valente, que foi de suma importância para o meu aprendizado em dermatopatologia, e cuja convivência foi fundamental para que eu tivesse momentos inesquecíveis no laboratório de Dermatologia. Seu coração gigante e senso de humor peculiar me ajudaram muito a seguir em frente na colaboração e neste projeto. Uma grande amiga.

À Ilana Halpern que além de contribuir para o meu aprendizado no laboratório de Dermatopatologia, tornou-se uma amiga, dividindo assuntos em comum tanto na vida pessoal quanto na caminhada da tese de doutorado.

Ao corpo clínico, residentes e funcionários do Departamento de Dermatologia do HCFMUSP pela convivência e ensinamentos ao longo de todos esses anos.

Aos colegas de trabalho Mona Liza Prado Benevides Ruffeil, Maria Esmeralda Rodrigues, Denieli Maria Coelho Rodrigues, Taís Mendonça de Melo, Tânia Santiago Braga, André de Sena Paiva e Max Túlio Menezes pela compreensão e apoio com relação às minhas necessidades e angústias durante esta trajetória.

Epígrafe

Buscai em primeiro lugar o reino de Deus
e a sua Justiça,
E todas as demais coisas vos serão acrescentadas
Mt 6, 33

Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptado de “*International Comittee of Medical Journals Editors*” (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

LISTA DE ABREVIATURAS**LISTA DE SÍMBOLOS****LISTA DE FIGURAS****LISTA DE GRÁFICOS****LISTA DE TABELAS****LISTA DE ANEXOS****RESUMO****SUMMARY**

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS.....	7
3	ASPECTOS RELEVANTES DA LITERATURA.....	9
3.1	Rosácea.....	10
3.1.1	Epidemiologia.....	10
3.1.2	Aspectos clínicos.....	11
3.1.3	Aspectos psicossociais.....	11
3.1.4	Classificação em subtipos clínicos.....	12
3.1.5	Aspectos histopatológicos.....	15
3.1.6	Tratamento.....	16
3.1.7	Etiopatogenia.....	19
3.2	Imunidade Inata.....	23
3.2.1	Considerações Iniciais.....	23
3.2.2	Componentes.....	25
3.2.2.1	Barreiras Epiteliais – Papel das catelicidinas.....	25
3.2.2.2	Sistema Complemento/Células Fagocíticas – Papel da iNOS na produção do Óxido Nítrico.....	26
3.2.2.3	Células Dendríticas – Papel das células dendríticas plasmocitóides.....	31

3.2.2.4	Receptores – Papel dos receptores “toll-like”.....	33
3.2.3	Sequência de eventos.....	38
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1	Seleção da amostra.....	41
4.1.1	Classificação da amostra.....	41
4.1.1.1	De acordo com o subtipo clínico de rosácea.....	42
4.1.1.2	De acordo com a resposta tecidual.....	42
4.1.2	Grupo Controle.....	43
4.2	Avaliação Histopatológica.....	43
4.3	Imunoistoquímica.....	44
4.3.1	Demonstração das células dendríticas CD1a+ (Langerhans)...	45
4.3.2	Demonstração das células dendríticas CD123+ (células plasmocitóides).....	46
4.3.3	Demonstração dos receptores “Toll-like” 2.....	48
4.3.4	Demonstração dos receptores “Toll-like” 4.....	49
4.3.5	Demonstração da expressão da forma induzida da enzima óxido nítrico sintase.....	50
4.4	Análise Morfométrica.....	51
4.4.1	Análise da expressão epidérmica de células dendríticas CD1a+ (Langerhans).....	52
4.4.2	Análise da presença de células dendríticas plasmocitóides.....	53
4.4.3	Análise da expressão de receptores “toll-like” 2, 4 e da forma induzida da enzima óxido nítrico sintase.....	53
4.5	Análise Estatística.....	54
4.6	Ética.....	55
5.	RESULTADOS.....	56
5.1	Caracterização da amostra.....	57

5.1.1	Dados Clínicos.....	57
5.1.2	Características Histopatológicas.....	61
5.2	Avaliação dos dados de Imunoistoquímica.....	66
5.2.1	Demonstração e quantificação de células de Langerhans (CD1a+).....	66
5.2.2	Demonstração e quantificação das células dendríticas plasmocitóides (CD123+).....	69
5.2.3	Demonstração e quantificação do receptor Toll-Like 2 (TLR 2).....	71
5.2.4	Demonstração e quantificação do receptor Toll-Like 4 (TLR 4).....	75
5.2.5	Demonstração e quantificação da expressão da forma induzida da enzima óxido nítrico sintase (iNOS).....	79
6.	DISCUSSÃO.....	84
7.	CONCLUSÕES.....	101
	ANEXOS.....	103
	REFERÊNCIAS.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag	Antígeno
AMP	Peptídeo antimicrobiano
BDCA	“Blood dendritic cell antigen”
BSA	Soroalbumina bovina
CD	“Cluster of differentiation”
CL	Células de Langerhans
CpG	Nucleotídeos CG não-metilados repetidos
D2-40	Podoplanina (marcador linfático endotelial)
DC	Células dendríticas
DNA	Ácido desoxirribonucléico
eNOS	Forma endotelial da enzima óxido nítrico sintase
et al.	E outros
FA	Fração de área
FAN	Fator Anti-nuclear
FDA	“Food and Drug Administration”
GPCR	Receptores “G-protein-coupled”
hCAP18	Proteína precursora das catelicidinas
HSP	“Heat-shock proteins”
IFD	Imunofluorescência direta
IFN	Interferon
IL	Interleucina
iNOS	Forma induzida da enzima óxido nítrico sintase
KLK 5	Calicreína 5
LE	Lúpus Eritematoso
LL-37	“37-amino-acid peptide”
LPS	Lipopolissacáride
LRR	“Leucine-rich repeats”
Mal/TIRAP	“Myeloid differentiation factor 88 adaptor-like/“Toll-IL-1 receptor domain-containing adaptor protein”
MAPKs	“Mitogen-activated protein kinases”
MASP	“Mannose-associated serine protease”
mDC	Células dendríticas dérmicas convencionais ou mielóides
MMP	“Matrix metalloproteinases”
MO	Microorganismo
MyD88	“Myeloid differentiation factor 88”
NF-κβ	Fator nuclear-κβ
NK	Células “natural killer”
nNOS	Forma neuronal da enzima óxido nítrico sintase
NO	Óxido nítrico

NOS	NO-sintases
NPP	Não pápulo-pustular
PAMPs	“Pathogen-associated molecular patterns”
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
PDC	Células dendríticas plasmocitóides
PMN	Polimorfonucleares neutrófilos
PP	Pápulo-pustular
PRR	“Pattern recognition receptors”
RG	Rosácea Granulomatosa
RNA	Ácido ribonucléico
RNG	Rosácea Não Granulomatosa
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RUV	Radiação ultra-violeta
SARM	“Sterile-alpha and Armadillo motif containing protein”
SCTE	“Stratum corneum tryptic enzyme”
TIR	Receptor Toll-IL-1
TLR	Receptores “toll-like”
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TRAM	“TRIF-related adaptor molecule”
TRIF	“Toll-IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing interferon- β ”
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
κ	Kappa
μm	Micrômetro
%	Porcentagem
n	Tamanho da amostra
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
mL	Mililitro
M	Mol
mg	Miligrama
mM	Milimol
μL	Microlitro

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1 Histopatológico de rosácea.....	16
Figura 2 Algoritmo de tratamento de rosácea baseado nos sinais e sintomas da doença.....	16
Figura 3 Resposta do organismo a infecção inicial ocorrendo em três fases.....	24
Figura 4 Via “lectin” da ativação do complemento mediada pelo receptor “mannose-binding lectin”.....	28
Figura 5 Interação do patógeno com o receptor manose.....	29
Figura 6 PAMP (ligantes) para cada um dos 10 tipos de TLR conhecidos nos humanos.....	35
Figura 7 Rotas de transdução de sinais com seus respectivos TLR indutores e proteínas adaptadoras.....	38
Figura 8 Rosácea: Subtipo clínico Pápulo-pustular.....	57
Figura 9 Rosácea: Subtipo clínico Não pápulo-pustular.....	58
Figura 10 Achados histopatológicos: vasos dilatados, elastose solar, hiperplasia de glândulas sebáceas, ácaro, infiltrado inflamatório perifolicular e presença de polimorfonucleares no infiltrado.....	62
Figura 11 Achados histopatológicos: presença de granulomas.....	63
Figura 12 Células de Langerhans (células epidérmicas CD1a+) em lesões de rosácea e controles.....	67
Figura 13 Células Plasmocitóides (células dendríticas CD123+) em lesões de rosácea.....	70
Figura 14 Expressão de TLR 2 em lesões de rosácea.....	72
Figura 15 Expressão de TLR 2 em controles de pele normal.....	73
Figura 16 Expressão de TLR 4 em lesões de rosácea.....	76
Figura 17 Expressão de TLR 4 em controles de pele normal.....	77
Figura 18 Expressão de iNOS em lesões de rosácea.....	80
Figura 19 Expressão de iNOS em controles de pele normal.....	81

Figura 20	Efeito da radiação UV nos queratinócitos e células de Langerhans.....	87
Figura 21	Interrelação catelicidinas–células plasmocitóides na psoríase.....	89
Figura 22	Sequência de eventos postulados para o envolvimento da imunidade inata na patogênese da rosácea.....	97

LISTA DE GRÁFICOS

	Pag.
Gráfico 1 Distribuição da amostra segundo o subtipo clínico de rosácea.....	58
Gráfico 2 Distribuição da amostra segundo a faixa etária dos pacientes.....	59
Gráfico 3 Distribuição da amostra segundo o sexo.....	59
Gráfico 4 Distribuição da amostra segundo a etnia.....	59
Gráfico 5 Distribuição da amostra segundo a realização ou não de exames complementares para diagnóstico diferencial com LE.....	60
Gráfico 6 Frequência de achados morfológicos positivos por critério morfológico avaliado nos 28 casos estudados.....	61
Gráfico 7 Distribuição da amostra por Subtipo Histopatológico.....	64
Gráfico 8 Correlação entre os Subtipos Clínicos e Histopatológicos da amostra.....	66
Gráfico 9 Fração de área de epiderme ocupada por células dendríticas CD1a+. Comparação entre os grupos Rosácea e Controle.....	68
Gráfico 10 Células dendríticas plasmocitóides na resposta tecidual da rosácea. Comparação entre os grupos pápulo-pustular (PP) e não pápulo-pustular (PT).....	71
Gráfico 11 Fração de área de TLR 2 nos espécimes estudados. Comparação entre os grupos RG, RNG e Controle.....	74
Gráfico 12 Fração de área de TLR 4 nos espécimes estudados. Comparação entre os grupos RG, RNG e Controle.....	78
Gráfico 13 Fração de área de iNOS nos espécimes estudados. Comparação entre os grupos RG, RNG e Controle.....	82

LISTA DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1 Estudos clínicos realizados para avaliar os principais tratamentos tópicos da rosácea.....	17
Tabela 2 Terapias amplamente utilizadas para o tratamento da rosácea não aprovadas pelo FDA.....	18
Tabela 3 Frequência de achados morfológicos por subtipo histopatológico.....	65
Tabela 4 Frequência de achados morfológicos por subtipo clínico.....	65
Tabela 5 Dados demográficos, resultados de exames complementares e subtipos clínicos e histopatológicos dos doentes de rosácea.....	104
Tabela 6 Achados histopatológicos de 28 espécimes de rosácea.....	105
Tabela 7 Dados estatísticos da análise imunoistoquímica realizada nos diferentes subtipos clínicos e histopatológicos do grupo rosácea e do grupo controle.....	106

LISTA DE ANEXOS

	Pag.
Anexo 1 Tabela 5: Dados demográficos, resultados de exames complementares e subtipos clínicos e histopatológicos dos doentes de rosácea.....	104
Anexo 2 Tabela 6: Achados histopatológicos de 28 espécimes de rosácea.....	105
Anexo 3 Tabela 7: Dados estatísticos da análise imunoistoquímica realizada nos diferentes subtipos clínicos e histopatológicos do grupo rosácea e do grupo controle.....	106
Anexo 4 Etapas da quantificação de fração de área imunomarcada com CD1a+ com o “software” de imagens (Image-Pro Plus 4.5.0.29).....	107
Anexo 5 Etapas da quantificação de células CD123+ com o “software” de imagens (Image-Pro Plus 4.5.0.29).....	108
Anexo 6 Etapas da quantificação de fração de área imunomarcada com iNOS através do “software” de imagens (Image-Pro Plus 4.5.0.29).....	109
Anexo 7 Aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa.....	110

Moura AKA. “Estudo da imunidade inata na rosácea: células de Langerhans, células dendríticas plasmocitóides, receptores toll-like e expressão da forma induzida da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) em biopsias de pele” [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.123p.

Introdução: Rosácea é uma doença inflamatória cutânea crônica relativamente comum, com incidência que varia de 2 a 10%. Caracteriza-se pelo surgimento de pápulas e pápulo-pustulas, eritema e telangiectasias precedidas por episódios de flushing. Apesar de não ser doença que comprometa o estado geral dos doentes, por ter acometimento preferencial da face, representa problema estético acentuado que interfere na socialização e qualidade de vida dos doentes. A etiologia da rosácea permanece incerta. A participação da imunidade inata tem sido implicada recentemente. **Objetivo:** Este estudo avaliou o envolvimento da imunidade inata na patogenia da rosácea através de pesquisa de células de Langerhans, células plasmocitóides (PDC), receptores “toll-like” (TLR) e expressão da forma induzida da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) em biopsias de pele de pacientes com diagnóstico de rosácea. **Métodos:** Biopsias de 28 pacientes com diagnóstico clínico e histopatológico de Rosácea foram classificadas de acordo com características histopatológicas em Rosácea Granulomatosa (RG) (n = 10) e Rosácea Não Granulomatosa (RNG) (n = 18), e submetidas à técnica imunoistoquímica para demonstração de células de Langerhans (anticorpo anti-CD1a) (n = 26), PDC (anticorpo anti-CD123) (n = 24) e expressão dos receptores toll-like 2 e 4, bem como da forma induzida da óxido nítrico sintase (iNOS) (n = 28). Todos foram comparados com controles de pele normal (n = 15). **Resultados:** A população de células de Langerhans epidérmicas foi menor no grupo rosácea. Foram encontradas PDC dérmicas isoladas ou agrupadas no grupo rosácea, representando um novo dado no estudo da sua etiopatogenia. A expressão de TLR 2, TLR 4 e iNOS foi maior no grupo rosácea do que no grupo controle, estando distribuída com forte predominância na epiderme e anexos. Não houve diferença dos achados entre os grupos RG e RNG. **Conclusão:** Demonstrou-se, pela primeira vez, a presença de PDC nas lesões de rosácea. Juntamente com os outros marcadores estudados, os resultados apresentados confirmam a participação da imunidade inata na patogênese da rosácea através de mecanismos interdependentes e associados.

Moura AKA. "Inate immunity in rosacea: Langerhans cells, plasmacytoid dendritic cells, toll-like receptors and inducible oxide nitric synthase (iNOS) expression in skin specimens" [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2012. 123p.

Introduction: Rosacea is a common, chronic inflammatory condition with a reported prevalence between 2 and 10%. The disease has a variety of clinical manifestations that include flushing, persistent erythema, papules, pustules and telangiectasia. Because the facial skin is the predominant site of involvement, many patients sense that rosacea alters their social interactions affecting quality of life. The etiology of rosacea remains unknown. Recent studies have suggested that aberrant innate immunity is central to this disease. **Objective:** The aim of the present study was to examine the presence of Langerhans cells, plasmacytoid dendritic cells (PDC), and the expression of toll-like receptors (TLR) and inducible oxide nitric synthase (iNOS) in skin of patients with rosacea, in order to highlight the participation of innate immunity in the pathogenesis of this disease. **Methods:** 28 biopsy specimens were taken from patients with clinical and histopathological findings of rosacea. The samples were classified as Granulomatous rosacea (GR) (n= 10) or Non-Granulomatous rosacea (NGR) (n =18) according to histopathological features. Immunohistochemical demonstration of Langerhans cells (anti-CD1a antibody) (n = 24), PDC (anti-CD 123 antibody) (n = 26), TLR 2, TLR 4 and iNOS (n = 28) was performed in skin samples. The results were compared to normal skin control group (n = 15). **Results:** The number of Langerhans cells was lower in rosacea group than in control group. PDC were found in skin samples of rosacea as isolated cells and forming small clusters which represents a new contribution to the researches of its etiology. Expression of TLR2, TLR4 and iNOS was higher in rosacea samples than in normal skin controls, predominately located in epidermal and adnexal structures. The comparison between GR and NGR groups did not show significant statistical difference. **Conclusion:** This research demonstrates, for the first time, the presence of PDC in lesions of rosacea, which together with the other results of this study, ratifies the existence of an altered innate immunity in pathogenesis of rosacea.

1 Introdução

Rosácea é uma doença inflamatória crônica da unidade pilossebácea, de etiologia desconhecida, caracterizada pelo surgimento de eritema, telangiectasias, pápulas e pústulas acometendo principalmente áreas centrais da face e proximidades (Barco e Alomar, 2008; Culp e Scheinfeld, 2009).

Estimativas de prevalência têm demonstrado ser a rosácea uma doença relativamente comum, com taxas que variam de 2 a 10% na literatura mundial. Ocorre mais comumente em mulheres, embora os casos mais graves tenham sido relatados no sexo masculino (Utas et al., 1999; Bamford et al., 1999; Berth-Jones J, 2010).

Caracteriza-se clinicamente por “flushing” (eritema episódico), eritema, telangiectasias, pápulas, pápulo-pústulas e hipertrofia das glândulas sebáceas (fimas) acometendo predominantemente a face. Ocasionalmente pescoço e tronco superior podem estar envolvidos além de apresentar manifestações oculares em uma parte dos casos. O consumo de bebidas alcoólicas, quentes ou alimentos apimentados são considerados fatores desencadeadores do “flushing”. Durante os episódios inflamatórios, as áreas afetadas desenvolvem pápulas e pústulas, podendo apresentar edema e eritema intensos. A ausência de comedos contribui para o diagnóstico diferencial clínico com a acne (Crawford et al., 2004; Liu et al., 2006; Berth-Jones J, 2010).

Pela predominante localização facial, a rosácea representa problema estético acentuado que interfere na socialização e qualidade de vida dos doentes. A doença parece ser causa de constrangimento, ansiedade, baixa

auto-estima e esquivas de situações sociais mais freqüentemente do que se supõe. Fator importante de desapontamento é a inexistência de um tratamento curativo, e sim apenas para controle dos sintomas. Isto ocorre como resultado do limitado conhecimento da etiopatogenia da rosácea, uma vez que as opções terapêuticas não são direcionadas aos mecanismos patogênicos. O arsenal terapêutico atual é utilizado empiricamente para aliviar sinais e sintomas da doença (Crawford et al., 2004; Barco e Alomar, 2008; Aksoy et al., 2010).

Apesar da simples definição, a doença apresenta grande diversidade de formas clínicas (Elewski et al., 2010). Por este motivo, acredita-se que não haja uma única causa, mas sim que múltiplos mecanismos fisiopatológicos estejam envolvidos, embora haja dados inconsistentes em todas as teorias propostas até o momento para explicar a etiopatogenia da doença (Kolibásová et al., 1996; Diaz et al., 2003; Buechner, 2005; Barco e Alomar, 2008).

Entre os fatores apontados, há que se enfatizar os seguintes: genéticos, vasculares, radiação ultra-violeta (degradação da matriz extracelular dérmica), espécies reativas de oxigênio, anormalidades da unidade pilossebácea, microorganismos (*Demodex folliculorum* e *Helicobacter pylori*), agentes químicos e alimentos (Crawford et al., 2004; Buechner, 2005; Barco e Alomar, 2008; Berth-Jones J, 2010).

Recentemente foi sugerida a participação de imunidade inata aberrante nesta doença. Yamasaki et al. (2007) demonstraram a presença de altos níveis de um peptídeo antimicrobiano (AMP) da família das

catelicidinas, o “37-amino-acid peptide” (LL-37) e da enzima que o ativa, uma serina-protease da família das calicreínas, a “stratum corneum tryptic enzyme” (SCTE, também conhecida como calicreína 5) em lesões de pele de pacientes com rosácea. Posteriormente, em outro estudo foi demonstrada ainda a presença de expressão aumentada de receptores “toll-like” 2 (TLR 2) nas lesões de rosácea, estimulando a produção de SCTE (Yamasaki et al., 2011).

Excetuando-se estes dois estudos, não foram encontrados trabalhos relativos aos demais componentes da imunidade inata na resposta tecidual cutânea da rosácea. Sabe-se, porém, que tanto os AMP's quanto os TLR's, são estimulados em fases iniciais da indução da imunidade inata. Os AMP's representam uma das mais antigas formas de defesa do organismo contra infecção. São substâncias anti-microbianas produzidas por células epiteliais e fagócitos e depositadas próximo a superfície cutânea para atuarem na primeira linha de defesa (Murphy, 2012; Reinholz et al., 2012). Os TLR's, por sua vez, fazem parte do grupo de receptores chamados “pattern recognition receptors” (PRR) que reconhecem estruturas relativamente invariáveis em determinadas classes de microorganismos chamadas “pathogen-associated molecular patterns” (PAMPs), ou moléculas resultantes de injúria celular “danger-associated molecular patterns” (Medzhitov e Janeway, 2000; Kumar et al., 2010). São estimulados logo que o organismo entra em contato com um agente estranho. Em seguida, através de mecanismos complexos, ativam a produção de citocinas que irão regular o comportamento de vários

componentes da imunidade inata (Kumar et al., 2010; Kang et al., 2006; Murphy, 2012).

Com o intuito de aprofundar o estudo da etiopatogenia desta doença com ênfase na participação do sistema imune inato, este estudo objetivou investigar a presença de mais de um componente deste sistema nas mesmas biopsias de pele, selecionados de forma a obter a representatividade de etapas iniciais e tardias na sequência de acontecimentos que envolvem o processo da imunidade inata. Para tanto, foram selecionados os seguintes marcadores:

1) Receptores “toll-like” (TLR) 2 e 4: São responsáveis pela fase do reconhecimento de agentes invasores (fase precoce da imunidade inata). Já foi demonstrado que os queratinócitos expressam TLR 2 e TLR 4 e que estão envolvidos na indução de citocinas próinflamatórias quando estimulados pela presença de microorganismos (Koreck et al., 2003). O TLR 2 é ativado pelo peptidoglicano de bactérias gram-positivas e lipoproteínas bacterianas. O TLR 4 se liga a lipoproteínas de bactérias gram-negativas (Kang et al., 2006).

2) Forma induzida da enzima óxido nítrico sintase (iNOS): enzima que medeia a produção de espécies reativas de nitrogênio como o óxido nítrico (NO), responsável por um dos importantes mecanismos de destruição dos agentes invasores durante a fagocitose. Está presente tanto nas fases iniciais (fagocitose imediata), quanto nas fases tardias (fagocitose durante o processo de inflamação) da imunidade inata. Foi demonstrado que os queratinócitos produzem NO induzidos pela presença de agentes

antimicrobianos ou pela exposição à radiação ultra-violeta (Koreck et al., 2003; Weller, 2003; Murphy, 2012).

3) Células dendríticas plasmocitóides (PDC): raramente observadas e mesmo ausentes na pele normal, as PDC são atraídas para a pele com inflamação em determinadas doenças. Quando presentes denotam envolvimento da imunidade inata durante a fase de inflamação (Wollenberg et al., 2002; Murphy, 2012). Portanto, aparecem em fases intermediárias e tardias da evolução.

4) Células de Langerhans (CL): são estimuladas precocemente quando do contato com o agente invasor, mas são responsáveis pela indução da imunidade adquirida, que é ativada somente quando, nos últimos estágios da imunidade inata, o agente agressor não tiver sido debelado (Merad et al., 2008; Murphy, 2012).

Uma vez que os componentes acima caracterizados, juntos, participam precoce e tardiamente durante a evolução dos fenômenos que caracterizam a imunidade inata, considerou-se relevante avaliar a presença destes nas mesmas amostras de pele de doentes com rosácea, a fim de ratificar a participação deste sistema na etiopatogenia da doença.

Com a finalidade de verificar o envolvimento da imunidade inata na patogenia da rosácea, pretendemos:

1. Demonstrar o comportamento das células de Langerhans (CL), em biopsias de pele de pacientes com diagnóstico de rosácea.
2. Demonstrar a presença de células dendríticas plasmocitóides (PDC), em biopsias de pele de pacientes com diagnóstico de rosácea.
3. Demonstrar a expressão de receptores Toll-like 2 e 4, em biopsias de pele de pacientes com diagnóstico de rosácea.
4. Demonstrar a expressão da forma induzida da enzima óxido nítrico sintase (isoforma iNOS), em biopsias de pele de pacientes com diagnóstico de rosácea.

3 Aspectos Relevantes da Literatura

3.1 Rosácea

3.1.1 Epidemiologia

A doença é mais comum na Europa e nos Estados Unidos, ocorrendo com menor frequência em outros grupos étnicos. Somente cerca de 4% dos pacientes com rosácea são africanos, latinos ou asiáticos. Um estudo sueco demonstrou prevalência de aproximadamente 10%. Na Europa a porcentagem de pessoas acometidas é estimada em 1,5 a 10% de acordo com a “National Rosacea Society”. Estimativas conservadoras sugerem que a rosácea afeta 13 a 14 milhões de indivíduos nos Estados Unidos, o que significa uma prevalência de aproximadamente 5% (Barco e Alomar, 2008; Culp e Scheinfeld, 2009; Elewski et al., 2010).

A rosácea é mais comum no sexo feminino (3:1), tendendo a ter maior gravidade no sexo masculino (maior incidência de complicações e maior prevalência do subtipo fimatoso). Os fototipos Fitzpatrick I e II são os mais acometidos (Barco e Alomar, 2008; Elewski et al., 2010).

Os pacientes são mais diagnosticados com a doença entre os 30-50 anos, embora possa ocasionalmente ser diagnosticada antes dos 30 anos (Buechner, 2005; Elewski et al., 2010).

3.1.2 Aspectos clínicos

A rosácea caracteriza-se clinicamente pelo surgimento de pápulas e pápulo-pústulas, eritema e telangiectasias precedidas por episódios de “flushing”. Entretanto, nem todos os achados clínicos estão sempre presentes, portanto recentemente foi definido que para o diagnóstico de rosácea é necessária a presença de um dos seguintes achados localizados nas áreas centrais da face:

- “Flushing” (eritema transitório)
- Eritema não transitório
- Pápulas e pústulas
- Telangiectasias

Achados secundários incluem queimação ou dor, edema, placas, manifestações oculares e crescimentos exagerados das dimensões da face por hiperplasia de glândulas sebáceas (fimas) (Crawford et al., 2004; Berth-Jones J, 2010).

3.1.3 Aspectos psicossociais

Uma vez que a doença geralmente afeta a face, há impacto psicológico, social e ocupacional significativo (Barco e Alomar, 2008; Aksoy et al., 2010). Segundo Liu et al. (2006), a “National Rosacea Society” destacou os seguintes pontos:

- 70% dos pacientes relatam perda de auto-estima e auto-confiança.

- 70% relatam que suas relações profissionais foram negativamente afetadas pela aparência estética da doença.
- Um terço dos pacientes perderam seus empregos por este motivo.

3.1.4 Classificação em subtipos clínicos

Devido à grande diversidade de achados clínicos, a classificação de rosácea em diferentes subtipos clínicos é de extrema importância. A classificação de Plewig e Kligman divide a doença em três estágios baseados nas manifestações clínicas, com progressão da doença de um estágio para o outro. No estágio I, os pacientes apresentam eritema com duração de horas a dias e podem desenvolver telangiectasias. O estágio II é caracterizado por eritema persistente, numerosas telangiectasias e múltiplas pápulas e pústulas. No estágio III, que afeta uma minoria de pacientes, grandes nódulos inflamatórios, infiltrações furunculóides e hiperplasia tecidual podem estar presentes (Buechner, 2005).

Em 2002, o “National Rosacea Society’s Expert Committee” propôs uma nova classificação baseada nas características morfológicas das lesões predominantes e lesões associadas. Essa nova abordagem define quatro subtipos, sendo que os pacientes podem apresentar achados clínicos de mais de um subtipo e a evolução de um subtipo para o outro pode ou não ocorrer. São eles (Buechner, 2005; Elewski et al., 2010; Lazaridou et al., 2011):

- Eritêmato-telangiectásica: pacientes apresentam história de “flushing” e eritema facial central persistente. Orelhas, pescoço e parte superior do tronco podem ser acometidos. Telangiectasias são comuns, mas não essenciais para o diagnóstico.
- Pápulo-pustular: Eritema centro-facial persistente com pápulas ou pústulas ou ambas, com distribuição central na face. As regiões perioral, perinasal ou periocular podem estar envolvidas. Pode haver discreto edema causado pelo eritema facial prolongado ou “flushing” que pode durar dias.
- Rosácea fimatosa: frequentemente observada após ou em combinação com os tipos acima. Há um espessamento da pele, com grandes orifícios foliculares os quais contêm “plugs” de sebo e queratina. Rinoforma (nariz) é a apresentação mais comum, mas também pode ocorrer no mento (mentofima), mandíbula (gnatofima), orelha (otofima) e sobrancelhas (blefarofima). As lesões devem-se aos infiltrados inflamatórios extensos, hipertrofia do tecido conjuntivo, fibrose e hiperplasia maciça das glândulas sebáceas.
- Rosácea Ocular: Pode ocorrer em 3 a 58% dos pacientes com rosácea. Os sintomas oculares podem surgir antes das manifestações cutâneas em mais de 30% dos pacientes, mas aproximadamente metade dos pacientes desenvolve lesões de pele inicialmente. Os

sintomas oculares variam desde uma sensação de secura a queimação, prurido, sensibilidade à luz e visão borrada. Blefarite e conjuntivite são os achados mais comuns em pacientes com rosácea ocular. Outros sinais oculares são telangiectasias da conjuntiva, escamas e crostas nas pálpebras, infiltrados corneais, úlceras de córnea. A disfunção das glândulas de Meibomius, que ocorre em 78% dos casos, favorece meio ideal para infecções por *Staphylococcus* pois diminui secreções de lipídios. A coexistência com dermatite seborréica é freqüente. A gravidade da doença ocular não é proporcional à gravidade da rosácea facial. No entanto há correlação entre a gravidade da rosácea ocular e a tendência de fortes episódios de “flushing”.

Além dos quatro subtipos existem formas clínicas que são consideradas variantes, a seguir (Sanchez et al., 2008; Barco e Alomar, 2008; Culp e Scheinfeld, 2009):

- Rosácea granulomatosa: caracterizada por pápulas ou nódulos eritemato-acastanhados. Geralmente acomete bochechas nas regiões periorificiais com freqüente envolvimento das pálpebras inferiores.
- Rosácea fulminante: representa manifestação grave da rosácea. Manifesta-se com múltiplas pápulas eritematosas, pústulas, nódulos, cistos e abscessos.

3.1.5 Aspectos histopatológicos

Os aspectos histopatológicos encontrados na rosácea são predominantemente dérmicos. Nota-se a presença de vasos superficiais dilatados e ocasionalmente também pode ser encontrada dilatação linfática. Elastose solar é geralmente presente e algumas vezes proeminente. A intensidade e o padrão de inflamação variam de moderado infiltrado linfohistiocítico perivascular a infiltrações mais extensas perivascular e perifoliculares (Figura 1 A). Quando há acometimento folicular mais extenso, ocorre o acúmulo de neutrófilos (Elder et al., 2005; Berth-Jones J, 2010).

Infiltrado inflamatório granulomatoso é relatado em aproximadamente 10% dos casos de rosácea, com necrose caseosa em cerca de 10% destes casos. A rosácea granulomatosa pode, histologicamente, mimetizar infecções por micobactérias com histiócitos epitelióides formando um padrão tuberculóide. A sarcoidose cutânea também representa diagnóstico diferencial histopatológico da rosácea. Agregados de células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho são, por vezes, observados ao redor de rupturas foliculares (Figura 1 B) (Marks e Harcourt-Webster, 1969; Helm et al., 1991; Elder et al., 2005; Barco e Alomar, 2008).

Outro achado encontrado principalmente nos casos de rinofima é a hiperplasia de glândulas sebáceas (Aloi et al., 2000).

Demodex folliculorum está presente em cerca de 51% dos casos de rosácea (Roihu e Kariniemi, 1998).

Figura 1. Aspectos histopatológicos de lesões de rosácea. (A) Infiltrado linfohistiocitário perivascular, com vasos dilatados. (B) Infiltrado perifolicular com presença de célula gigante multinucleada e dilatação vascular. Extraído de Berth-Jones J, 2010.

3.1.6 Tratamento

Devido ao limitado conhecimento da fisiopatologia da rosácea, o tratamento é essencialmente sintomático e empírico (Figura 2) (Barco e Alomar, 2008).

Figura 2. Algoritmo de tratamento de rosácea baseado nos sinais e sintomas da doença. Adaptado de Elewski et al., 2010.

De acordo com revisão na base de dados Cochrane realizada por Culp e Scheinfeld (2009), a qualidade dos estudos que avaliam os tratamentos de rosácea tem sido pouco satisfatória. É possível que metronidazol tópico e ácido azeláico, assim como metronidazol oral e tetraciclina sejam eficazes. No entanto, não há evidências suficientes para a eficácia de outros tratamentos, sendo necessários estudos clínicos bem desenhados, duplo-cegos e randomizados para avaliar os tratamentos atuais. Elewski et al. (2010) fazem uma revisão dos estudos realizados para verificar a efetividade dos tratamentos tópicos da rosácea (Tabela 1):

Tabela 1. Estudos clínicos realizados para avaliar os principais tratamentos tópicos da rosácea. Adaptado de Elewski et al., 2010.

Tratamento	Tipo e qualidade da evidência	Referência	n
Ácido azeláico 15% gel	Placebo-controlado, randomizado, duplo-cego, Base de dados Cochrane	Elewski et al., 2003	251
		Thiboutot et al., 2003	664
		van Zuuren et al., 2007	
Metronidazol 0,75% creme ou gel, 1% creme	Placebo-controlado, randomizado, duplo-cego, Base de dados Cochrane	Wolf et al., 2007 van Zuuren et al., 2007	582
Sulfacetamida sódica 10%/enxofre 5% creme ou loção	Randomizado, duplo-cego	Lebwohl et al., 1995	
		Torok et al., 2005	152
		Sauder et al., 1997	94
Clindamicina 1% loção	Randomizado, investigador cego	Wilkin, 1993 Leyden et al., 2004	43
Eritromicina 2% solução ou Eritromicina + loção zinco	Experiência clínica	Schachner et al., 1990 (em acne)	103
Retinóides tópicos, incluindo tretinoína 0,025% creme ou loção; 0,01% gel, e adapaleno 0,1% gel	Limitada evidência	Hoting et al., 1996	92
		Ertl et al., 1994	22
		Altinyazar et al., 2005	55

Os medicamentos aprovados pelo “Food and Drug Administration” (FDA) para o tratamento da rosácea são: metronidazol tópico, ácido azelaico e sulfacetamida sódica (uso tópico), além de doxiciclina (uso sistêmico) e luz intensa pulsada (Barco e Alomar, 2008; Culp e Scheinfeld, 2009).

Outros medicamentos conhecidamente utilizados no manejo da doença, mas que não foram aprovados pelo FDA, estão demonstrados na tabela 2.

Tabela 2. Terapias amplamente utilizadas para o tratamento da rosácea não aprovadas pelo FDA. Adaptado de Culp e Scheinfeld, 2009.

Antibióticos Orais "Standard"	Antibióticos Orais Menos utilizados	Antibióticos Orais Relatados, mas não usados	Tratamento Oral do "Flushing"	Tratamentos Orais não-antibióticos
Tetraciclina	Azitromicina	Penicilina	Contraceptivos Orais	Invermectina
Doxiciclina	Claritromicina	Eritromicina	Medicamentos psiquiátricos (Amitriptilina, Clonidina, Pimozida)	Isotretinoína
Minociclina	Doxiciclina (dose sub-antibiótica)	Amoxicilina ou ampicilina	Aspirina	Acitretina
		Metronidazol	Beta-bloqueadores	Cetoconazol
		Dapsona	Ondansetron	Espironolactona
			Inibidores da ciclooxigenase 2	Prednisona (somente para rosácea fulminans)

Tratamentos alternativos podem incluir o uso de inibidores do “flushing” como vasoconstritores e hipotensores, tratamentos cirúrgicos como dermoabrasão nos casos fimatosos, além de medidas coadjuvantes como uso de protetor solar, camuflagem (maquiagem) e a prevenção de exposição aos fatores desencadeantes ou de piora (Barco e Alomar, 2008; Elewski et al., 2010).

3.1.7 Etiopatogenia

A etiologia da rosácea permanece incerta. Vários fatores têm sido implicados em sua patogênese podendo ser divididos nas seguintes categorias:

- Genéticos: Todos os fatores considerados desencadeantes dos episódios de rosácea atingem também pessoas que não desenvolvem os sinais e sintomas da doença. Consequentemente, acredita-se que os portadores de rosácea devam ter sensibilidade herdada a estes desencadeantes (Crawford et al., 2004).
- Vasculares (“Flushing”): teoria baseada no proeminente “flushing” facial observado em muitos pacientes na rosácea, que é controlado por mecanismos vasodilatadores humorais e estímulos neurais. As reações de “flushing” consistem em um aumento de fluxo sanguíneo na superfície cutânea, geralmente desencadeada por estímulos térmicos como calor ou bebidas quentes, estresse, alimentos apimentados ou alterações hormonais. Mediadores propostos para este mecanismo incluem o peptídeo intestinal vasoativo, gastrina, serotonina, histamina, prostaglandinas, que, no entanto, não estão totalmente confirmados. Também tem sido observado aumento nas concentrações de substância P em pacientes com rosácea. Esse fator tem influência na vasodilatação da reação inflamatória local. Foi observado aumento de fator de crescimento vascular endotelial

(VEGF), CD31 e D2-40 (um marcador linfático endotelial) em pacientes com rosácea. A radiação UV pode estar implicada no aumento de VEGF, enquanto o aumento de catelicidinas foi sugerido como possível modulador das reações vasodilatadoras da rosácea, uma vez que o LL-37, na presença de um receptor “G-protein-coupled” presente nas células endoteliais, induz à produção de VEGF pelos queratinócitos (Crawford et al., 2004; Buechner, 2005; Yamasaki e Gallo, 2009).

- Radiação Ultra-violeta (degradação da matriz extracelular dérmica): foi sugerido que a radiação solar seria evento inicial que levaria à síntese aumentada de enzimas deletérias à matriz extracelular, chamadas “matrix metalloproteinases” (MMP), e consequentemente ao dano no tecido conjuntivo dérmico e de vasos cutâneos culminando em lesão endotelial, edema e inflamação (Crawford et al., 2004; Berth-Jones J, 2010; Jang et al., 2010; Del Rosso JQ, 2012).
- Espécies reativas de oxigênio (ROS): a terapêutica proposta para o manejo de doentes com rosácea tem sido representada principalmente pela ação de medicamentos que inibem ROS, como tetraciclina, ácido azelaico, metronidazol e retinóides. A maior expressão de ROS foi demonstrada em biópsias de rosácea quando comparadas com pele normal (Yamasaki e Gallo, 2009).

- Agentes químicos, dietéticos e hormonais: alimentos apimentados e quentes e bebidas alcoólicas são historicamente conhecidos como gatilhos no desencadeamento de “flushing” em doentes portadores de rosácea, muito embora evidências científicas sejam insuficientes. Alguns medicamentos como amiodarona, corticosteróides, ácido nicotínico e vitaminas B6 e B12 também têm sido relatados como desencadeadores de “flushing” na rosácea. A exacerbação dos sintomas cutâneos da rosácea durante a menstruação ou menopausa sugere participação de fatores hormonais (Szlachcic, 2002; Berth-Jones J, 2010).
- Anormalidades da unidade pilossebácea: há controvérsias se as pápulas e pústulas na rosácea são devidas ao processo inflamatório folicular, uma vez que trabalhos baseados em exames anatomopatológicos não encontraram alterações foliculares em todos os casos examinados. Marks e Harcourt-Webster (1969) em um estudo com 74 biópsias de pacientes com rosácea pápulo-pustular, encontraram alterações no folículo em apenas 20% dos casos. Por outro lado, o uso de antibióticos que atuam sobre microorganismos foliculares é efetivo na rosácea (Crawford et al, 2004; Barco e Alomar, 2008).
- Microorganismos: Dois principais microorganismos têm sido discutidos como participantes na etiopatogenia da rosácea. Um deles

é o *Demodex folliculorum*, habitante comum da pele humana. Tem sido implicado na patogênese por se observar algumas vezes um aumento significativo no número de microorganismos nos folículos pilosos das áreas afetadas. As cepas podem provocar reações inflamatórias ou alérgicas por bloqueio mecânico de folículos ou por agir como vetores para microorganismos. Alguns estudos, no entanto, têm demonstrado que a resolução clínica da rosácea após tratamento com tetraciclina ou antibióticos tópicos não afeta a população de *Demodex*. O segundo patógeno implicado é o *Helicobacter pylori*. No entanto, esta correlação ainda é controversa. Vários estudos demonstram positividade sorológica para esta bactéria em portadores de rosácea; outros estudos evidenciam melhora clínica nos sintomas de rosácea após tratamento para erradicação do *Helicobacter pylori*. Entretanto, maiores evidências moleculares ainda são necessárias para confirmar essa associação na etiopatogenia da rosácea (Kolibásová et al., 1996; Bamford et al., 1999; Rojo-García et al., 2000; Diaz et al., 2003; Hernando-Harder, 2009; Zhao et al., 2010; Tüzün et al., 2010; Elston, 2010).

- Imunidade Inata: Yamasaki e Gallo (2009) compilaram seus achados acerca da participação da imunidade inata na patogênese da rosácea. Esses autores sugerem que TLR e outros PRR responderiam a estímulos ambientais como radiação UV, microorganismos, traumas químicos e físicos levando à produção de citocinas e peptídeos

antimicrobianos vasoativos e proinflamatórios (catelicidinas). Esses dados surgiram a partir de trabalhos que detectaram o aumento de catelicidinas e calicreína 5 nas lesões de rosácea (Yamasaki et al., 2007). O aumento da expressão de TLR 2 nas lesões de rosácea levaria à maior expressão de calicreína 5 (Yamasaki et al., 2011). No entanto, pouco ainda é conhecido deste novo fator apontado para o entendimento da etiopatogenia da rosácea.

3.2. Imunidade Inata

3.2.1 Considerações Iniciais

A imunidade é responsável pela proteção do organismo contra agentes infecciosos ou outros danos/substâncias e é representada por uma gama de células e moléculas que caracterizam o sistema imune (Murphy, 2012).

O sistema imune humano apresenta dois componentes: imunidade inata e imunidade adquirida. Esses dois braços utilizam diferentes mecanismos para a defesa do hospedeiro (Koreck et al., 2003). A imunidade inata baseia-se em um número limitado de receptores e proteínas codificadas na linha germinativa e que reconhecem estruturas comuns a vários patógenos. Já a imunidade adquirida utiliza um processo de rearranjo somático de genes para gerar um repertório significativo de receptores antigênicos capazes de fazer distinção mesmo entre moléculas

semelhantes. Devido a esta especificidade, que exige primeiramente uma expansão clonal, a imunidade adquirida inicia sua atuação tardiamente, mais de 96 horas após o contato com o agente desencadeante, enquanto a imunidade inata inicia-se imediatamente após exposição a agentes invasores representando a primeira linha de defesa do organismo contra infecção (Figura 3) (Medzhitov e Janeway, 2002; Murphy, 2012).

Figura 3. Resposta do organismo a infecção inicial ocorrendo em três fases. As duas primeiras representam a atuação da imunidade inata. PAMPS: “pathogen-associated molecular patterns”. Adaptado de Murphy, 2012.

A função mais importante da imunidade inata na pele é reconhecer organismos invasores e moléculas próprias com alteração de estrutura, sendo este um evento crucial para o desencadeamento de mecanismos interdependentes e associados que levam à ativação tanto da própria imunidade inata como da adquirida. Uma reação anormal a qualquer destes estímulos pode levar ao desenvolvimento de efeitos patológicos. A importância da imunidade inata é comprovada pelo fato de que defeitos em seus componentes levam a uma susceptibilidade aumentada a infecções, mesmo na presença de uma imunidade adquirida intacta (Medzhitov e Janeway, 2002; Koreck et al., 2003; Bevins e Liu, 2007; Murphy, 2012).

3.2.2 Componentes

Os componentes da imunidade inata são representados pelas barreiras epiteliais; por proteínas plasmáticas incluindo as do sistema complemento; além de tipos celulares diversos destacando-se as células fagocíticas (principalmente neutrófilos e macrófagos) e as células dendríticas. A indução e a regulação da resposta imune inata envolvem múltiplas interações entre estes componentes. Para que isso ocorra, faz-se necessário o reconhecimento do sinal de perigo, que acontece em grande parte graças a receptores presentes em várias células (Abbas e Lichtman, 2005; Kumar et al., 2010; Turvey e Broide, 2010).

3.2.2.1 Barreiras Epiteliais – Papel das catelicidinas

Constituem-se por barreiras mecânicas, químicas e microbiológicas.

Na pele são representadas por:

MECÂNICAS: queratinócitos com suas junções intercelulares; fluidos.

QUÍMICAS: ácidos graxos; peptídeos antimicrobianos (três classes: catelicidinas, defensinas, histatinas).

MICROBIOLÓGICAS: microbiota normal.

Além de formarem uma barreira química na superfície da pele, os peptídeos antimicrobianos (AMP) funcionam como gatilhos e coordenam múltiplos componentes da imunidade inata e adquirida. Várias células que habitam a pele (queratinócitos) ou células circulantes como neutrófilos e células “natural killer” (NK) produzem AMP. As catelicidinas são geralmente

conhecidas por uma de suas formas peptídicas (LL-37) ou pela sua proteína precursora (hCAP18). O processamento desta forma precursora é elemento crucial na atividade da catelicidina, uma vez que ela precisa ser clivada por serina proteases para dar origem a peptídeos maduros. O “37-amino-acid peptide” (LL-37) é capaz de romper membranas bacterianas, envelopes virais, possuindo ainda atividade antifúngica. Além de agente antimicrobiano direto, o LL-37 pode desencadear resposta imune através da interação com receptores, resultando em efeitos sinalizadores intracelulares. Esta função dos AMP que culmina na ativação da resposta imune do hospedeiro tem sido denominada de “alarmina” (Schauber e Gallo, 2008; Morizane et al., 2010; Reinholz, 2012; Del Rosso JQ, 2012).

3.2.2.2 Sistema Complemento/Células Fagocíticas – Papel da iNOS na produção do Óxido Nítrico

O sistema complemento é importante componente da imunidade inata representado por uma gama de proteínas solúveis presentes nos fluidos que, na presença de um fator desencadeante, interagem umas com as outras resultando em três diferentes vias de ativação (Xu et al., 2001; McGrath et al., 2006; Bohlson et al., 2007; Gros et al., 2008; Kojouharova et al., 2010):

- Via “lectin”: iniciada por proteínas solúveis que se ligam a carboidratos nos patógenos.

- Via clássica: iniciada por patógenos ou complexos antígeno-anticorpo, que interagem com o componente C1.
- Via alternativa: pode ser iniciada pelas outras vias ou por hidrólise espontânea gerando um tipo singular de C3 convertase.

Essas três vias de ativação do complemento resultam na destruição do agente invasor diretamente ou através da fagocitose, pois convergem na geração de uma enzima (C3 convertase), que quebra a proteína C3 do complemento em C3a (que atrai fagócitos para o local) e C3b (que se deposita no agente invasor – opsonização). Os fagócitos atraídos engolfam os patógenos ligados ao C3b destruindo-os (Guyton e Hall, 1996; Schraufstatter et al., 2002).

Se um microorganismo cruza a barreira epitelial e começa a replicar nos tecidos do hospedeiro, este é imediatamente reconhecido por células fagocíticas residentes (geralmente os macrófagos das submucosas). Ocorre também a ativação do sistema complemento, resultando na indução de fagócitos por esta via. Posteriormente, após sinalização e produção de citocinas, há quimiotaxia de neutrófilos para o local com a finalidade de reforçar o contingente de células fagocíticas (Guyton e Hall, 1996; Kumar et al, 2010).

As células fagocíticas (macrófagos e neutrófilos), reconhecem patógenos através de receptores na sua superfície, que estimulam a fagocitose e a morte intracelular dos invasores. Estes receptores incluem:

- Família “C-type lectin”: funcionam como “opsoninas” através da ligação à parede do microorganismo, facilitando o seu reconhecimento por fagócitos e pelo sistema complemento, iniciando a via “lectin” da ativação do complemento (Figura 4) (Medzhitov e Janeway, 2000).

Figura 4. Via “lectin” da ativação do complemento é mediada pelo receptor “mannose-binding lectin”, cuja ligação ao microorganismo ativa serina-proteases MASP1 e MASP2, que leva à quebra dos componentes C2 e C4 do complemento, iniciando a cascata do complemento. MASP: “mannose-associated serine protease”. Adaptado de Medzhitov e Janeway, 2000.

- Receptores “scavenger” e de manose dos macrófagos: medeiam a captura e o transporte de patógenos aos lisossomos, onde são destruídos. O receptor de manose (também membro da família “lectin” cálcio-dependente) reconhece carboidratos com grande quantidade de manoses, enquanto que o receptor “scavenger” liga-se à parede celular de bactérias (Figura 5) (Medzhitov e Janeway, 2000).

Figura 5. Interação do patógeno com o receptor manose levando à internalização e direcionamento do invasor ao fagolisossomo. Adaptado de Thomas e Limper, 2007.

- Receptores do sistema complemento: receptores que reconhecem patógenos ligados à proteína C3b do complemento, promovendo a fagocitose (van Lookeren Campagne et al., 2007).
- Receptores “G-protein-coupled” (GPCR): além de promover a fagocitose, estes receptores também ajudam a aumentar a capacidade microbicida dos fagócitos, através do aumento da produção de substâncias tóxicas por estas células (Kobilka, 2007; Murphy, 2012).

Após a fagocitose, macrófagos e neutrófilos produzem uma gama de produtos tóxicos que ajudam a eliminar os microorganismos. As mais importantes substâncias produzidas são:

- Peptídeos antimicrobianos (AMP)
- Espécies reativas de oxigênio (ROS)
- Óxido Nítrico (NO)

Óxido Nítrico (NO), é um radical livre sintetizado a partir da L-arginina por uma família de enzimas NO-sintases (NOS), todas presentes na pele. A síntese de NO é regulada pela ativação das NOS constitutivas (nNOS=neuronal NOS e eNOS=endotelial NOS) que produzem uma pequena e benéfica quantidade de NO, ou síntese das NOS induzidas por processos inflamatórios (iNOS=NOS induzidas), que produzem grandes

quantidades de NO, associadas com injúria tecidual. Precocemente, a expressão de iNOS é induzida por um subtipo de receptor GPCR. Na fase de inflamação, endotoxinas ou citocinas induzem macrófagos e outras células a expressar a isoforma iNOS que, através da produção de NO, representa importante mecanismo de ação da citotoxicidade dos macrófagos ativados (Vane et al, 1994; Rowe, 1997; Kube, 2000; Weller, 2003).

3.2.2.3 Células Dendríticas – Papel das células dendríticas plasmocitóides.

As células dendríticas (DC) conectam a imunidade inata com a adquirida pela sua habilidade de induzir respostas imunes apropriadas através do reconhecimento de patógenos invasores, funcionando como adjuvantes naturais (Wollenberg et al., 2002; Jahnsen et al., 2002). Na pele identificam-se quatro populações de células dendríticas (Robak et al, 2004; Valladeau e Saeland, 2005):

- Células de Langerhans (CL) epidérmicas: presentes normalmente na epiderme.
- Células dendríticas dérmicas convencionais ou mielóides (mDC) residentes: presentes normalmente na derme.
- Células dendríticas dérmicas convencionais ou mielóides (mDC) inflamatórias: só aparecem na derme em estados inflamatórios.

- Células dendríticas plasmocitóides (PDC): ausentes na pele normal. São seletivamente recrutadas para as áreas de pele com inflamação, dependendo da doença cutânea.

O principal papel das células dendríticas convencionais ou mielóides (mDC) é processar microorganismos invasores gerando antígenos peptídicos que podem ativar células T dando início à imunidade adquirida (Murphy, 2012; Kumar et al, 2010).

As células dendríticas plasmocitóides (PDC) são células especializadas capazes de produzir grandes quantidades de Inteferon tipo I (IFN I). Podem ser identificadas nos tecidos pelos seus altos níveis de receptor de interleucina 3 - cadeia alfa (CD123). São CD11c (-), o que as diferencia das mDC que são CD11c (+), CD123 (-). Apresentam ainda positividade para BDCA ("blood dendritic cell antigen") 2 e 4, enquanto que as mDC são positivas para BDCA 1 e 3 (Farkas et al., 2001; Wollenberg et al., 2002; Robak et al., 2004; Zaba et al., 2009).

Na presença de interleucina 3 (IL3) e o ligante de CD40 (CD40-L), os precursores das PDC transformam-se em células dendríticas maduras que induzem células T a produzir citocinas de perfil Th2 "in vitro". Na presença de vírus, os precursores das PDC produzem grandes quantidades de IFN α/β (IFN tipo I) além de sofrerem diferenciação em PDC maduras que estimulam linfócitos T a produzir IFN γ e IL-10 (Jahnsen et al., 2002).

A produção potente de IFN é induzida por vírus RNA de fita simples e DNA contendo nucleotídeos CG não-metilados repetidos (CpG), os quais

ligam-se a receptores “toll-like” 7 e 9 endossômicos nas PDC. A classe de CpG determina o nível de IFN produzido (Zaba et al., 2009).

Qualquer que seja o mecanismo (IFN-dependente ou não), sabe-se que as PDC estão envolvidas no recrutamento de células NK e células T ativadas, ativação de células NK e macrófagos, diferenciação de células T imaturas em efectoras, diferenciação de plasmócitos, além de promover funcionalmente as mDC. Mais recentemente ainda foi sugerido que as PDC podem estar envolvidas em funções tolerogênicas, particularmente induzindo células T regulatórias CD4(+)CD25(+) (Jegalian et al., 2009; Ueno et al., 2010; Tel et al., 2010).

3.2.2.4 Receptores – Papel dos receptores “toll-like”

O reconhecimento de organismos invasores é mediado por receptores chamados “pattern recognition receptors” (PRR’s). Estes receptores são capazes de reconhecer estruturas comuns a determinadas classes de microorganismos chamadas “pathogen-associated molecular patterns” (PAMPs), ou moléculas liberadas após dano tissular chamadas “danger-associated molecular patterns” (Medzhitov e Janeway, 2002; Kumar et al., 2010).

Vários tipos celulares participantes da imunidade inata, como os fagócitos (macrófagos e neutrófilos) e células dendríticas, além de células do local invadido (no caso da pele os queratinócitos), constitutivamente

expressam PRR na sua superfície. Funcionalmente, os PRR são classificados em (Medzhitov e Janeway, 2002):

- Secretados: funcionam como “opsoninas”. Ligam-se à parede celular levando à destruição pelo complemento e fagocitose. O receptor desta classe funcional melhor caracterizado é o “mannan-binding lectin”.
- Endocíticos: Medeiam a captura e transporte de microorganismos para lisossomos de fagócitos levando à destruição. Os principais exemplos desta classe funcional são os receptores “scavenger” e de manose dos macrófagos.
- Sinalizadores: Ativam transdução de sinais - expressão de genes da resposta imune levando à produção de citocinas. Neste grupo estão incluídos os receptores “toll-like” e “nod-like”.

Os dois primeiros estimulam a fagocitose e a morte intracelular de agentes invasores, enquanto que os últimos, através da produção de mediadores de ação curta denominados citocinas, desencadeiam uma resposta inflamatória caracterizada pela atração de células e facilitação da passagem de proteínas do plasma para o local da infecção, algumas horas após o início do processo infeccioso (Kumar et al., 2010; Murphy, 2012).

Dentre os PRR sinalizadores, os receptores “toll-like” (TLR) configuram o grupo mais estudado. Representam uma família de receptores de superfície celular, recentemente descobertos, considerados componentes-chave para a imunidade inata. Até pouco tempo atrás, acreditava-se que a imunidade inata seria inespecífica compreendendo mecanismos como a fagocitose, ativação do complemento e produção de peptídeos antimicrobianos. Esses mecanismos seriam inespecíficos e não pareciam distinguir entre as diferentes substâncias estranhas agressoras. Atualmente sabe-se que através dos TLR’s, a imunidade inata demonstra substancial especificidade e controla a ativação da imunidade adquirida com precisão. Já foi demonstrado que os queratinócitos, da pele normal, expressam TLR2 e TLR4 (Koreck et al., 2003; Kim, 2005; Kang et al., 2006).

Os TLR são ativados por diferentes PAMP. Nos humanos são conhecidos 10 tipos de TLR, cada um reconhecendo especificamente um PAMP (Figura 6).

Receptor “toll-like”	Ligante
TLR1; TLR2 heterodímero	Lipomananas (Micobactéria) Lipoproteínas
TLR2; TLR6 heterodímero	Ácidos Lipoteicóicos (Bactéria gram +) B-glucans (parede celular Bactérias e Fungos) Zymosan (Fungos)
TLR 3	RNA dupla fita (vírus)
TLR4	Lipopolissacarídeo (Bactérias gram -)
TLR5	Flagelina (Bactérias)
TLR7	RNA simples fita (vírus)
TLR8	RNA simples fita (vírus)
TLR9	DNA com CpG não-metilados (Bactéria e Herpesvirus)
TLR10	Desconhecido

Figura 6. PAMP (ligantes) para cada um dos 10 tipos de TLR conhecidos nos humanos. Adaptado de Murphy, 2012.

Os TLR são proteínas transmembrana cujo domínio extracelular apresenta uma série de “leucine-rich repeats” (LRR) que formam uma proteína adaptada à ligação com o PAMP. Na porção citoplasmática assemelham-se estruturalmente ao receptor de IL-1, por isso o domínio intracelular dos TLR é conhecido como receptor Toll-IL-1 (TIR) (Kang et al., 2006).

O receptor Toll-IL-1 também é encontrado em proteínas adaptadoras capazes de recrutar quinases e fatores de transcrição. É através da interação física entre o TIR do TLR com as proteínas adaptadoras que ocorre a formação de uma plataforma estrutural na qual outras moléculas sinalizadoras se acoplam para iniciar a cascata (Kang et al., 2006; Sabroe et al., 2008).

As proteínas adaptadoras conhecidas até o momento são cinco (Yamamoto et al, 2003; Kang et al., 2006; Sabroe et al., 2008; Belinda et al, 2008):

- “Myeloid differentiation factor 88” (MyD88)
- “Toll-IL-1 receptor domain-containing adaptor protein” (TIRAP) ou “Myeloid differentiation factor 88 adaptor-like (Mal).
- “Toll-IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing interferon- β ” (TRIF)
- “TRIF-related adaptor molecule” (TRAM)
- “Sterile-alpha and Armadillo motif containing protein” (SARM)

Dependendo da proteína adaptadora que se acopla ao TIR do TLR, existem duas diferentes rotas de transdução (Kang et al., 2006; Sabroe et al., 2008):

- MyD88-dependente: o receptor TIR do TLR acopla-se à proteína adaptadora MyD88, levando à produção de quinases que culminam na ativação do fator nuclear- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) ou p38 “mitogen-activated protein kinases” (MAPKs) que funcionam/ativam fatores de transcrição, levando à ativação de genes pró-inflamatórios.
- MyD88-independente: o receptor TIR do TLR acopla-se à proteínas adaptadoras diferentes da MyD88. Mal/TIRAP e TRIF são responsáveis pela indução via Interferon tipo I; TRAM representa uma ponte para a ativação de TRIF; SARM atua como um adaptador inibitório, regulando a atividade de TRIF.

Sabe-se que diferentes TLR são responsáveis pela ativação de diferentes rotas, o que representa fator crucial para a especificidade da sinalização. Todos os TLR, exceto o TLR 3, ativam a via MyD88-dependente. Da via MyD88-independente TRIF é o adaptador crucial do TLR 3, enquanto Mal/TIRAP, participa da sinalização do TLR 2 e 4. TRAM é utilizado somente pelo TLR 4 (Figura 7) (Sabroe et al., 2008).

Figura 7. Rotas de transdução de sinais com seus respectivos TLR indutores e proteínas adaptadoras. TLR: receptores “toll-like”; MyD88: “Myeloid differentiation factor 88”; TIRAP: “Toll-IL-1 receptor domain-containing adaptor protein”; Mal: “Myeloid differentiation factor 88 adaptor-like”; TRIF: “Toll-IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing interferon-β” ; TRAM: “TRIF-related adaptor molecule”; NF-κβ: Fator nuclear-κβ; IFN I: Interferon tipo I.

3.2.3 Sequência de eventos

Em suma, quando um patógeno consegue adentrar o organismo, alguns mecanismos da imunidade inata começam a agir imediatamente. Essas primeiras defesas incluem várias classes de moléculas pré-formadas solúveis presentes no sangue, fluido extracelular e secreções epiteliais que podem matar microorganismos ou enfraquecê-los, como os peptídeos antimicrobianos (catelicidinas), que promovem a lise de membranas celulares e o sistema complemento que atua através da lise e fagocitose de patógenos por células do sistema imune inato como os macrófagos. A fagocitose leva à destruição do agente mediada em parte por espécies

reativas de nitrogênio, como o óxido nítrico (NO), cuja produção é induzida pela iNOS.

Posteriormente, essas células do sistema imune inato através do reconhecimento de moléculas típicas do microorganismo invasor por receptores “toll-like”, induzem à produção de citocinas, levando a um importante tipo de reação celular base da imunidade inata: a inflamação. Através desta, um conjunto de eventos também culmina no processo de fagocitose.

Somente se um agente estranho consegue vencer essa primeira linha de defesa, os eventos da imunidade adquirida entram em ação, principalmente através da ativação de células dendríticas, que acontece ainda durante os eventos da imunidade inata. É por este motivo que as DC são consideradas “pontes” entre estes dois braços da imunidade.

A partir destes conhecimentos, observou-se que o estudo da imunidade inata na rosácea se beneficiaria da pesquisa de mais componentes participantes deste braço da imunidade, a fim de possibilitar um mapeamento da possível sequência de eventos imunológicos na patogênese desta doença.

4 Material e Métodos

4.1 Seleção da amostra

Foram selecionados dos arquivos do Laboratório de Dermatopatologia da Divisão de Clínica Dermatológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, espécimes de biopsia de doentes com suspeita clínica e/ou histopatológica de rosácea, no período de 2001 a 2008.

Foram consultados os respectivos prontuários médicos, bem como exames laboratoriais e dados de imunofluorescência direta realizadas nestas amostras, a fim de verificar a correlação clínico-patológica e características evolutivas dos doentes, além de excluir o diagnóstico diferencial caracterizado por lesões de lúpus eritematoso.

Após esta seleção, permaneceram no grupo de estudo 28 doentes que preencheram todas as características clínicas, histopatológicas e evolutivas da doença.

Dentre os doentes incluídos no estudo, a média de idade foi de 45,29 anos, sendo sete indivíduos do sexo masculino e 21 do sexo feminino.

4.1.1 Classificação da amostra

Os doentes foram subclassificados de acordo com critérios clínicos e histopatológicos em:

4.1.1.1 De acordo com o subtipo clínico de rosácea

Os casos de rosácea foram divididos em dois grupos de acordo com as lesões predominantes no momento da biopsia: pápulo-pustular (n = 19), se detectada a presença de pústulas e/ou pápulas eritematosas de localização centro-facial, obedecendo os critérios deste subtipo clínico definido pelo “Nacional Rosacea Society’s Expert Committee”; e não pápulo-pustular (n = 7), na presença de outros achados clínicos de rosácea (eritema, telangiectasias, edema, placas, nodulações com acentuação de orifícios foliculares), com exceção das pápulas e pústulas inflamatórias descritas anteriormente. Neste grupo foram incluídos os demais subtipos de rosácea (eritêmato-telangiectásica, fimatosa) e variantes (rosácea granulomatosa) da classificação do “Nacional Rosacea Society’s Expert Committee”, uma vez que a representatividade destes subtipos isoladamente não seria relevante pelo tamanho da amostra estudada. Em dois casos não foi possível levantar as lesões predominantes no momento da biopsia.

4.1.1.2 De acordo com a resposta tecidual

Os espécimes de biopsia foram divididos em dois grupos: rosácea granulomatosa (n = 10) ou rosácea não granulomatosa (n = 18), de acordo com a presença ou não de reação granulomatosa nos espécimes analisados.

As classificação e dados clínicos da amostra encontram-se sumarizadas no Anexo 1, Tabela 5.

4.1.2 Grupo Controle

Para comparação dos resultados, foi utilizado um grupo controle de pele sã representado por 15 (quinze) amostras de pele normal, provenientes de blefaroplastia. Desta forma, os controles foram coletados da mesma localização dos espécimes estudados (face), sofrendo portanto, as mesmas chances de exposição solar. Ademais, a média de idade de pacientes que se submetem a esta cirurgia assemelha-se à dos pacientes estudados.

4.2 Avaliação Histopatológica

Os 28 preparados histológicos de pele embebidos em parafina foram submetidos a cortes histológicos de 4 μm e corados pela hematoxilina-eosina para avaliação histopatológica.

A avaliação histopatológica foi feita de maneira cega, por dois patologistas. Os seguintes critérios foram levados em consideração para o diagnóstico de rosácea:

- Presença de vasos dilatados.
- Presença de elastose solar.
- Presença de hipoplasia de glândulas sebáceas.
- Presença de ácaro.

- Presença de infiltrado inflamatório perivascular e/ou perianexial, contendo linfomononucleares (linfócitos, plasmócitos) e/ou polimorfonucleares neutrófilos.

A presença de granulomas epitelióides foi considerada para a subdivisão entre os grupos RG e RNG.

4.3 Imunoistoquímica

Cortes histológicos de 3 μ m foram colhidos em lâminas histológicas previamente tratadas com o adesivo 3-aminopropyl-triethoxy-silane (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA, código A3648) à 5%, sendo mantidas em estufa a uma temperatura de 50°C durante 12 horas para melhor aderência dos cortes histológicos.

A seguir, os cortes histológicos foram submetidos à desparafinização em dois banhos de xilol a 56°C durante 30 minutos e à temperatura ambiente durante 20 minutos. Posteriormente foram hidratados por cadeia descendente de alcoóis (etanol absoluto, 95% e 70%) e água corrente.

Previamente à incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram submetidas, quando necessário, a tratamento para exposição dos sítios antigênicos.

Os controles negativos foram obtidos através da omissão do anticorpo primário que foi substituído por solução salina tamponada com fosfatos (PBS) pH 7,4.

4.3.1 Demonstração das células dendríticas CD1a+ (Langerhans)

Fez-se inicialmente o bloqueio de peroxidase endógena em câmara escura com seis incubações em peróxido de hidrogênio 3% por 10 minutos cada. Em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada por cinco minutos cada e submersas em PBS pH 7.4.

Procedeu-se a exposição dos sítios antigênicos pelo tratamento dos preparados histológicos com uma solução composta por 180 mL de ácido cítrico 0,1M (Merck, São Paulo, SP, Brasil) e 820 mL de citrato de sódio 0,1M (Merck, São Paulo, SP, Brasil) pH 6,0. Após o preparo da solução, as lâminas foram imersas nesta solução diluída 1:10 em água destilada, e mantidas em banho-maria ajustado para 95-98°C, durante 45 minutos. Após este período, foram mantidas durante 20 minutos à temperatura ambiente e posteriormente lavadas em água destilada.

A seguir o material foi incubado com o anticorpo primário monoclonal anti-CD1a (DakoCytomation, Carpinteria, CA, EUA, código M3571) diluído a 1:100, em uma solução comercial apropriada à diluição de anticorpos - DakoCytomation Antibody Diluent (Dako, Carpinteria, CA, EUA, Código S0809), mantidos em câmara úmida, à temperatura de 2-8°C, por 12 horas.

Procedeu-se a nova lavagem do material com PBS pH 7,4 por duas vezes, por cinco minutos cada, à temperatura ambiente. Após lavagem as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG/IgM (mouse/rabbit) biotinilado (LSAB+system - HRP, DakoCytomation, Carpinteria, CA, EUA, código K0690) pronto para uso, em câmara úmida

durante 45 minutos à temperatura ambiente, seguido de lavagem em PBS, por duas vezes, por cinco minutos cada.

Após nova lavagem em PBS, a reação foi revelada com solução cromógena de diaminobenzidina (3,3' - diaminobenzidine, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA, código D5637) 60 mg diluído em 100 mL de PBS pH 7,4 acrescida de 1 mL de peróxido de hidrogênio 6% ou 2 mL peróxido de hidrogênio 6% por cinco minutos.

Os cortes histológicos foram a seguir lavados em água corrente por 10 minutos, contracolorados com hematoxilina de Harris por 5 minutos, lavados em água corrente, desidratados em etanol e diafanizados em xilol. Fez-se a montagem das lâminas com resina Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, EUA, cód. SP15-100).

Cortes histológicos de pele normal foram utilizados como controles positivos para a reação.

4.3.2 Demonstração das células dendríticas CD123+ (células plasmocitóides)

Para a demonstração das células dendríticas CD123+ procedeu-se a exposição antigênica com a solução "Target Retrieval Solution" (Dako, Carpinteria, CA, EUA, código S170084) em panela a vapor. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito em câmara escura com duas incubações em peróxido de hidrogênio 3% por 10 minutos cada vez e, em seguida, o material foi novamente lavado em água corrente e água destilada por 10

minutos. A seguir foi feito bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido com incubação em solução de leite desnatado (Molico, Nestlé[®], Araçatuba, SP, Brasil) a 10% a 37 °C por 30 minutos para evitar marcações inespecíficas.

A demonstração das PDC foi feita com o anticorpo monoclonal anti-CD123 (receptor alfa de interleucina 3) (eBioscience, San Diego, CA, EUA – clone 6H6), de acordo com Herling et al. (2003).

A seguir, os cortes histológicos foram lavados com PBS pH 7,4 por duas vezes, por 5 minutos cada, à temperatura ambiente. Após lavagem as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG/IgM (mouse/rabbit) “AdvanceTM HRP link” (AdvanceTM system-HRP, DakoCytomation, Carpinteria, CA, EUA, código K4068) pronto para uso em câmara úmida durante 45 minutos à temperatura ambiente, seguido de lavagem em PBS, por 2 vezes, por 5 minutos cada.

Os cortes histológicos foram novamente lavados em PBS e incubados com o polímero marcado com peroxidase (AdvanceTM system-HRP, DakoCytomation, Carpinteria, CA, EUA, código K4068) pronto para uso, durante 30 minutos a 37°C.

Posteriormente fez-se o mesmo procedimento de revelação da reação, contracoloração e montagem das lâminas como descrito para a demonstração de células de Langerhans.

Cortes histológicos de lúpus eritematoso e líquen plano foram utilizados como controles positivos para a reação.

4.3.3 Demonstração dos receptores “Toll-like” 2

Para a demonstração dos receptores “Toll-like” 2, os cortes histológicos foram submetidos a tratamento para exposição dos sítios antigênicos em calor úmido (panela a vapor) no tampão TRIS/EDTA 10mM/1mM pH 9.0, durante 25 minutos após o aquecimento do tampão a 95°C. A seguir, manteve-se o material em repouso à temperatura ambiente por 20 minutos para resfriamento, e a seguir, as lâminas que contém os cortes histológicos foram lavadas em água corrente e água destilada por cinco minutos cada e submersas em PBS pH 7,4. A seguir, foi realizado o bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido com incubação em solução de leite desnatado (Molico, Nestlé®, Araçatuba, SP, Brasil) a 10% durante 30 minutos à temperatura ambiente.

Procedeu-se a incubação do material com o anticorpo primário monoclonal anti-TLR-2 (Santa Cruz Biotechnology®, Inc., Santa Cruz, CA, EUA, código SC-10739) diluído a 1:50 em soroalbumina bovina (BSA) fração V (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA, código A4503) à 1% acrescida de azida sódica 0,1% em PBS pH 7.4, por 12 horas a 4°C.

Após o procedimento de lavagem dos cortes histológicos por duas vezes em PBS pH 7,4 durante cinco minutos cada, foi realizada a incubação com o anticorpo secundário anti-IgG/IgM (mouse/rabbit) (EnVision™ G2 system-AP, DakoCytomation, Carpinteria, CA, EUA, código K5355) pronto para uso durante 30 minutos a 37°C.

A seguir, as lâminas foram lavadas em PBS pH 7.4, por duas vezes, durante cinco minutos cada e incubadas com o polímero marcado com fosfatase alcalina (EnVision™ G2 system-AP, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, código K5355) pronto para uso em câmara úmida durante 30 minutos a 37°C.

A reação foi visualizada através do cromógeno "Permanent Red" (DAKO, Carpinteria, CA, EUA, código K0640) 0,13% acrescido de 40 µL de levamisole (Dako, Carpinteria, CA, EUA, código X3021) para bloqueio da fosfatase alcalina endógena.

Procedeu-se, a seguir, à lavagem em água corrente por cinco minutos, contracoloração do material histológico com Hematoxilina de Harris por 10 segundos. A seguir, foi feita a lavagem em água corrente, e secagem à temperatura ambiente e posterior montagem das lâminas como o descrito para os outros marcadores.

Cortes histológicos de pele normal foram utilizados como controles positivos para a reação.

4.3.4 Demonstração dos receptores "Toll-like" 4

O bloqueio de peroxidase endógena, usado nas reações para marcação com o anticorpo anti-TLR4 foi feito em câmara escura com seis incubações em peróxido de hidrogênio 3% por 10 minutos cada. Em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada por cinco minutos cada, e submersas em PBS pH 7.4. A seguir fez-se o mesmo

procedimento para exposição de sítios antigênicos e bloqueio de reações inespecíficas como o descrito para o TLR 2.

Procedeu-se a incubação do material com o anticorpo primário monoclonal anti-TLR-4 (HTA125, eBioscience – San Diego, CA, EUA) diluído a 1:50 em BSA fração V (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA, código A4503) à 1% acrescida de azida sódica 0,1% em tampão PBS pH 7.4, por 12 horas a 4°C.

Após o procedimento de lavagem dos cortes histológicos por duas vezes em PBS pH 7,4 durante cinco minutos cada, foi realizada a incubação com o anticorpo secundário e demais procedimentos como o descrito para a demonstração de células de Langerhans.

Cortes histológicos de pele normal foram utilizados como controles positivos para a reação.

4.3.5 Demonstração da expressão da forma induzida da enzima óxido nítrico sintase

Para a demonstração da expressão de iNOS os preparados foram submetidos a bloqueio das reações inespecíficas através da incubação com leite desnatado 10% (Molico, Nestlé[®], Araçatuba, SP, Brasil) em água destilada por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente foram incubados, sem a necessidade de recuperação antigênica prévia, com o anticorpo primário anti-iNOS, policlonal obtido em coelho (Calbiochem-Novabiochem Corp., San Diego, CA, EUA, código 482728) na diluição de

1:500 em PBS 0,01 M pH 7,4 acrescido de 1% BSA, em câmara úmida, de 2-8°C durante 12 horas.

Após a lavagem os preparados foram incubados durante 30 minutos à temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti-IgG/IgM conjugado com um polímero de fosfatase alcalina (EnVision™ G2-PA, Coelho/Camundongo, Dako Carpinteria, CA, EUA, código 1396). Os sítios de reação foram visualizados através do cromógeno Permanent Red (Dako, Carpinteria, CA, EUA, código K0640) 0,13% acrescido de 40 µL de levamisol (Dako, Carpinteria, CA, EUA, código X3021) para bloqueio da fosfatase alcalina endógena.

Os cortes histológicos foram, a seguir, lavados em água corrente por 30 minutos, contracorados levemente com Hematoxilina de Carazzi por 10 segundos. A seguir foram lavados em água corrente, e secos em ar ambiente. Fez-se a montagem das lâminas como o descrito acima para os outros marcadores.

Cortes histológicos de espécimes de leishmaniose cutânea foram utilizados como controle positivo da reação.

4.4 Análise Morfométrica

Para a análise de todos os marcadores, imagens digitais foram obtidas utilizando-se o microscópio óptico Eclipse 400 (Nikon, Japan), capturadas por câmera digital Nikon modelo DS-Fi1, Nikon Corporation,

através do software NIS-Elements (Nikon, Japan). As imagens foram analisadas por meio do “software” de imagens (Image-Pro Plus 4.5.0.29).

Campos microscópicos com dobras ou com destruição tecidual importante foram excluídos da análise em todas as amostras.

4.4.1 Análise da expressão epidérmica de células dendríticas CD1a+ (Langerhans)

A quantificação da expressão das células dendríticas CD1a+ (Langerhans) na epiderme dos espécimes estudados foi realizada através da determinação de fração de área (FA) ocupada pela imunomarcação com os anticorpos específicos. Foram obtidas imagens microscópicas consecutivas e não coincidentes, de 640x480 pixels com aumento de 200x representativas de toda a epiderme. A positividade do anticorpo foi representada pelas áreas marcadas em marron. Para a análise da fração de área imunomarcada, foram selecionadas somente a epiderme e anexos cutâneos. A fração de área foi determinada a partir da contagem automática de pixels imunomarcados (selecionados manualmente pelo usuário do sistema) por cada campo de epiderme. A partir dos valores de fração de área obtidos de todos os campos, foi calculada a média aritmética ponderada que representou a média de fração de área de epiderme ocupada pela expressão de células dendríticas (Anexo 4).

4.4.2 Análise da presença de células dendríticas plasmocitóides

A demonstração da presença de células dendríticas CD123+ (PDC), foi realizada através da contagem manual do número de células imunomarcadas com o anticorpo específico. Foram obtidas imagens microscópicas consecutivas e não coincidentes, de 640x480 pixels com aumento de 400x até um total de 15 a 20 campos. A positividade do anticorpo foi representada pelas células marcadas em marrom. Para esta contagem, foi selecionada somente a derme, tendo sido excluídas a epiderme e os anexos cutâneos. Foi realizada a contagem do número de células em cada campo e calculada a média aritmética ponderada que representou a média de número de PDC presentes na derme (Anexo 5). As células endoteliais, que também expressam o antígeno CD123, foram excluídas da análise quantitativa.

4.4.3 Análise da expressão de receptores “toll-like” 2, 4 e da forma induzida da enzima óxido nítrico sintase

A quantificação da expressão de TLR 2, TLR 4 e iNOS nos espécimes estudados foi realizada através da determinação de fração de área (FA) ocupada pela imunomarcagem com os anticorpos específicos. Foram obtidas imagens microscópicas consecutivas e não coincidentes, de 640x480 pixels com aumento de 200x representativas de todo o campo. A fração de área foi determinada a partir da contagem automática de pixels

imunomarcados (selecionados manualmente pelo usuário do sistema) por cada campo do espécime. A partir dos valores de fração de área obtidos de todos os campos, foi calculada a média aritmética ponderada que representou a média de fração de área do espécime ocupada pela expressão de TLR 2, TLR 4 e iNOS (Anexo 6).

4.5 Análise Estatística

A análise estatística dos dados e construção dos respectivos gráficos foi realizada através do software Graph Pad Prisma (Sigma, St. Louis, MO, EUA) versão 3.1. A comparação dos resultados foi feita através de teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis e Dunn (para comparação de três grupos) e de Mann-Whitney (para comparação de dois grupos). O nível de significância foi estabelecido em 5%.

Os parâmetros estudados estão elencados abaixo. Para cada um destes houve comparação entre os casos de rosácea e o grupo controle. Em se tratando dos casos de rosácea foi realizada ainda comparação entre os grupos RG x RNG e PP x NPP.

- Fração de área epidérmica ocupada por células dendríticas CD1a+;
- Número de células CD123+ presentes na derme;
- Expressão de TLR2, TLR4 e iNOS nos espécimes, incluindo epiderme e derme.

4.6 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 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 15.04.2009, sob o protocolo de pesquisa número 0122/09 (Anexo 7).

5.1 Caracterização da amostra

O Anexo 1, tabela 5, sumariza os dados demográficos, exames complementares, subclassificação clínica e histopatológica dos doentes que compõem a casuística de estudo.

5.1.1 Dados Clínicos

De acordo com os subtipos clínicos, dos 28 casos de rosácea selecionados para o estudo dezenove (67,86%) foram classificados como o subtipo pápulo-pustular (PP) (Figura 8) e sete (25%) como o subtipo não pápulo-pustular (NPP) (Figura 9). Os dois casos de rosácea para os quais não foi possível levantar as lesões predominantes no momento da biopsia foram classificados como subtipo clínico desconhecido (Gráfico 1).

Figura 8. Subtipo clínico Pápulo-pustular (doentes correspondentes aos casos 18, 23, 16, 20). Pápulas e pústulas acompanhadas de eritema em porções centrais da face.

Figura 9. Subtipo clínico Não pápulo-pustular (doentes correspondentes aos casos 22, 7, 17). Lesões de rosácea diferentes de pápulas e pústulas: eritema, telangiectasias, infiltração, acentuação dos ólios foliculares.

Gráfico 1. Distribuição da amostra segundo o subtipo clínico de rosácea.

Os gráficos a seguir (2 a 4) demonstram a distribuição da amostra de pacientes segundo a faixa etária, sexo e etnia.

Gráfico 2. Rosácea. Distribuição da amostra segundo a faixa etária dos pacientes.

Gráfico 3. Rosácea. Distribuição da amostra segundo o sexo.

Gráfico 4. Rosácea. Distribuição da amostra segundo a etnia.

Dependendo da necessidade clínica e/ou histopatológica de diagnóstico diferencial com lúpus eritematoso (LE), alguns pacientes da amostra foram submetidos à realização de exames de sangue para pesquisa do fator anti-nuclear (FAN) e/ou suas biopsias foram submetidas à imunofluorescência direta (IFD). Em todos os casos analisados ($n = 15$) estes exames resultaram negativos (Gráfico 5).

Gráfico 5. Rosácea. Distribuição da amostra segundo a realização ou não de exames complementares para diagnóstico diferencial com LE.

5.1.2 Características Histopatológicas

A análise histopatológica baseou-se na presença ou ausência de cada um dos critérios pré-selecionados que foram utilizados para subsidiar o diagnóstico histopatológico de rosácea (Figuras 10 e 11). O gráfico 6 demonstra a frequência de positividade encontrada para cada critério, considerando o total de casos de rosácea (n=28). O Anexo 2, Tabela 6, sumariza os parâmetros obtidos na análise morfológica das 28 amostras teciduais estudadas.

Gráfico 6. Rosácea. Frequência de achados morfológicos positivos por critério morfológico avaliado nos 28 casos estudados. VD: vasos dilatados; ES: Elastose Solar; HGS: Hiperplasia de Glândulas Sebáceas; AC: Ácaro; IIPV: Infiltrado Inflamatório Perivascular; IIPF: Infiltrado Inflamatório Perifolicular; LMN: Linfomononucleares no infiltrado; PMN: Polimorfonucleares no infiltrado; GE: Granulomas/Esboços granulomatosos;

Figura 10. Achados morfológicos dos casos de Rosácea. Vasos dilatados (A); Elastose Solar (B); Hiperplasia da Glândula Sebácea (C); Ácaro (D); Infiltrado Perifolicular (E); Presença de polimorfonucleares no infiltrado inflamatório (F). Coloração pela Hematoxilina-Eosina.

Figura 11. Achados morfológicos dos casos de Rosácea. Presença de granulomas no infiltrado inflamatório (A-D). Coloração pela Hematoxilina-eosina.

A presença de granulomas epitelióides foi considerada para a subdivisão entre os grupos RG e RNG. De acordo com este critério, 10 (36%) foram classificados como Rosácea Granulomatosa (RG) e 18 (64%) como Rosácea Não Granulomatosa (RNG) (Gráfico 7).

Gráfico 7. Rosácea. Distribuição da amostra por Subtipo Histopatológico.

A análise dos critérios morfológicos foi realizada também de forma separada entre os grupos RG e RNG e comparada com o total de casos de cada um dos grupos (RG=10 e RNG=18) com o intuito de avaliar a frequência do critério nos diferentes subtipos histológicos. Observou-se que a presença de vasos dilatados, elastose solar, ácaro e infiltrado perifolicular foi semelhante nos dois grupos. Notou-se entretanto, que a hiperplasia de glândulas sebáceas foi ausente no grupo RG, e a presença de polimorfonucleares no infiltrado inflamatório foi ligeiramente maior neste mesmo grupo (Tabela 3).

Tabela 3. Rosácea. Frequência de achados morfológicos por subtipo histopatológico

Resposta Tecidual	Vasos dilatados	Elastose Solar	Hiperplasia de Glândula Sebácea	Ácaro	Infiltrado Inflamatório perifolicular	Polimorfonu-cleares neutrófilos
RG	80,0%	20,0%	0,0%	10,0%	100,0%	50,0%
RNG	83,3%	11,1%	16,7%	16,7%	94,4%	33,3%

O mesmo foi feito considerando-se os subtipos clínicos de rosácea, onde a análise dos critérios morfológicos foi realizada de forma separada entre os grupos PP e NPP e comparada com o total de casos de cada um dos grupos (PP=19 e NPP=7). Observou-se que a presença de polimorfonucleares foi maior no subtipo clínico PP (Tabela 4).

Tabela 4. Rosácea. Frequência de achados histopatológicos por subtipo clínico

Subtipo Clínico	Vasos dilatados	Elastose Solar	Hiperplasia de Glândula Sebácea	Ácaro	Infiltrado Inflamatório perifolicular	Polimorfonu-cleares neutrófilos
NPP	100,0%	28,6%	14,3%	14,3%	100,0%	28,6%
PP	78,9%	10,5%	10,5%	15,8%	94,7%	42,1%

Foi realizada ainda a correlação entre os subtipos clínicos e histopatológicos dos 28 casos da amostra que demonstrou predominância do subtipo PP tanto no grupo RG (70%), quanto no grupo RNG (66,7%). (Gráfico 8).

Gráfico 8. Rosácea. Correlação entre os Subtipos Clínicos e Histopatológicos da amostra.

5.2 Avaliação dos dados de Imunoistoquímica

5.2.1 Demonstração e quantificação de células de Langerhans (CD1a+)

Nos segmentos de epiderme dos espécimes estudados (casos e controles), as células dendríticas epidérmicas CD1a+ (Células de Langerhans), distribuíram-se por entre os queratinócitos na camada espinhosa da epiderme e bainha epitelial de folículos pilosos. Entretanto, nos espécimes de rosácea estas células ocuparam uma menor fração de área quando comparadas com o grupo controle ($p=0,001$ – Teste de Mann-Whitney) (Figura 12, Gráfico 9).

Figura 12. Células de Langerhans (células epidérmicas CD1a+) apresentando diferentes distribuições em lesões de rosácea (A e B) e grupo controle (C e D). Notar a menor fração de área com expressão de CD1a+ na epiderme e epitélio folicular das lesões de rosácea quando comparada ao grupo controle. (Anticorpo monoclonal anti-CD1a com sistema de revelação “LSAB+system – HRP” e solução cromógena de diaminobenzidina).

Gráfico 9. Fração de área epidérmica com expressão de CD1a (células de Langerhans). Comparação entre os grupos Rosácea e Controle. Teste estatístico de Mann-Whitney.

A comparação entre os três grupos (RNG x RG x Controle), também mostrou diferença significativa ($p=0,0013$ – Teste Kruskal-Wallis). No entanto, quando comparada a fração de área epidérmica ocupada pelas células dendríticas CD1a+ entre os dois subtipos histológicos estudados, observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,0524$ - Teste de Mann-Whitney; $p>0,05$ – Teste de Dunn).

5.2.2 Demonstração e quantificação das células dendríticas plasmocitóides (CD123+)

Em todos os casos de rosácea estudados observou-se a presença de células dendríticas dérmicas marcadas com o anticorpo CD123+ (Células dendríticas plasmocitóides – PDC). Estas células mostraram-se distribuídas pelo infiltrado dérmico perivascular de forma isolada ou agrupada, bem como em meio aos granulomas (Figura 13). No grupo controle somente as células endoteliais foram marcadas pelo anticorpo CD123 (controle interno positivo da reação).

Figura 13. Células Plasmocitóides (células dendríticas CD123+) de localização perivascular, isoladas (A e B), agrupadas (C e D), ou permeando granulomas (E e F). Presença de marcação das células endoteliais (controle interno da reação). (Anticorpo monoclonal anti-CD123 com sistema de revelação “AdvanceTM HRP link” e solução cromógena de diaminobenzidina).

Não foi observada diferença estatisticamente significativa do número de células dendríticas plasmocitoides quando comparados os subtipos histológicos (RG e RNG) de rosácea ($p=0,0617$ – Teste de Mann-Whitney). Entre os subtipos clínicos, no entanto, houve predominância quantitativa de PDC no subtipo PP ($p=0,0078$ – Teste de Mann-Whitney) (Gráfico 10).

Gráfico 10. Células dendríticas plasmocitoides na resposta tecidual da rosácea. Comparação entre os grupos pápulo-pustular (PP) e não pápulo-pustular (NPP). Teste estatístico de Mann-Whitney.

5.2.3 Demonstração e quantificação do receptor Toll-Like 2 (TLR 2)

A expressão de TLR 2 na epiderme e anexos cutâneos foi encontrada em todos os espécimes estudados, variando apenas na

intensidade da marcação. Esta expressão foi mais acentuada nos queratinócitos das camadas epidérmicas mais superficiais (Figura 14 A-D). O detalhe (Figura 14 B) mostra o padrão perinuclear de marcação. Na derme observou-se a expressão de TLR 2 apenas nos locais de infiltrado inflamatório, incluindo os esboços granulomatosos (Figura 14 C-D).

Figura 14. Expressão de TLR 2 em biopsias de rosácea mostrando padrão preferencialmente perinuclear (B); na epiderme superior (A-D), anexos cutâneos (B-C), e no infiltrado inflamatório dérmico (C-D) (Anticorpo monoclonal anti-TLR2 com sistema de revelação EnVision™ G2-fosfatase alcalina e cromógeno “Permanent red”).

No grupo controle de pele normal observou-se expressão discreta de TLR 2 na epiderme, anexos cutâneos e derme em alguns espécimes, obedecendo um padrão pontilhado fino (Figura 15).

Figura 15. Expressão de TLR 2 nos controles de pele normal. Expressão discreta tipo pontilhado fino na epiderme, anexos e derme (A-D) (Anticorpo monoclonal anti-TLR2 com sistema de revelação EnVision™ G2-fosfatase alcalina e cromógeno “Permanent red”).

A expressão de TLR 2, epidérmica e dérmica, medida pela fração de área positiva nos espécimes estudados, não diferiu quando comparados os grupos RG e RNG ($p=0,5813$ – Teste de Mann-Whitney; $p>0,05$ – Teste de Dunn). No entanto, foi observada diferença estatisticamente significativa quando comparados os grupos rosácea e controle de pele normal ($p=0,0003$

– Teste Mann-Whitney). Quando comparados os três grupos, o resultado foi semelhante demonstrando diferença entre os casos de rosácea (grupos RG x RNG) e controles de pele normal ($P = 0,0012$ – Teste de Kruskal-Wallis) (Gráfico 11).

Gráfico 11. Fração de área de TLR 2 nos espécimes estudados. Comparação entre os grupos rosácea granulomatosa (RG), rosácea não granulomatosa (RNG) e Controle. Teste estatístico de Kruskal-Wallis.

5.2.4 Demonstração e quantificação do receptor Toll-Like 4 (TLR 4)

A epiderme e os anexos cutâneos apresentaram expressão intensa de TLR 4 em todos os casos de rosácea. Diferentemente do que foi observado para o TLR 2, não houve acentuação de expressão em determinadas camadas da epiderme, tendo sido a marcação praticamente homogênea nos queratinócitos (Figura 16). O padrão perinuclear também foi observado no TLR 4 apresentando marcação mais intensa nesta área, porém menor intensidade de cor estendeu-se também ao restante do citoplasma (Figura 16 B). Assim como no TLR 2, na derme a expressão de TLR 4 foi encontrada nos locais de infiltrado inflamatório e esboços granulomatosos (Figura 16 C-D).

Figura 16. Biopsias de rosácea demonstrado expressão de TLR 4 em todas as camadas da epiderme (A-B), com marcação mais intensa perinuclear e menos intensa na periferia do citoplasma (B); nos anexos cutâneos (C-D) e no infiltrado inflamatório dérmico granulomatoso (D) (Anticorpo monoclonal anti-TLR4 com o sistema de revelação “LSAB+system – HRP” e solução cromógena de diaminobenzidina).

A expressão de TLR 4 no grupo controle de pele normal foi praticamente nula em 14 do total de 15 controles estudados, tanto na epiderme e anexos quanto na derme (Figura 17 A-C). Apenas um controle apresentou discreta expressão de TLR 4, porém com distribuição

assimétrica (focos mais e outros menos marcados) e de marcação menos intensa quando comparada aos casos de rosácea (Figura 17 D).

Figura 17. Expressão de TLR 4 na epiderme e derme dos controles de pele normal. Ausência de expressão na maioria dos controles (A-C) e discreta marcação não uniforme em apenas um (D). (Anticorpo monoclonal anti-CDTLR4 com o sistema de revelação “LSAB+system – HRP” e solução cromógena de diaminobenzidina).

Quando avaliada a expressão epidérmica e dérmica de TLR 4 nos espécimes estudados (casos e controles), foi observado que as biopsias de lesões cutâneas de rosácea, apesar de não apresentarem diferença estatisticamente significativa entre os grupos RG e RNG ($p > 0,05$ – Teste de

Dunn), mostraram uma fração de área positiva consideravelmente superior quando comparada ao grupo controle de pele normal ($p < 0,0001$) tanto na comparação entre dois grupos (rosácea x controle – Teste Mann-Whitney), quando comparados os três grupos (Gráfico 12).

Gráfico 12. Fração de área de TLR 4 nos espécimes estudados. Comparação entre os grupos rosácea granulomatosa (RG), rosácea não granulomatosa (RNG) e Controle. Teste estatístico de Kruskal-Wallis.

5.2.5 Demonstração e quantificação da expressão da forma induzida da enzima óxido nítrico sintase (iNOS)

Em se tratando da expressão de iNOS, observou-se que todos os casos de rosácea apresentaram algum tipo de marcação. Na epiderme e anexos cutâneos esta expressão variou desde casos com maior expressão nos queratinócitos das camadas epidérmicas mais superficiais (Figura 18 A), até casos com marcação de quase toda ou toda a espessura da epiderme (Figura 18 B-C). Com relação à intensidade da cor observou-se imunomarcação acentuada, com vermelho bastante intenso em alguns espécimes (Figura 18 D). Na derme a expressão de iNOS apresentou-se de forma difusa entremeando o infiltrado inflamatório (Figura 18 D), bem como em algumas células deste infiltrado.

Figura 18. Expressão de iNOS na epiderme e derme dos casos de rosácea estudados. Observar a distribuição variando das camadas superficiais a toda a espessura da epiderme e anexos (A-E). Expressão difusa em meio ao infiltrado inflamatório na derme (F) (Anticorpo policlonal anti-iNOS produzido em coelho com sistema de revelação EnVision™ G2-fosfatase alcalina e cromógeno "Permanent red").

No grupo controle de pele normal a expressão de iNOS variou de praticamente nula a expressão não homogênea, de intensidade fraca e geralmente restrita aos queratinócitos adjacentes à camada córnea (epiderme) ou à bainha do folículo piloso (Figura 19 A–D). Na derme, observou-se raros casos com expressão pouco intensa e esparsa.

Figura 19. Expressão de iNOS na epiderme e derme dos controles de pele normal. Expressão praticamente ausente a discreta (A-D) (Anticorpo policlonal anti-iNOS produzido em coelho com sistema de revelação EnVision™ G2-fosfatase alcalina e cromógeno “Permanent red”).

Com relação à expressão de iNOS, as biopsias de lesões cutâneas de rosácea também não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos RG e RNG ($p > 0,05$ – Teste de Dunn). De forma semelhante ao observado com o TLR 2 e TLR 4, houve diferença quando comparados os grupos rosácea e controle de pele normal ($p = 0,0007$ – Teste Mann-Whitney) e os três grupos ($p = 0,0014$ – Teste de Kruskal-Wallis) (Gráfico 13).

Gráfico 13. Fração de área de iNOS nos espécimes estudados. Comparação entre os grupos Rosácea Granulomatosa (RG), Rosácea não granulomatosa (RNG) e Controle. Teste estatístico de Kruskal-Wallis.

Excetuando-se a contagem de PDC, não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados os subtipos clínicos (PP e NPP) nos demais marcadores estudados (CD1a, TLR 2 e 4, iNOS).

O Anexo 3, tabela 7, sumariza os dados estatísticos da análise imunoistoquímica realizada nos diferentes subtipos clínicos e histopatológicos dos casos de rosácea em estudo e grupo controle.

A rosácea é uma doença cutânea crônica de etiologia desconhecida, apresentando-se com frequência relativamente baixa (2-10%). Entretanto, constitui causa de insatisfação e baixa auto-estima por configurar agravo estético na região da face. Por este motivo, a busca por um tratamento curativo tem estimulado várias pesquisas visando entender melhor a etiopatogenia da doença (Crawford et al., 2004; Berth-Jones J, 2010; Aksoy et al., 2010). O envolvimento da imunidade inata foi introduzido recentemente no arsenal de estudos com este objetivo.

Nesta linha de pesquisa, o presente estudo compreendeu a análise de 28 biópsias de pele de doentes da Divisão de Clínica Dermatológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina USP, em um período de 07 anos, que apresentavam diagnóstico clínico, histopatológico e evolutivo de rosácea, com a finalidade de constatar nos espécimes estudados, através da técnica de imunoistoquímica, a presença de cinco marcadores que representam elementos participantes da imunidade inata (CD1a – marcador de células de Langerhans, CD123 – marcador de PDC, TLR 2, TLR 4 e iNOS).

Observamos diferenças de expressão dos elementos da imunidade inata estudados entre os casos de rosácea e controles de pele normal.

Quando comparados os casos de rosácea de acordo com os subtipos clínicos (pápulo-pustular e não pápulo-pustular) encontramos diferença somente na densidade de PDC, sendo esta maior no grupo PP. Não houve diferença entre os dois tipos de resposta tecidual da rosácea (granulomatosa

e não granulomatosa) para os elementos da resposta imune inata analisados.

As células de Langerhans estão diminuídas em número nas lesões de rosácea.

A expressão da molécula CD1a foi avaliada no intuito de observar o comportamento das células dendríticas epidérmicas (células de Langerhans). Observou-se que, nas lesões de rosácea, estas células mostraram-se diminuídas em número (menor fração de área CD1a+ na epiderme e epitélio de folículos pilosos) quando comparadas com as do grupo controle.

Sabe-se que tanto a fotoexposição quanto microorganismos têm sido implicados como participantes da etiopatogenia da rosácea (Yamasaki e Gallo, 2009; Bae et al., 2009). Podemos relacionar a diminuição da população epidérmica de células de Langerhans observada nas lesões de rosácea deste estudo com a participação de um ou de ambos os fatores (radiação ultra-violeta e microorganismos). A exposição à radiação ultra-violeta B levaria ao aumento de moléculas citoprotetoras chamadas “heat-shock proteins” (HSP). Algumas destas HSP podem ligar-se a receptores “toll-like” 2 e 4 presentes nas células de Langerhans, culminando na apoptose destas células ou na sua migração para linfonodos regionais, o que ocasionaria a diminuição de sua densidade na epiderme que caracteriza a pele fotoexposta (Figura 20) (Kang et al., 2006).

Figura 20. Radiação UV aumenta produção de HSP (1, 2), que ligam-se ao TLR 2 e 4 nos queratinócitos e CL (3), que ativa Toll/IL-1 (4), levando à produção de IL-10 e TNF-α (5). HSP: “heat-shock protein”; KC: queratinócito; LC: células de Langerhans; TLR 2/4: toll-like receptor 2 e 4; IL-10: interleucina 10; TNF-α: fator de necrose tumoral alfa. Adaptado de Kang et al., 2006.

Ressaltamos que provavelmente a diminuição das CL demonstrada no presente estudo não deva ser decorrente somente da foto-exposição, uma vez que o grupo controle é composto de pele normal de área igualmente foto-exposta.

As células de Langerhans são células dendríticas imaturas residentes na epiderme. A presença de produtos constituintes de microorganismos, induzem sua ativação através da ligação com receptores “toll-like”. As células de Langerhans, assim ativadas migram para linfonodos regionais onde adquirem a habilidade de estimular linfócitos T. Desse modo, ocorre uma diminuição na população de células de Langerhans da epiderme

(Merad et al., 2008; Murphy, 2012). Provavelmente este mecanismo também contribua para a depleção de CL nas lesões de rosácea, decorrente da participação dos possíveis agentes microbianos envolvidos em sua patogenia (Kolibásová et al., 1996; Bamford et al., 1999; Rojo-García et al., 2000; Diaz et al., 2003; Hernando-Harder, 2009; Zhao et al., 2010; Tüzün et al., 2010; Elston, 2010).

Células dendríticas plasmocitóides participam da resposta tecidual da rosácea.

O CD123 foi utilizado como marcador da presença de células dendríticas plasmocitóides, as quais foram encontradas em todos os espécimes de rosácea estudados, não tendo sido observadas nos controles de pele normal.

A presença de células dendríticas plasmocitóides em doenças inflamatórias cutâneas foi descrita em diversos estudos (Farkas et al., 2001; Jahnsen et al., 2002; Wollenberg et al., 2002; Robak et al., 2004; McNiff e Kaplan, 2008; Vermi et al., 2009; Tomasini et al., 2010) porém, não havia sido previamente demonstrada em lesões de rosácea.

Embora as PDC tenham sido observadas nessas doenças inflamatórias da pele, há relatos da ausência de células plasmocitóides nas lesões cutâneas da erupção polimorfa à luz (Wackernage et al., 2007). Desse modo, podemos dizer que nem todas as doenças inflamatórias cutâneas envolvem mecanismos patogênicos associados a estas células e

consequentemente à imunidade inata, o que reforça a importância da detecção de células plasmocitóides nas lesões de rosácea aqui estudadas.

As células dendríticas plasmocitóides e o interferon alfa por elas produzido são importantes iniciadores do processo patológico na psoríase (Nestle et al., 2005). Nessa doença, a produção de interferon alfa pelas PDC deve-se à conversão do DNA em um “sinal de perigo” induzida por catelicidinas (LL-37) que se ligam ao DNA para formar indutores da produção de interferon alfa por essas células (Lande et al., 2007), como exposto na figura 21.

Figura 21. Interrelação catelicidinas–células plasmocitóides na psoríase descrita por Lande et al. (2007). hCAP18: forma inativa da catelicidina; LL-37: 37-amino acid peptide (forma ativa da catelicidina); TLR 9: toll-like receptor 9; IFN- α : interferon alfa.

A idéia de uma imunidade inata alterada na patogênese da rosácea, surgiu a partir da detecção de altos níveis de peptídeos antimicrobianos do tipo catelicidinas (na sua forma peptídica ativa LL-37, o “37-amino acid

peptide”) e calicreína 5 (enzima que cliva a catelicidina em suas formas ativas, incluindo LL-37) nos sítios de lesão da doença (Yamasaki et al., 2007). Relacionando estes dados com os achados de Lande et al. (2007) na psoríase, podemos postular que o aumento de catelicidinas encontrado nas lesões de rosácea possa desempenhar papel crucial na atividade das PDC que demonstramos, de modo inédito, nos sítios de lesão desta doença. Se uma quebra de tolerância ao DNA levando a produção de interferon alfa e culminando na ativação da imunidade adquirida, como o proposto para a psoríase (Lande et al., 2007) estiver presente na rosácea, será um aspecto interessante a ser investigado posteriormente.

O papel de microorganismos como participantes da etiopatogenia da rosácea vêm sendo muito discutido, especialmente *Demodex folliculorum* e *Helicobacter pylori*, porém com resultados conflitantes. Esses microorganismos teriam o papel de coadjuvantes no desencadeamento da imunidade inata na rosácea através da ativação de receptores “toll-like” (Yamasaki e Gallo, 2009). Microorganismos (virus, bactérias) são indutores da produção de interferon alfa por células plasmocitóides (Bene et al., 2003), assim como da diferenciação destas em células dendríticas CD11c(+) (Serbina et al., 2003). Embasados nessas observações podemos especular que esses microorganismos, relacionados à etiopatogenia da rosácea, poderiam ser responsáveis pela indução do afluxo das PDC nos sítios de lesão dessa doença.

Embora os fatores desencadeadores do aporte de células dendríticas plasmocitóides às lesões de rosácea, e o mecanismo de atuação

destas células na patogênese da doença permaneçam apenas especulações, este estudo demonstrou, pela primeira vez, a presença dessas células nas lesões de rosácea, configurando um novo elemento da imunidade inata participando do processo patogênico.

Ocorre maior expressão de receptores “toll-like” 2 e 4 nas lesões de rosácea quando comparadas com a pele controle.

Demonstramos haver maior expressão de receptores “toll-like” 2 e 4 nas lesões de rosácea quando comparadas à pele controle. A maior expressão desses receptores poderia intensificar os mecanismos acima descritos induzindo a diminuição das células de Langerhans nas lesões de rosácea.

As nossas observações quanto à maior expressão de TLR 2 nas lesões de rosácea são concordantes com os de Yamasaki et al. (2011). Esses autores relacionaram o aumento da expressão de TLR 2 com a maior produção de calicreína 5. Esta enzima é a responsável por clivar as catelicidinas em seus peptídeos ativos, incluindo o LL-37, cuja produção, segundo esses autores, está aumentado na rosácea. Desse modo, como o proposto na psoríase (Lande et al., 2007), a maior expressão de TLR 2 nas lesões de rosácea justificariam o afluxo de PDC por nós demonstrado nos sítios de lesão.

Sabe-se que o TLR 2 reconhece vários componentes da parede celular de bactérias como peptidoglicanos de bactérias gram-positivas, lipoproteínas do *Mycobacterium tuberculosis*, ácidos lipotecóicos e certos

componentes da parede de fungos (Manicassamy e Puledran, 2009). Antígenos de *Bacillus oleronius* isolados de *Demodex folliculorum* presentes nas lesões de rosácea, são capazes de estimular a proliferação de células mononucleares do sangue periférico dos pacientes (Lacey et al., 2007). Essas proteínas antigênicas compreendem uma lipoproteína e “heat-shock proteins”, ambas conhecidamente estimuladoras de TLR 2 (Yamasaki e Gallo, 2009). Essas observações favorecem a hipótese da participação de microorganismos na etiopatogenia da rosácea, através da atuação de TLR 2 e, portanto, podem justificar o aumento da expressão desse elemento da imunidade inata nos sítios de lesão da rosácea.

A radiação ultra-violeta, outro fator desencador ou de piora das lesões de rosácea foi associado ao aumento da expressão de “heat-shock proteins” pelos queratinócitos que, ligando-se a TLR 2 e 4, conduzem à ativação do complexo “Toll/IL-1” com consequente produção de interleucina 10 (IL-10) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Kang et al., 2006). Yamasaki et al. (2011) também observaram um aumento de TNF- α na pele de pacientes de rosácea quando comparado aos controles de pele normal. Desse modo, além de fatores relacionados a possíveis agentes infecciosos, a exposição crônica à radiação ultra-violeta também envolve a participação de TLR 2 e 4 na patogenia da rosácea.

Portanto, ambos os fatores elicitados (microorganismos e radiação ultra-violeta) podem ser considerados para explicar a maior expressão de TLR 2 encontrada no nosso estudo.

O TLR 4 foi também estudado na rosácea por Yamasaki et al. (2011) num protocolo onde foram avaliadas apenas 11 biopsias de pele da região naso-malar de pacientes com rosácea e 8 biopsias de localização semelhante de controles de pele normal. Foi neste mesmo estudo que os autores observaram o aumento de TLR 2 e TNF- α descritos anteriormente. No entanto, esses autores, não encontraram expressão aumentada de TLR 4 na pele de rosácea. Este achado contrasta com a expressão aumentada de TLR 4 encontrada no nosso estudo que compreendeu 28 espécimes de pele de rosácea.

Vários fatores podem ter influenciado nesses resultados conflitantes, entre os quais destacamos o número de pacientes estudados, a técnica utilizada em cada estudo, o local ou o tipo de lesão biopsiada, bem como o fator desencadeante do aumento da expressão de TLR 4 na rosácea que, mesmo desconhecido, poderia estar presente somente nos pacientes do nosso estudo, uma vez que os doentes dos dois estudos são provenientes de áreas geográficas diferentes estando expostos a noxas diversas.

O TLR 4 reconhece lipopolissacárides de bactérias (Manicassamy e Puledran, 2009). Dentre os fatores propostos na etiopatogenia da rosácea, alguns estudos apontaram para a participação do *Helicobacter pylori*, embora com resultados conflitantes (Yamasaki e Gallo, 2009). *Helicobacter pylori* é uma bactéria gram negativa, que apresenta lipopolissacárides na composição de seu envoltório (Moran et al., 1992). Pacientes com rosácea apresentam soropositividade e títulos de anticorpos anti-*Helicobacter pylori* maiores do que os esperados, inclusive quando comparados com a

população geral (Szlachcic, 2002). Foram demonstradas alterações endoscópicas gastrintestinais, bem como confirmação de infecção por *Helicobacter pylori* através de teste respiratório e biopsia gástrica na rosácea (Diaz et al., 2003). Além disso, alguns trabalhos relatam melhora das lesões cutâneas da rosácea com a erradicação do *Helicobacter pylori*. Por outro lado, o envolvimento do *Helicobacter pylori* na rosácea não pode ser confirmado por outros autores (Kolibásová et al., 1996; Jones et al., 1998; Utaş et al., 1999; Bamford et al., 1999).

Acredita-se que o *Helicobacter pylori* possa ter participação na patogênese da rosácea, muito embora o modo como a bactéria poderia influenciar no quadro clínico cutâneo permanece em especulação. Sabe-se que o lipopolissacáride do *Helicobacter pylori* é capaz de ativar o TLR 4 em células da mucosa gástrica (Kawahara et al., 2001). Portanto, a participação do *Helicobacter pylori* na etiopatogenia da rosácea consistiria numa explicação coerente para o aumento da expressão de TLR 4 encontrado no nosso estudo que envolveu as lesões de pele de rosácea.

A maior expressão de TLR 4 por nós observada nas lesões de rosácea, em contraste com o relatado no estudo de Yamasaki et al. (2011) realizado em San Diego (EUA), poderia ser explicada pela maior prevalência de *Helicobacter pylori* nos países em desenvolvimento como o Brasil (Muller et al., 2007).

Além do fator microorganismo, a participação da radiação ultravioleta também ativa a expressão de TLR 4, o que representa mais uma vez,

um fator desencadeante de rosácea, relacionado com os achados de nosso estudo.

A expressão da forma induzida da óxido nítrico sintase está aumentada nas lesões de rosácea.

A iNOS exerce atividade antimicrobiana através da produção de óxido nítrico (NO) (Bogdan, 2000). Foi demonstrado que os queratinócitos são capazes de produzir produtos antimicrobianos como o NO (Bruch-Gerharz et al., 1998).

A iNOS representa molécula-alvo da ativação de TLR 4 pelo lipopolissacáride do *Helicobacter pylori* (Chan e Riches., 2001). O envolvimento de TLR 2 e 4, assim como de iNOS foi demonstrado em modelo experimental de infecção gastrointestinal por *Helicobacter pylori*. As células de mucosa gástrica normal são estimuladas pelo lipopolissacarídeo do *Helicobacter pylori* através da ativação inicial do TLR 4, que induz a expressão de TLR 2 e juntos, esses receptores “toll-like” amplificam a transcrição de iNOS (Uno et al., 2007). Esse mecanismo representa interessante hipótese para justificar e correlacionar o aumento da expressão de TLR 2, 4 e iNOS observado nas lesões de rosácea em nosso estudo.

Outro fator que poderia explicar a expressão aumentada de iNOS, por nós observada, seria o aumento de TNF- α que foi demonstrado na rosácea (Yamasaki et al., 2011). Essa citocina pró-inflamatória tem sido amplamente relacionada à produção de iNOS (Lowes et al., 2005; Nandi et al., 2010)

A radiação ultra-violeta, pelos mecanismos já expostos de ativação do TLR 2 e TLR 4, culmina na maior produção de IL-10 e TNF- α . Desse modo, a radiação ultra-violeta como fator predisponente da rosácea (Yamasaki e Gallo, 2009; Bae et al., 2009) levaria à produção maior produção de iNOS nos sítios de lesão.

Face aos resultados obtidos em nosso estudo e aos dados de literatura acima expostos, propõe-se a seguinte hipótese para a participação da imunidade inata na rosácea:

Inicialmente, é necessário que haja exposição a um fator desencadeante. Os dois fatores desencadeantes mais consistentes propostos pela literatura são a presença de microorganismos e a exposição à radiação ultra-violeta. A partir deste gatilho iniciam-se os eventos da imunidade inata na patogenia da rosácea apresentados sequencialmente, do mais precoce para o mais tardio (Figura 22):

Figura 22. Sequência de eventos postulados para o envolvimento da imunidade inata na patogênese da rosácea. PRR: “patern recognition receptors”; RUV: radiação ultra-violeta; LL-37: “37-amino acid peptide”; LPS: lipopolissacáride; Ag: antígeno; HSP: heat-shock proteins; MO: microorganismo; TLR 4: receptores “toll-like” 4; TLR 2: receptor “toll-like” 2; KLR 5: calicreína 5; Toll/IL-1: complexo toll-like receptor/interleucina 1; IL-10: interleucina 10; TNF- α : fator de necrose tumoral alfa; iNOS: forma induzida da enzima óxido nítrico sintase; NO: óxido nítrico; Lectin: receptor Mannan-binding lectin; Mn,Sc: receptores manose e “scavenger” dos macrófagos; TLR 9: receptores “toll-like” 9; IFN- α : interferon alfa; CL: célula de Langerhans; PDC: célula dendrítica plasmocitóide; mDC: célula dendrítica mielóide; PMN: polimorfonucleares neutrófilos.

- 1ª linha: Barreiras Epiteliais:

Produção de substâncias químicas na superfície celular e fluidos com capacidade de lise de microorganismos, dentre estas as catelicidinas, um subtipo de peptídeo antimicrobiano, cuja fração ativa (LL-37) está aumentada na rosácea (Yamasaki e Gallo, 2009).

- 2ª linha: Reconhecimento (“patern recognition receptors”), Fagocitose (Complemento), Indução da produção de citocinas inflamatórias:

Produtos de microorganismos (LPS, HSP, Ag) ou resultantes de exposição à radiação ultra-violeta (HSP), interagem com PRRs:

- Secretados (“lectin”) e Endocíticos (“mannose/scavenger”) nos macrófagos residentes levando à *fagocitose* diretamente ou via complemento.
- Sinalizadores TLR 2 e 4 (cuja expressão aumentada na rosácea, de acordo com nosso estudo) nos queratinócitos, células de Langerhans e macrófagos residentes da pele levando à *indução da produção de citocinas inflamatórias*, especialmente IL-10 e TNF- α . Este último induz à produção de iNOS (aumentada na rosácea de acordo com nossos resultados), que representa vetor crucial na produção de NO, responsável pela efetiva destruição dos microorganismos na fagocitose. Nas células de Langerhans (diminuídas em número nas lesões de rosácea no nosso estudo) a interação com TLR também estimula a migração da epiderme para os linfonodos regionais.

- 3ª linha: Inflamação

As citocinas produzidas nos sítios de lesão por meio da atuação dos TLR (durante os eventos da 2ª linha) levam às alterações típicas da inflamação, incluindo a quimiotaxia de células para o local, como:

- polimorfonucleares neutrófilos e mais macrófagos, que seriam responsáveis pela *fagocitose* tardia e mais potente. Neste processo também participaria a iNOS (cuja expressão está aumentada na rosácea, de acordo com nossos resultados).
- células dendríticas, entre elas as células plasmocitóides (demonstradas nas lesões de rosácea deste estudo) cujo papel na patogênese da rosácea ainda não está elucidado, postulando-se que a partir de desencadeantes (DNA “self” ou microorganismos) seriam responsáveis pela produção de interferon alfa (que contribui com as outras citocinas no processo de inflamação), e/ou induziriam células dendríticas mielóides a iniciar a imunidade adquirida.

Imunidade Adquirida:

Até o momento não se tem estudos que avaliaram a participação deste braço da imunidade na rosácea. A atuação da imunidade adquirida tem início quando o processo nosológico não é eficazmente debelado pela imunidade inata (Murphy, 2012).

As células de Langerhans que migram da epiderme para os linfonodos regionais durante os eventos da imunidade inata e as células

dendríticas mielóides possivelmente ativadas pelas células plasmocitóides, como anteriormente discutido (Merad et al., 2008; Murphy, 2012; Bene et al., 2003; Serbina et al., 2003), representariam pontes para a ativação da imunidade adquirida.

Resta saber se, na rosácea, a imunidade inata é capaz de debelar o processo, ou se a imunidade adquirida também é acionada fazendo parte da sua etiopatogenia, o que permanece ainda desconhecido.

O estudo dos elementos envolvidos na imunidade adquirida representa uma abordagem futura para verificar se haveria diferenças nesse braço da imunidade que poderiam justificar as diferenças de expressão clínica e de resposta tecidual na rosácea.

A partir dos dados apresentados, foi possível constatar neste estudo a participação da imunidade inata precoce e tardia na etiopatogenia da rosácea, o que pode significar um avanço do ponto de vista científico, uma vez que, doravante, os fatores etiopatogênicos associados à rosácea, antes citados separadamente, poderão vir a ser agrupados em uma sequência lógica e inter-relacionada de acontecimentos. Esses novos conhecimentos podem representar alicerce para investimento em pesquisas de novas modalidades terapêuticas para a rosácea e, desse modo, contribuir para a melhor qualidade de vida dos pacientes.

Confirmou-se a participação da imunidade inata na fisiopatologia da rosácea, demonstrando-se que:

1. As células de Langerhans (CL) estão diminuídas em biopsias de pele de pacientes com diagnóstico de rosácea.
2. As células dendríticas plasmocitóides (PDC) foram pela primeira vez demonstradas em biopsias de pele de pacientes com diagnóstico de rosácea.
3. A expressão dos receptores Toll-like 2 e 4 encontra-se aumentada em biopsias de pele de pacientes com diagnóstico de rosácea.
4. A expressão da forma induzida da enzima óxido nítrico sintase (isoforma iNOS), encontra-se aumentada em biopsias de pele de pacientes com diagnóstico de rosácea.

Anexo 1

Tabela 5. Dados demográficos, resultados de exames complementares e subtipos clínicos e histopatológicos dos doentes de rosácea.

Caso	Sexo	Idade	Etnia	FAN	IFD	Subtipo Clínico	Resposta Tecidual
1	M	38	Branca	(-)	(-)	NPP	RNG
2	F	54	Branca	(-)	(-)	NPP	RNG
3	M	53	Negra	NR	NR	PP	RG
4	F	48	Parda	NR	NR	IA	RNG
5	F	38	Negra	(-)	(-)	PP	RNG
6	F	25	Branca	NR	(-)	PP	RG
7	F	48	Branca	NR	(-)	NPP	RNG
8	F	52	Parda	NR	NR	PP	RNG
9	F	44	Parda	NR	NR	IA	RNG
10	F	36	Parda	(-)	(-)	PP	RG
11	F	40	Parda	(-)	(-)	PP	RNG
12	M	76	Parda	NR	NR	PP	RNG
13	F	24	Branca	(-)	(-)	PP	RG
14	M	38	Parda	(-)	(-)	NPP	RNG
15	M	69	Branca	NR	NR	NPP	RG
16	F	40	Branca	(-)	(-)	PP	RG
17	F	65	Negra	(-)	(-)	NPP	RG
18	F	35	Parda	NR	NR	PP	RG
19	F	58	Negra	NR	NR	PP	RNG
20	F	35	Negra	NR	NR	PP	RNG
21	F	47	Parda	(-)	(-)	PP	RNG
22	F	45	Branca	NR	NR	NPP	RG
23	M	47	Parda	NR	(-)	PP	RNG
24	F	40	Negra	(-)	(-)	PP	RG
25	F	40	Parda	NR	NR	PP	RNG
26	M	33	Parda	NR	NR	PP	RNG
27	F	48	Parda	NR	NR	PP	RNG
28	F	52	Parda	(-)	NR	PP	RNG

M: Masculino; F: Feminino; FAN: Fator Anti-Nuclear; IFD: Imunofluorescência Direta; NR: Não realizado; (-): Negativo; PP: Pápulo-pustular; NPP: Não Pápulo-pustular; RG: Rosácea Granulomatosa; RNG: Rosácea Não Granulomatosa.

Anexo 2

Tabela 6. Achados histopatológicos de 28 espécimes de rosácea

Caso	VD	ES	HGS	AC	IIPV	IIPF	LMN	PMN	EG
1	(+)	0	0	0	(+)	(+)	(+)	(+)	0
2	(+)	(+)	0	0	(+)	(+)	(+)	0	0
3	(+)	0	0	0	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
4	(+)	0	0	0	(+)	(+)	(+)	(+)	0
5	(+)	0	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	0	0
6	0	0	0	0	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
7	(+)	0	(+)	0	(+)	(+)	(+)	0	0
8	0	0	0	0	(+)	(+)	(+)	0	0
9	0	0	0	0	(+)	(+)	(+)	0	0
10	0	0	0	0	(+)	(+)	(+)	0	(+)
11	(+)	0	0	0	(+)	0	(+)	0	0
12	(+)	0	(+)	0	(+)	(+)	(+)	(+)	0
13	(+)	0	0	0	(+)	(+)	(+)	0	(+)
14	(+)	0	0	0	(+)	(+)	(+)	0	0
15	(+)	(+)	0	0	(+)	(+)	(+)	0	(+)
16	(+)	(+)	0	0	(+)	(+)	(+)	0	(+)
17	(+)	0	0	0	(+)	(+)	(+)	0	(+)
18	(+)	0	0	0	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
19	(+)	0	0	0	(+)	(+)	(+)	0	0
20	(+)	0	0	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	0
21	(+)	(+)	0	0	(+)	(+)	(+)	0	0
22	(+)	0	0	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
23	(+)	0	0	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	0
24	(+)	0	0	0	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
25	0	0	0	0	(+)	(+)	(+)	(+)	0
26	(+)	0	0	0	(+)	(+)	(+)	0	0
27	(+)	0	0	0	(+)	(+)	(+)	0	0
28	(+)	0	0	0	(+)	(+)	(+)	0	0

VD: vasos dilatados; ES: Elastose Solar; HGS: Hiperplasia de Glândula Sebácea; AC: Ácaro; IIPV: Infiltrado Inflamatório Perivascular; IIPF: Infiltrado Inflamatório Perifolicular; LMN: Linfomononucleares no infiltrado; PMN: Polimorfonucleares no infiltrado; EG: Esboços Granulomatosos; (+): Presença; 0: Ausência

Anexo 3

Tabela 7. Dados estatísticos da análise imunoistoquímica realizada nos diferentes subtipos clínicos e histopatológicos do grupo rosácea e do grupo controle

		Comparação entre os subtipos clínicos		Comparação entre casos e controles		Comparação entre os subtipos histopatológicos e controles			Comparação entre os subtipos histopatológicos	
		Teste Mann-Whitney		Teste Mann-Whitney		Teste Kruskal-Wallis			Teste Mann-Whitney	
		PP	NPP	ROS	CONT	RG	RNG	CONT	RG	RNG
CD1a	Nº casos	18	6	26	15	9	17	15	9	17
	Minímo	0,16	0,39	0,16	0,69	0,72	0,16	0,69	0,72	0,16
	Mediana	1,785	0,93	1,705	5,36	2,03	1,34	5,36	2,03	1,34
	Máximo	7,01	6,62	7,01	10,43	7,01	6,62	10,43	7,01	6,62
	Valor P	0,2714		0,001*		0,0013*			0,0524	
CD123	Nº casos	17	5	NR	NR	NR	NR	NR	8	16
	Minímo	0,16	0,39	NR	NR	NR	NR	NR	0,1	0,05
	Mediana	1,785	0,93	NR	NR	NR	NR	NR	0,25	0,14
	Máximo	7,01	6,62	NR	NR	NR	NR	NR	0,66	0,67
	Valor P	0,0078*		NR		NR			0,0617	
TLR2	Nº casos	19	7	28	15	10	18	15	10	18
	Minímo	0,16	0,39	0,4	0,2	0,4	1,7	0,2	0,4	1,7
	Mediana	1,785	0,93	4,5	1	5,6	4,25	1	5,6	4,25
	Máximo	7,01	6,62	10,6	5,7	10,6	10,1	5,7	10,6	10,1
	Valor P	0,236		0,0003*		0,0012*			0,5813	
TLR4	Nº casos	19	7	28	15	10	18	15	NR	NR
	Minímo	0,16	0,39	1	0,1	1,7	1	0,1	NR	NR
	Mediana	1,785	0,93	14,45	0,3	17,3	10,7	0,3	NR	NR
	Máximo	7,01	6,62	34,4	11,4	34,4	29,3	11,4	NR	NR
	Valor P	0,1485		<0,0001*		<0,0001*			NR	
iNOS	Nº casos	19	7	28	15	10	18	15	NR	NR
	Minímo	0,16	0,39	0,02	0,14	0,02	0,1	0,14	NR	NR
	Mediana	1,785	0,93	2,75	0,72	4,45	2,25	0,72	NR	NR
	Máximo	7,01	6,62	15,5	2,84	15,5	11,8	2,84	NR	NR
	Valor P	0,1186		0,0007*		0,0014*			NR	

(*) p < 0,05

PP: Pápulo-pustular; NPP: Não Pápulo-pustular; ROS: Rosácea; CONT: Controle; RG: Rosácea Granulomatosa; RNG: Rosácea Não Granulomatosa.Epitelióide; NR: Não realizado;

Anexo 4

Etapas da quantificação de fração de área imunomarcada com CD1a+ com o “software” de imagens (Image-Pro Plus 4.5.0.29): campo microscópico a ser contado; seleção da área a ser incluída na contagem; contagem automática de pixels imunomarcados (em marrom); contagem da área total incluída.

Anexo 5

Etapas da quantificação de células CD123+ com o “software” de imagens (Image-Pro Plus 4.5.0.29): campo microscópico a ser contado; contagem manual das células marcadas.

The figure consists of three vertically stacked screenshots of the Image-Pro Plus software interface, demonstrating the segmentation of a histological image.

Top Screenshot: The main window displays the original histological image. The title bar reads "Image-Pro Plus - 2030-06_20x_1.jpg (1/1)". The menu bar includes File, Edit, Acquire, Enhance, Process, Measure, Macro, Window, and Help. The toolbar contains various icons for file operations, editing, and measurement.

Middle Screenshot: The same histological image is shown, but with a green mask applied to the tissue. The mask highlights the tissue areas, while the background is white. The title bar and menu bar are the same as in the top screenshot.

Bottom Screenshot: The same histological image with the green mask is shown. The "Statistics" window is open on the right side of the interface. The window has a "File" menu and a "Locate the object" checkbox. The "Statistics" table shows the following data:

Item	Area	Count
Sum	360.0377	24660294
Min	4	2736
Max	142.84215	22915.69
Count	3	1
Range	142.8382	22915.613
Mean	287.14023	14611.888
StdDev	2.7940674	453.10985
Sum	278.62961	46188.172
Range	3161	3161

Below the table, there are three checkboxes: "Measure Objects" (checked), "Apply Filter Ranges" (unchecked), and "Accumulate Count" (unchecked). The "Total Count" is 3161, and the "In Range" count is 3161.

Anexo 7

APROVAÇÃO

A 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 15/04/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0122/09**, intitulado: **"ESTUDO DA IMUNIDADE INATA NA ROSÁCEA: CÉLULAS DENDRÍTICAS PLASMOCITÓIDES, RECEPTORES TOLL-LIKE E EXPRESSÃO DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZIDA (INOS) EM BIÓPSIAS DE PELE"** apresentado pelo Departamento de **DERMATOLOGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Profa. Dra. Mirian Nacagami Soffo**

Pesquisadores Executantes: **Ana Karina Alves Moura, Ana Maria Gonçalves da Silva, Thales de Brito**

CAPPesq, 16 de Abril de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

Referências

Abbas AK, Lichtman AH. *Cellular and Molecular Immunology*. 5thed. Philadelphia: Saunders; 2005. Innate Immunity; p.275-297.

Aksoy B, Altaykan-Hapa A, Egemen D, Karagoz F, Atakan N. The impact of rosacea on quality of life: effects of demographic and clinical characteristics and various treatment modalities. *Br J Dermatol*. 2010;163:719–725.

Aloi F, Tomasini C, Soro E, Pippione M. The clinicopathologic spectrum of rhinophyma. *J Am Acad Dermatol*. 2000;42:468-72.

Altinyazar HC, Koca R, Tekin NS, Esturk E. Adapalene vs. Metronidazole gel for the treatment of rosacea. *Int J Dermatol*. 2005;44:252–255.

Bae YI, Yun S, Lee J, Kim S, Won YH, Lee S. Clinical Evaluation of 168 Korean Patients with Rosacea: The Sun Exposure Correlates with the Erythematotelangiectatic Subtype. *Ann Dermatol*. 2009;21(3):243-49.

Bamford JT, Tilden RL, Blankush JL, Gangeness DE. Effect of treatment of *Helicobacter pylori* infection on rosacea. *Arch Dermatol*. 1999;135(6):659-63.

Barco D, Alomar A. Rosacea. *Actas Dermosifiliogr*. 2008;99:244-56.

Belinda LW, Wei WX, Hanh BT, Lei LX, Bow H, Ling DJ. SARM: a novel Toll-like receptor adaptor, is functionally conserved from arthropod to human. *Mol Immunol*. 2008;45(6):1732-42.

Béné MC, Feuillard J, Jacob MC. Plasmacytoid dendritic cells: from the plasmacytoid T-cell to type 2 dendritic cells CD41CD561 malignancies. *Semin Hematol*. 2003;40(3):257-66.

Berth-Jones J. Rosacea, Perioral Dermatitis and Similar Dermatoses, Flushing and Flushing Syndromes. In: Burns DA, Breathnach SM, Cox NH, Griffiths CEM, editores. Rook's text book of dermatology. 8th ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2010. p.43.1-43.20.

Bevins CL, Liu FT. Rosacea: skin innate immunity gone awry? *Nature Medicine*. 2007;13(8):975–981.

Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev*. 2000;173:17–26

Bohlson SS, Fraser DA, Tenner AJ. Complement proteins C1q and MBL are pattern recognition molecules that signal immediate and long-term protective immune functions. *Mol Immunol*. 2007;44:33-43.

Bruch-Gerharz D, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide in human skin: Current status and future prospects. *J Invest Dermatol*. 1998;110:1–7.

Buechner SA. Rosacea: An Update. *Dermatology*. 2005;210:100-108.

Chan ED, Riches DW. IFN-gamma LPS induction of iNOS is modulated by ERK, JNK/SAPK, and p38 (MAPK) in a mouse macrophage cell line. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;280:C441–C450.

Crawford GH, Pelle MT, James WD. Rosacea: I. Etiology, pathogenesis, and subtype classification. *J Am Acad Dermatol*. 2004;51:327-41.

Culp B, Scheinfeld N. Rosacea: A Review. *PT*. 2009;34(1):38-45.

Del Rosso JQ. Advances in understanding and managing rosacea: part 1: connecting the dots between pathophysiological mechanisms and common clinical features of rosacea with emphasis on vascular changes and facial erythema. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2012;5(3):16-25.

Diaz C, O'Callaghan CJ, Khan A, Ilchyshyn A. Rosacea: a cutaneous marker of *Helicobacter pylori* infection? Results of a pilot study. *Acta Derm Venereol*. 2003;83(4):282-6.

Elder DE, Elenitsas R, Johnson BL, Murphy GF. Lever's Histopathology of the Skin. 9thEd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p.1229.

Elewski BE, Fleischer AB Jr, Parisier DM. A comparison of 15% azelaic acid and 0.75% metronidazole gel in the topical treatment of papulopustular rosacea: results of a randomised trial. *Arch Dermatol*. 2003;139:1444–1450.

Elewski BE, Draelos Z, Dreno B, Jansen T, Layton A, Picardo M. Rosacea – global diversity and optimized outcome: proposed international consensus from the Rosacea International Expert Group. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2011;25(2):188-200.

Elston DM. *Demodex* mites: Facts and controversies. *Clin Dermatol*. 2010;28(5):502-4.

Ertl GA, Levine N, Kligman AM. A comparison of the efficacy of topical tretinoin and low-dose oral isotretinoin in rosacea. *Arch Dermatol*. 1994;130:319–324.

Farkas L, Beiske K, Lund-Johansen F, Brandtzaeg P, Jahnsen FL. Plasmacytoid Dendritic Cells (Natural Interferon α/β -Producing Cells) Accumulate in Cutaneous Lupus Erythematosus Lesions. *Am J Pathol*. 2001;159:237-243.

Gros P, Milder FJ, Janssen BJ. Complement driven by conformational changes. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:48-58.

Guyton AC, Hall JE. Tratado de fisiologia médica. 9ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996. Resistência do Organismo a Infecção II: Imunidade e Alergia; p.324 a 332.

Helm KF, Menz J, Gibson LE, et al. A clinical and histopathologic study of granulomatous rosacea. *J Am Acad Dermatol*. 1991;25(6 Pt 1):1038-43

Herling M, Teitell MA, Shen RR, Medeiros LJ, Jones D. TCL1 expression in plasmacytoid dendritic cells (DC2s) and the related CD4+ CD56+ blastic tumors of skin. *Blood*. 2003;101(12):5007-9.

Hernando-Harder AC, Booken N, Goerdts S, Singer MV, Harder H. *Helicobacter pylori* infection and dermatologic diseases. *Eur J Dermatol*. 2009;19(5):431-44.

Hoting E, Paul E, Plewig G. Treatment of rosacea with isotretinoin. *Int J Dermatol*. 1986;25:660–663.

Jahnsen FL, Farkas L, Lund-Johansen F, Brandtzaeg P. Involvement of Plasmacytoid Dendritic Cells in Human Diseases. *Hum Immunol*. 2002;63:1201–1205.

Jang YH, Sim JH, Kang HY, Kim YC, Lee ES. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases in the granulomatous rosacea compared with the non-granulomatous rosacea. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2011;25(5):544-8.

Jegalian AG, Facchetti F, Jaffe ES. Plasmacytoid Dendritic Cells Physiologic Roles and Pathologic States. *Adv Anat Pathol*. 2009;16:392-404.

Jones MP, Knable AL, White MJ, Durning SJ. *Helicobacter pylori* in rosacea: lack of an association. *Arch Dermatol*. 1998;134(4):511.

Kang SSW, Kauls LS, Gaspari AA. Toll-like receptors: Applications to dermatologic disease. *J Am Acad Dermatol*. 2006;54:951-83.

Kawahara T, Teshima S, Oka A, Sugiyama T, Kishi K, Rokutan K. Type 1 *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide stimulates Toll-like receptor 4 and activates mitogen oxidase 1 in gastric pit cells. *Infect Immun*. 2001;69:4382–4389.

Kim J. Review of the Innate Immune Response in Acne vulgaris: Activation of Toll-Like Receptor 2 in Acne Triggers Inflammatory Cytokine Responses. *Dermatology*. 2005;211:193–198

Kobilka BK. G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1768(4):794-807.

Kojouharova M, Reid K, Gadjeva M. New insights into the molecular mechanisms of classical complement activation. *Mol Immunol*. 2010;47(13):2154-60.

Kolibásová K, Tóthová I, Baumgartner J, Filo V. Eradication of *Helicobacter pylori* as the only successful treatment in rosacea. *Arch Dermatol*. 1996;132(11):1393.

Koreck A, Pivarcsi A, Dobozy A, Kemény L. The Role of Innate Immunity in the Pathogenesis of Acne. *Dermatology*. 2003;206:96–105.

Kubes P. Inducible nitric oxide synthase: a little bit of good in all of us. *Gut*. 2000;47:6-9.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster J. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010. Diseases of the Immune System.

Lacey N, Delaney S, Kavanagh K, Powell FC. Mite-related bacterial antigens stimulate inflammatory cells in rosacea. *Br J Dermatol*. 2007 Sep;157(3):474-81.

Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang YH, Homey B et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature*. 2007;449:564-569.

Lazaridou E, Fotiadou C, Ziakas NG, Giannopoulou C, Apalla Z, Ioannides D. Clinical and laboratory study of ocular rosacea in northern Greece. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2011;25(12):1428-31.

Lebwohl MG, Medansky RS, Russo CL, Plott RT. The comparative efficacy of sodium sulfacetamide 10% / sulphur 5% lotion and metronidazole 0.75% in the treatment of rosacea. *J Geriatr Dermatol*. 1995;3:183–185.

Leyden JJ, Thiboutot D, Shalita A. Photographic evidence from a clinical study comparing benzoyl peroxide 5%/clindamycin 1% topical gel with vehicle in the treatment of rosacea. *Cutis*. 2004;73(6):11-17.

Liu RH, Smith MK, Basta SA, Farmer ER. Azelaic acid in the treatment of papulopustular rosacea: a systematic review of randomized controlled trials. *Arch Dermatol*. 2006;142(8):1047-52.

Lowes MA, Chamian F, Abello MV, Fuentes-Duculan J, Lin SL, Nussbaum R et al. Increase in TNF-alpha and inducible nitric oxide synthase-expressing dendritic cells in psoriasis and reduction with efalizumab (anti-CD11a). *Proc Natl Acad Sci*. 2005;102(52):19057-62.

Manicassamy S, Pulendran B. Modulation of adaptive immunity with Toll-like receptors. *Semin Immunol*. 2009;21(4):185-93.

Marks R, Harcourt-Webster JN. Histopathology of rosacea. *Arch Dermatol*. 1969;100:683-91.

McGrath FD, Brouwer MC, Arlaud GJ, Daha MR, Hack CE, Roos A. Evidence that complement protein C1q interacts with C-reactive protein through its globular head region. *J Immunol*. 2006;176:2950-2957.

McNiff JM, Kaplan DH. Plasmacytoid dendritic cells are present in cutaneous dermatomyositis lesions in a pattern distinct from lupus erythematosus. *J Cutan Pathol*. 2008;35:452–456.

Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immunity. *N Engl J Med*. 2000;343(5):338-44.

Merad M, Ginhoux F, Collin M. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(12):935-47.

Moran AP, Helander IM, Kosunen TU. Compositional analysis of *Helicobacter pylori* rough-form lipopolysaccharides. *J Bacteriol*. 1992;174:1370–1377.

Morizane S, Yamasaki K, Kabisigting FD, Gallo RL. Kallikrein expression and cathelicidin processing are independently controlled in keratinocytes by calcium, vitamin D(3), and retinoic acid. *J Invest Dermatol*. 2010;130(5):1297-306.

Muller LB, Fagundes RB, Moraes CC, Rampazzo A. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer precursor lesions in patients with dyspepsia. *Arq Gastroenterol*. 2007;44(2):93-8.

Murphy KP. Janeway's immunobiology. 8thed. New York: Garland Science; 2012. An Introduction to immunobiology and innate immunity; p.1-125.

Nandi J, Saud B, Zinkievich JM, Yang ZJ, Levine RA. TNF-alpha modulates iNOS expression in an experimental rat model of indomethacin-induced jejunoileitis. *Mol Cell Biochem.* 2010;336(1-2):17-24.

Nestle FO, Conrad C, Tun-Kyi A, Homey B, Gombert M, Boyman O et al. Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alfa production. *J Exp Med.* 2005;202:135-143.

Reinholz M, Ruzicka T, Schaubert J. Cathelicidin LL-37: an antimicrobial peptide with a role in inflammatory skin disease. *Ann Dermatol.* 2012;24(2):126-35.

Robak E, Smolewski P, Wozniacka A, Sysa-Jedrzejowska A and Robak T. Clinical significance of circulating dendritic cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Mediat Inflamm.* 2004;13:171-180.

Roihu T, Kariniemi AL. *Demodex* mites in acne rosacea. *J Cutan Pathol.* 1998; 25:550–2.

Rojo-García JM, Muñoz-Pérez MA, Escudero J, Camacho F, et al. *Helicobacter pylori* in rosacea and chronic urticaria. *Acta Derm Venereol.* 2000;80(2):156-7.

Rowe A, Farrel AM, Bunker CB. Constitutive endothelial and inducible nitric oxide synthase in inflammatory dermatoses. *Br J Dermatol.* 1997;136:18-23.

Sabroe I, Parker LC, Dower SK, Whyte MK. The role of TLR activation in inflammation. *J Pathol.* 2008;214(2):126-35.

Sánchez JL, Berlingeri-Ramos AC, Dueño DV. Granulomatous rosacea. *Am J Dermatopathol.* 2008;30(1):6-9.

Sauder D, Miller R, Gratton D et al. The treatment of rosacea: the safety and efficacy of sodium sulfacetamide 10% and sulphur 5% lotion is demonstrated in a double blind study. *J Dermatolog Treat.* 1997;8:79–85.

Schachner L, Pestana A, Kittles C. A clinical trial comparing the safety and efficacy of a topical erythromycin-zinc formulation with a topical clindamycin formulation. *J Am Acad Dermatol.* 1990;22(3):489-95.

Schauber J, Gallo RL. Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;122(2):261-6.

Schraufstatter IU, Trieu K, Sikora L, Sriramaraio P, DiScipio R. Complement C3a and C5a induce different signal transduction cascades in endothelial cells. *J Immunol.* 2002;169:2102-10.

Serbina NV, Salazar-Mather TP, Biron CA, Kuziel WA, Pamer EG. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity.* 2003;19(1):59-70.

Szlachcic A. The link between *Helicobacter pylori* infection and rosacea. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2002;16(4):328-33.

Tel J, Lambeck AJA, Cruz LJ, Tacke PJ, Vries IJM, Figdor CG. Human Plasmacytoid Dendritic Cells Phagocytose, Process, and Present Exogenous Particulate Antigen. *J. Immunol.* 2010;184:4276-83.

Thiboutot D, Thieroff-Ekerdt R, Graupe K. Efficacy and safety of azelaic acid (15%) gel as a new treatment for papulopustular rosacea: results from two vehicle-controlled, randomised phase III studies. *J Am Acad Dermatol.* 2003;48: 836–845.

Thomas CF Jr, Limper AH. Current insights into the biology and pathogenesis of *Pneumocystis pneumonia*. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(4):298-308.

Tomasini D, Mentzel T, Hantschke M, Cerri A, Paredes B, Rütten A et al. Plasmacytoid dendritic cells: an overview of their presence and distribution in different inflammatory skin diseases, with special emphasis on Jessner's lymphocytic infiltrate of the skin and cutaneous lupus erythematosus. *J Cutan Pathol*. 2010;37(11):1132-9.

Torok HM, Webster G, Dunlap FE, Egan N, Jarratt M, Stewart D. Combination sodium sulfacetamide 10% and sulphur 5% cream with sunscreens versus metronidazole 0.75% cream for rosacea. *Cutis*. 2005;75:357-63.

Turvey SE, Broide DH. Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2 Suppl 2):S24-32.

Tüzün Y, Keskin S, Kote E. The role of *Helicobacter pylori* infection in skin diseases: facts and controversies. *Clin Dermatol*. 2010;28(5):478-82.

Ueno H, Schmitt N, Palucka AK, Banchereau J. Dendritic cells and humoral immunity in humans. *Immunol Cell Biol*. 2010;88:376-80.

Uno K, Kato K, Atsumi T, Suzuki T, Yoshitake J, Morita H. Toll-like receptor (TLR) 2 induced through TLR4 signaling initiated by *Helicobacter pylori* cooperatively amplifies iNOS induction in gastric epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;293:G1004-G1012.

Utaş S, Ozbakir O, Turasan A, Utaş C. *Helicobacter pylori* eradication treatment reduces the severity of rosacea. *J Am Acad Dermatol*. 1999;40(3):433-5.

Valladeau J, Saeland S. Cutaneous dendritic cells. *Semin Immunol*. 2005;17:273-83.

van Lookeren Campagne M, Wiesmann C, Brown EJ. Macrophage complement receptors and pathogen clearance. *Cell Microbiol.* 2007;9(9):2095-102.

van Zuuren E, Gupta A, Glover M et al. Systematic review of rosacea treatments. *J Am Acad Dermatol.* 2007;56:107–15.

Vane JR, Mitchell AJ, Appleton I, Tomlinson A, et al. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Pharmacology.* 1994;91:2046-50.

Vermi W, Lonardi S, Morassi M, Rossini C, Tardanico R, Venturini M et al. Cutaneous distribution of plasmacytoid dendritic cells in lupus erythematosus. Selective tropism at the site of epithelial apoptotic damage. *Immunobiology.* 2009;214:877–886.

Wackernage A, Massone C, Hoefler G, Steinbauer E, Kerl H, Wolf P. Plasmacytoid dendritic cells are absent in skin lesions of polymorphic light eruption. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2007;23:24–28.

Weller R. Nitric oxide: a key mediator in cutaneous physiology. *Clin. Exp. Dermatol.* 2003;28:511–14.

Wilkin JK. Treatment of rosacea: topical clindamycin versus oral tetracycline. *Int J Dermatol.* 1993;32:65–7.

Wolf JE Jr, Del Rosso JQ. The CLEAR trial: results of a large community-based study of metronidazole gel in rosacea. *Cutis.* 2007;79:73–80.

Wollenberg A, Wagner M, Gunther S, Towarowski A, Tuma E, Moderer M et al. Plasmacytoid Dendritic Cells: A New Cutaneous Dendritic Cell Subset with Distinct Role in Inflammatory Skin Diseases. *J Invest Dermatol.* 2002;119:1096-1102.

Xu Y, Narayana SV, Volanakis JE. Structural biology of the alternative pathway convertase. *Immunol Rev.* 2001;180:123-135.

Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T et al. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol.* 2003;4(11):1144-50.

Yamasaki K, Di Nardo A, Bardan A, Murakami M, Ohtake T, Coda A et al. Increased serine protease activity and cathelicidin promotes skin inflammation in rosacea. *Nat Med.* 2007;13:975-980.

Yamasaki K, Gallo RL. The molecular pathology of rosacea. *J dermatol sci.* 2009;55:77–81.

Yamasaki K, Kanada K, Macleod DT, Borkowski AW, Morizane S, Nakatsuji T et al. TLR2 Expression Is Increased in Rosacea and Stimulates Enhanced Serine Protease Production by Keratinocytes. *J Invest dermatol.* 2011;131:688–697.

Zaba LC, Krueger JG and Lowes MA. Resident and “Inflammatory” Dendritic Cells in Human Skin. *J Invest Dermatol.* 2009;129:302–08.

Zhao YE, Wu LP, Peng Y, Cheng H. Retrospective analysis of the association between *Demodex* infestation and rosacea. *Arch Dermatol.* 2010;146(8):896-902.