RAQUEL LEÃO ORFALI

**Avaliação do efeito das enterotoxinas estafilocócicas
tipos A e B em células Th17, Th22 e CD38+ na
dermatite atópica do adulto**

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

Programa de Dermatologia

Orientadora: Prof. Dra. Valéria Aoki

Coorientadora: Prof. Dra. Maria Notomi Sato

São Paulo
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Orfali, Raquel Leão

Avaliação do efeito das enterotoxinas estafilocócicas tipos A e B em células Th17, Th22 e CD38+ na dermatite atópica do adulto / Raquel Leão Orfali. -- São Paulo, 2015.

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

Orientadora: Valéria Aoki.

Coorientadora: Maria Notomi Sato.

Descritores: 1.Dermatite atópica/imunologia 2.Dermatite atópica/fisiopatologia
3.Enterotoxinas 4.Staphylococcus aureus 5.Interleucinas 6.Adulto

USP/FM/DBD-156/15

Dedicatória

Aos amores da minha vida: meu esposo Fabio e minha filha Laura, por todo amor, paciência e dedicação.

À minha mãe Zelma, meus avós Oscar e Wanda (*in memoriam*) e minha irmã Valéria, por serem o meu esteio e por todo amor e carinho.

Agradecimentos especiais

À Prof. Dra. Valéria Aoki, orientadora, professora, amiga de todas as horas e exemplo para toda a vida, por toda a paciência, constante incentivo, dedicação e, principalmente, por acreditar em mim.

À Prof. Dra. Maria Notomi Sato, orientadora, professora, fonte de inspiração, por toda a paciência, por sempre me lançar a novos desafios e por acreditar em mim.

Agradecimentos

Aos amigos do LIM-56 que ajudaram diretamente no desenvolvimento deste projeto: Tiago de O. Titz, Vanessa G. Dos Santos, Luanda M. S. Oliveira, Camila de Lollo, Josenilson F. de Lima, Naiura V. Pereira, Cyro A. de Brito e Nátalli Zanete Pereira, por toda colaboração e amizade.

Aos Drs. Mariana Zaniboni e Roberto Takaoka, colegas do ambulatório de dermatite atópica, por todo apoio, incentivo e amizade.

Às queridas colegas, Prof. Dra. Celina W. Maruta e Dra. Beatriz Averbach, por toda amizade e constante incentivo durante todos estes anos.

À Prof. Dra. Mirian N. Sotto, por todo apoio e colaboração durante toda minha pós-graduação.

Aos Profs. Drs. José Antônio Sanches Júnior, Cyro Festa Neto e Alberto José da Silva Duarte, por todo apoio institucional.

Aos Profs. Drs. Dewton de Moraes Vasconcelos, Mario Cezar Pires e Cristina Maria Kokron, pela honrosa contribuição na elaboração deste trabalho.

A todos os outros amigos do LIM-56 e do Departamento de Dermatologia do HC-FMUSP, que direta ou indiretamente colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho.

À FAPESP, por todo suporte financeiro.

A todos os pacientes do ambulatório de dermatite atópica que tornaram este trabalho possível.

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee 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*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. 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*.

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de Figuras

Lista de Quadros

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1	Introdução	1
2	Objetivos	15
3	Métodos	17
3.1	Seleção dos Indivíduos.....	18
3.2	Crterios de Exclusão.....	19
3.3	Avaliação dos Indivíduos	19
3.3.1	Dosagem de IgE sérica e hemograma	19
3.3.2	Obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMC)	19
3.3.3	Dosagem de citocinas por ELISA.....	20
3.3.4	Imuno-histoquímica	21
3.3.5	Dosagem de citocinas por citometria de fluxo	23
3.4	Estatística	25
4	Resultados	26
4.1	Avaliação dos Adultos com DA.....	27
4.2	Perfil de secreção de IL-6, IL-17, IL-22 e IL-23 em células mononucleares do sangue periférico estimuladas com SEA e SEB e no soro por ELISA.	29
4.3	Expressão de IL-17 em amostras de pele por imuno-histoquímica	31
4.4	Avaliação dos níveis circulantes de citocinas TH1/TH2/TH17 nos adultos com dermatite atópica por citometria de fluxo	33
4.5	Produção de citocinas intracelulares em células T CD4+/CD8+ estimuladas com SEA e SEB	34

4.6	Avaliação das células TH22 e TC22 nos pacientes com DA	40
4.7	Avaliação polifuncional das citocinas produzidas pelas células T CD4+ e CD8+ após estímulo com as enterotoxinas estafilocócicas....	42
4.8	Frequência <i>ex vivo</i> de células T CD4+CD38+ polifuncionais na dermatite atópica	45
5	Discussão.....	50
6	Conclusões	56
7	Anexos.....	59
8	Referências	68

Lista de abreviaturas

APC:	Células apresentadoras de antígenos
BC:	Barreira cutânea
BSA:	<i>Bovine serum albumin</i>
CAPPesq:	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CBA:	<i>Cytometric bead array</i>
CCL:	<i>Chemokine (C-C motif) ligand</i>
CD:	<i>Cluster differentiation</i>
Células NK:	Célula <i>natural killer</i>
CLA:	Antígeno linfocitário cutâneo
CMA:	<i>Candida albicans</i>
CXCL:	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
DA:	Dermatite atópica
EASI:	<i>Eczema Area and Severity Index</i>
EC:	Estrato córneo
ELISA:	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FITC:	<i>Fluorescein Issothiacynate</i>
FLG:	Filagrina
FMO:	<i>Fluorescence Minus One</i>
FSC:	<i>Foward scatter</i>
GATA-3:	<i>GATA-binding protein-3</i>
GM-CSF:	Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
HBD:	β defensina humana
HC-FMUSP:	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HIV:	Vírus da imunodeficiência humana
IFN- γ :	Interferon gama
IgE:	Imunoglobulina da classe E
IKK:	<i>Inhibitor of Kappa β kinase</i>
IL:	Interleucina

iNKT:	<i>Invariant natural killer T cells</i>
INV:	Involucrina
KC:	Recombinante murino KC
KLK7:	<i>Kallikrein-related peptidase 7</i>
LL-37:	Peptídeo antimicrobiano LL-37
LOR:	Loricrina
MAPK:	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MBL:	<i>Mannose-binding lectin protein</i>
MCP:	<i>Monocyte chemotactic protein</i>
MEKK:	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MHC:	Complexo principal de histocompatibilidade
MIP:	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
NFAT:	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NOD:	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
PBMC:	Células mononucleares do sangue periférico
PBS:	Tampão fosfato-salino
pDC:	<i>Plasmacytoid dendritic cell</i>
PE:	<i>Phycoerythrin</i>
PerCP:	<i>Peridinin chlorophyll protein</i>
PGE2:	Prostaglandina E2
pH:	Potencial hidrogeniônico
PHA:	Fitohemaglutinina
PKC:	<i>Protein kinase C</i>
PMA:	<i>Phorbol 12-Myristate 13-Acetate</i>
PMN:	Polimorfonucleares
pTreg:	Células T regulatórias induzidas perifericamente
PWM:	<i>Pokeweed</i>
Ras/Raf:	<i>Serine/threonine-specific protein kinases</i>
ROR γ t:	<i>Retinoid-related orphan receptor gamma t</i>
<i>S. aureus</i> :	<i>Staphylococcus aureus</i>
SEA:	Enterotoxina de <i>S. aureus</i> A
SEB:	Enterotoxina de <i>S. aureus</i> B

SPICE:	<i>Simplified presentation of incredibly complex</i>
SPINK5:	<i>Gene serine peptidase inhibitor Kazal type 5</i>
SSC:	<i>Side scatter</i>
STAT:	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
T-bet:	<i>T box expressed in T cells</i>
Tc:	Células T citotóxicas
TCR:	Receptor de células T
TEWL:	<i>Transepidermal water loss</i>
TGF:	Fator de transformador de crescimento
Th:	Células T auxiliares
TLR:	<i>Toll-like receptor</i>
TNF:	Fator de necrose tumoral
TSST-1:	Toxina da síndrome do choque tóxico
TT:	Toxoide tetânico

Lista de símbolos

%	Por cento
↓	Diminuição
↑	Aumento
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
<	Menor que
=	Igual a
>	Maior que
≤	Menor ou igual
°C	Graus Celsius
mL	Mililitro
n	Tamanho da amostra
ng	Nanograma
fg	Fentograma
nm	Nanômetro
pg	Picograma
UI	Unidade internacional
+	Positivo
-	Negativo
<i>g</i>	Unidade gravitacional

Lista de Figuras

Figura 1: Representação esquemática da disfunção do sistema imune inato na DA.....	4
Figura 2: Representação ilustrativa das subpopulações de células T CD4+	5
Figura 3: Ilustração esquemática da fase inicial e progressão para fase crônica da DA	10
Figura 4: Mecanismo de ação do <i>Staphylococcus aureus</i> . O <i>S. aureus</i> pode atuar como antígeno convencional ou como superantígeno para ativar as células T.	12
Figura 5: Esquema ilustrativo do mecanismo de ação das enterotoxinas estafilocócicas nos vários tipos celulares	13
Figura 6: Distribuição níveis séricos de IgE dos adultos com DA, conforme associação ou não com manifestação respiratória (asma e/ou rinite alérgica).	27
Figura 7: Níveis séricos de IgE nos adultos com DA.	28
Figura 8: Secreção de citocinas em sobrenadantes de cultura de PBMC estimulados com SEA e SEB por ELISA.	30
Figura 9: Avaliação da produção de citocinas em PBMC estimuladas com SEA e SEB conforme a gravidade da DA.	30
Figura 10: Elevação dos níveis séricos de IL-22 na DA.	31
Figura 11: Expressão de IL-17 em biópsias de pele de adultos com DA avaliadas por imuno-histoquímica.	32
Figura 12: Níveis séricos de citocinas avaliados por citometria de fluxo.	33

Figura 13: Níveis séricos de citocinas distribuídos conforme a gravidade da doença.....	34
Figura 14: Estratégia de análise monofuncional de citocinas.	35
Figura 15. SEA/SEB diminui a frequência de células T secretoras de citocinas.	36
Figura 16: Frequência de células TCD4+/TCD8+ secretoras de citocinas em distribuídos conforme a gravidade da doença.....	37
Figura 17: Frequência de células T secretoras de citocinas estimuladas por PMA/Ionomicina.....	38
Figura 18: Correlação entre cada citocina/quimiocina secretada por células T CD4+ em situação sem estímulo na DA.....	39
Figura 19. Antígenos estafilocócicos induzem efeito oposto nas células Th22 e Tc22 circulantes na DA.....	41
Figura 20: Resposta polifuncional alterada das citocinas induzidas por SEA e SEB em células T CD4+ na DA.....	43
Figura 21: Resposta polifuncional das citocinas induzidas por SEA e SEB em células T CD8+ na DA.	44
Figura 22: Estratégia de análise de células T CD4+CD38+.	46
Figura 23: Elevada frequência <i>ex vivo</i> de células T CD4+CD38+ polifuncionais associadas a uma resposta alterada para SEA e SEB na DA..	47
Figura 24: Frequência de células T CD8+CD38+ polifuncionais em resposta a SEA e SEB na DA.	48

Lista de Quadros

Quadro 1: Principais achados sobre as células Th17 em diferentes enfermidades.....	7
Quadro 2: Principais achados sobre as células Th22 em diferentes condições patológicas	9
Quadro 3: Painel de anticorpos para marcação das células T	24
Quadro 4: Perfil de secreção de IL-22 em PBMC estimuladas com SEA e SEB e no soro por ELISA.....	31
Quadro 5: Expressão de IL-17 em amostras de pele.....	32
Quadro 6: Níveis circulantes de citocinas Th1/Th2/Th17 nos adultos com dermatite atópica avaliadas por citometria de fluxo.....	34
Quadro 7: Produção de citocinas intracelulares em células T CD4+/CD8+ estimuladas com SEA e SEB avaliadas por citometria de fluxo	39
Quadro 8: Células Th22 e Tc22 nos pacientes com DA avaliadas por citometria de fluxo	42
Quadro 9: Análise polifuncional das citocinas produzidas por células T CD4+ e CD8+ após estímulo com SEA e SEB.....	45
Quadro 10: Análise polifuncional das citocinas produzidas por células T CD38+ após estímulo com SEA e SEB.....	49

Lista de Tabelas

Tabela 1: Dados demográficos, hospitalização, uso de corticoides sistêmicos e gravidade da doença nos adultos com DA	28
Tabela 2: Distribuição dos pacientes adultos com DA conforme gravidade da doença, gênero, dosagem de IgE sérica, porcentagem de eosinófilos no sangue, antecedentes pessoais de atopia e infecções e tempo de evolução da doença	66
Tabela 3: Dados demográficos do grupo controle.....	67

Resumo

Orfali RL. *Avaliação do efeito das enterotoxinas estafilocócicas tipos A e B em células Th17, Th22 e CD38+ na dermatite atópica do adulto* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015. 76p.

INTRODUÇÃO: A dermatite atópica (DA) é uma doença cutânea inflamatória, acompanhada por prurido intenso e xerose cutânea. A etiopatogenia da DA é multifatorial, envolvendo fatores genéticos, ambientais e imunológicos, dentre outros. **OBJETIVOS:** Avaliar a influência das enterotoxinas A e B do *Staphylococcus aureus* (SEA e SEB) na resposta mediada por células Th17 e Th22 nos indivíduos adultos com DA. **MÉTODOS:** Foram selecionados 38 pacientes adultos com DA e um grupo controle com 40 indivíduos adultos, pareados por idade e gênero. Os métodos utilizados foram: 1) ELISA: dosagem dos níveis séricos de IL-6, IL-17, IL-22 e IL-12p40/IL-23 e em sobrenadantes de culturas de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) estimuladas com SEA e SEB; 2) Imuno-histoquímica: análise da expressão de IL-17 em fragmentos de pele; 3) Citometria de fluxo: a) análise das citocinas circulantes em amostras de soro: IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF, IL-17A e IFN- γ ; b) avaliação das células T CD4+ mono e polifuncionais secretoras de IL-17, IL-22, TNF, IFN- γ , MIP-1 β , e expressão do marcador de ativação celular CD38; c) células Th22 e Tc22 estimuladas com SEA e SEB. **RESULTADOS:** 1) Através do ELISA, a secreção de IL-22 sérica e em PBMC induzidas por SEA e SEB foi significativamente mais elevada, quando comparada ao grupo controle; 2) houve aumento na expressão de IL-17 em amostras de pele de doentes de DA através da imuno-histoquímica; 3) Através da citometria de fluxo, foram detectados: a) níveis séricos de IL-2, 5, 6, 10, 17A e IFN- γ elevados no grupo com DA em relação aos controles; houve diferença significativa nos níveis circulantes de IL-17A nos pacientes com DA moderada e grave; b) na avaliação monofuncional das células T CD4+ sob estímulo de SEA/SEB, houve redução da expressão das citocinas IFN- γ , IL-17A, IL-22 ou TNF na DA, quando comparadas ao grupo controle; na análise polifuncional das células T CD4+/CD8+, ocorreu redução da resposta na DA em relação aos controles; nos pacientes atópicos encontramos aumento da resposta em situação basal na dependência de CD38, e redução na resposta frente a SEA/SEB na ausência de CD38; c) encontramos resposta reduzida das células Th22, e elevada de células Tc22 frente aos estímulos SEA e SEB, nos pacientes com DA. **CONCLUSÕES:** O estudo corrobora o papel patogênico das enterotoxinas estafilocócicas na DA. A ativação crônica com superantígenos estafilocócicos pode contribuir com a alta frequência de células T CD4+ CD38+ polifuncionais, e com a resposta polifuncional anérgica, mediadas por células T CD38-.

Descritores: 1.Dermatite atópica/imunologia 2.Dermatite atópica/fisiopatologia 3.Enterotoxinas 4.*Staphylococcus aureus* 5.Interleucinas 6.Adulto

Summary

Orfali RL. *Evaluation of the effect of staphylococcal enterotoxins A and B in Th17, Th22 and CD38+ cells in adult atopic dermatitis* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015. 76p.

BACKGROUND: Atopic dermatitis (AD) is an inflammatory skin disease with intense itching and xerosis. AD pathogenesis is multifactorial, involving genetic, environmental, and immunological factors, among others. **OBJECTIVES:** To evaluate the influence of enterotoxins A and B from *Staphylococcus aureus* (SEA and SEB) in Th17 and Th22 cell response in adults with AD. **METHODS:** We evaluated 38 adult patients with AD, and a control group of 40 adults, age and gender matched. **Assays:** 1) ELISA: evaluation of IL-6, IL-17, IL-12p40/IL-23 and IL-22 serum levels and in supernatants of mononuclear cell cultures from peripheral blood (PBMC), stimulated with SEA/SEB; 2) Immunohistochemistry: analysis of IL-17 expression in skin specimens; 3) Flow cytometry: a) analysis of circulating cytokines in serum samples: IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF, IL-17A and IFN- γ ; b) evaluation of mono and polyfunctional TCD4+ cells that secrete IL-17, IL-22, TNF, IFN- γ , MIP-1 β , and expression of the activation marker CD38; c) analysis of Tc22 and Th22 cells stimulated with SEA and SEB. **RESULTS:** 1) Secretion of IL-22 in the serum and from supernatants of cell cultures from PBMC, stimulated with SEA and SEB were higher in AD patients, when compared to the control group by ELISA; 2) there was an increase of IL-17 expression in skin samples by immunohistochemistry; 3) Flow cytometry showed: a) elevated serum levels of IL-2, 5, 6, 10, 17A and IFN- γ in AD, when compared to controls; there was a significant difference in circulating levels of IL-17A in patients with moderate and severe disease; b) monofunctional evaluation of T CD4+ cells under SEA/SEB stimuli showed reduced expression of IFN- γ , IL-17A, IL-22 or TNF cytokines in AD, compared to controls; the same was observed for polyfunctional CD4+/CD8+ T cells analysis, exhibiting a diminished response in AD. In atopic patients under basal conditions, there was an augmented CD38-dependent response and reduced pattern to SEA/SEB in the absence of CD38; c) finally, we observed a reduced response of Th22 cells and enhanced Tc22 cells under SEA/SEB stimuli in patients with AD. **CONCLUSIONS:** This study corroborates the pathogenic role of staphylococcal enterotoxins in AD. Chronic activation with staphylococcal superantigens may contribute to the high frequency of polyfunctional CD4 +CD38+ T cells and with the anergic polyfunctional response mediated by T CD38- T cells.

Descriptors: 1.Dermatitis, atopic/immunology 2.Dermatitis, atopic/physiopathology 3.Enterotoxins 4.*Staphylococcus aureus* 5.Interleukins 6.Adult

1 Introdução

A dermatite atópica (DA) é uma enfermidade cutânea inflamatória de caráter crônico, recidivante, que cursa com prurido intenso e xerose. Geralmente se inicia na infância e pode surgir em doentes com história familiar de asma, rinite alérgica e/ou dermatite atópica^{1, 2}. A maioria dos doentes de DA melhoram até o início da adolescência, e cerca de 20 a 30% continuam a apresentar a dermatite na vida adulta^{3, 4}. Sua prevalência é de aproximadamente 15 a 30% em crianças e de 1 a 3% em adultos. Estes dados aumentaram duas a três vezes durante as últimas três décadas em países industrializados, mas a DA continua sendo menos prevalente em zonas rurais e agrícolas⁵. Não existem marcadores laboratoriais específicos, sendo o diagnóstico da DA embasado nos critérios maiores e menores estabelecidos por Hanifin e Rajka⁶.

A etiopatogenia da dermatite atópica tem sido atribuída a uma complexa interação entre: fatores ambientais, susceptibilidade genética⁷, alterações da função da barreira cutânea e do sistema imune, além das infecções, principalmente por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)^{8, 9}. Do ponto de vista imunológico, encontramos aumento de IgE sérica (70-80%), eosinofilia, ativação crônica de macrófagos, secreção elevada de fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), prostaglandina E2 (PGE2), interleucinas (IL)-4, 5, 10, 13, 17 e 22, ativação e liberação de histamina pelos basófilos e diminuição de IFN- γ ^{10, 11}.

Elevados níveis séricos de imunoglobulinas da classe E (IgE) surgem em 55 a 90% dos indivíduos com DA e representam a forma extrínseca ou alérgica, em que a hiper-reatividade em testes cutâneos contra antígenos pode ser detectada. Nesta forma ocorre o aumento citocinas do padrão Th2, como IL-4, IL-5 e IL-13, de eosinófilos e da proteína catiônica do eosinófilo no soro¹². Em contrapartida, a forma não alérgica e não associada ao aumento de IgE sérica é denominada forma intrínseca ou não atópica (10 a 45% dos doentes); é possível que, nesta forma, os doentes apresentem IgE ou células T autoreativas para antígenos microbianos não rotineiramente avaliados¹⁰.

A. Resposta imune na dermatite atópica

i. Barreira cutânea, imunidade inata e a dermatite atópica

Atualmente, a DA tem sido modelo para o estudo de doenças em que as alterações de barreira cutânea estão diretamente ligadas à sua fisiopatologia e/ou clínica. Estas alterações podem ser tanto do ponto de vista físico, quanto de sua função imunológica. A barreira cutânea (BC) representa o primeiro obstáculo contra as agressões do meio externo, e é representada pelo estrato córneo (EC). O EC consiste não apenas em barreira física, como também representa estrutura metabolicamente ativa, interagindo com as camadas subjacentes da epiderme. Na DA, as alterações na BC se traduzem por perda de água transepidérmica (*transepidermal water loss* ou TEWL), defeitos no metabolismo da pró-filagrina, uma das proteínas essenciais do EC¹³, menor expressão de claudina 1 (localizada nas *tight junctions*) e consequente predisposição à infecções e inflamação^{14, 15}. Ainda, são detectados níveis baixos de ceramidas (1 e 3), dos níveis de sulfato de colesterol e acúmulo de esfingosilfosforilcolina, em decorrência da expressão aumentada da enzima esfingomielina deacilase^{16, 17}.

Com relação à imunidade inata, sabe-se que os queratinócitos e as células apresentadoras de antígenos (APC) na pele expressam receptores de reconhecimento de padrão molecular associados a patógenos, os *Toll-like receptors* (TLR). Quando estimulados por microrganismos ou injúrias teciduais, estes receptores induzem a liberação de peptídeos antimicrobianos, citocinas e quimiocinas. Dentre eles, destacamos três peptídeos antimicrobianos humanos: β -defensinas 2 e 3 (HBD-2 e HBD-3) e catelicidina (LL-37)¹⁸. A HBD-2 é efetiva no combate a microrganismos gram-negativos como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e leveduras. A HBD-3 e a LL-37 apresentam atividade mais potente e de amplo-espectro sendo eficazes contra microrganismos gram-negativos e positivos^{18, 19}.

A liberação dos peptídeos antimicrobianos aumenta a força das *tight junctions* e reforça a defesa contra a penetração dos microrganismos.

Indivíduos com DA apresentam redução da função dos TLR e falha nesse processo de proteção, bem como nos peptídeos antimicrobianos, promovendo uma predisposição maior às infecções cutâneas, principalmente pelo *S. aureus*²⁰. As principais alterações relacionadas à disfunção da imunidade inata na DA estão esquematizadas na Figura 1.

Adaptado de De Benedetto, Agnihothri *et al.*, (2009)¹⁸.

Figura 1: Representação esquemática da disfunção do sistema imune inato na DA

ii. Imunidade adaptativa

No que diz respeito à imunidade adaptativa, a DA foi caracterizada como doença modelo de resposta bifásica Th1/Th2 com relação ao padrão de citocinas envolvido nas diferentes fases da enfermidade. Na fase aguda da pele com DA, ocorre a predominância de citocinas de padrão linfocitário tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 e 13), enquanto na fase crônica, predominam citocinas tipo Th1 (IL-12 e IFN- γ)^{2, 5}.

Recentemente o paradigma Th1/Th2 na DA tem sido revisado. No modelo atual proposto, evidencia-se relevante papel de novos subtipos celulares, como Th17 e Th22^{9, 21, 22} (Figura 2). O papel das células Th17 e Th22 CD4+/CD8+ na DA permanece incerto e com dados conflitantes. Tendo em vista as propriedades pró-inflamatórias da IL-17 e a sua possível influência sobre as enterotoxinas estafilocócicas²³, e que a IL-22, produzida tanto por células Th17 quanto por células Th22^{24, 25}, desempenha papel central em doenças inflamatórias, torna-se mister investigar o seu papel na patogênese da DA.

Figura 2: Representação ilustrativa das subpopulações de células T CD4+

Células Th17

A IL-17 é a principal citocina envolvida na defesa do hospedeiro contra infecções, bem como na patogênese de doenças autoimunes²⁶. A IL-22, em cooperação com a IL-17, desencadeia a elaboração de peptídeo antimicrobiano e melhora determinadas respostas imunológicas, especialmente contra bactérias extracelulares e fungos^{9, 27, 28}. Estas células estão envolvidas na

proteção contra patógenos bacterianos, mas podem ser cruciais na patogênese de várias dermatoses inflamatórias^{29, 30}.

Os relatos iniciais sobre as células Th17 indicam que, na presença de *Borrelia burgdorferi*, a IL-17 seria produzida por células T, independentes da produção de citocinas Th1 ou Th2^{31, 32}. As maiores descobertas da linhagem Th17 vieram de modelos animais de autoimunidade, nos quais se descobriu que um novo membro da família da IL-12, a IL-23, que compartilha com a IL-12 a subunidade p40, estaria ligada a fenômenos de autoimunidade³³.

Fator transformador de crescimento (TGF)- β , IL-1 β , IL-6 e IL-23 parecem ser os fatores determinantes envolvidos na transformação das células Th *naïve* no fenótipo Th17, distinguindo, assim, as células Th17 das populações Th1 e Th2. Estas células, por sua vez, caracterizam-se por produzir citocinas inflamatórias, como IL-17A, IL-17F, IL-22 e IL-26, mas seu papel nas doenças alérgicas continua pouco esclarecido^{29, 33-35}. A IL-17 também tem sido detectada no soro e em amostras de tecido de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico³⁶, esclerose sistêmica³⁷, paracoccidiodomicose³⁸, dermatite de contato³⁹ e psoríase^{33, 40}.

No quadro 1 estão sintetizados alguns achados sobre as células Th17 em diferentes enfermidades.

Quadro 1: Principais achados sobre as células Th17 em diferentes enfermidades

Referência	Enfermidade	Achados
Caruso, R <i>et al.</i> (2007) ⁴¹	Gastrite + <i>Helicobacter pylori</i> (<i>H. pylori</i>)	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ de citocinas Th1 e Th17 - Importante papel de IL-23 e IL-17 na etiopatogenia da gastrite associada a <i>H. pylori</i>
Zhao, Y <i>et al.</i> (2009) ³⁹	Dermatite de contato	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ de citocinas Th17 (IL-17 A e F, IL-23) em amostras de pele de pacientes - Importante participação de células Th17/Tc17 patogênese da doença independente da natureza do alérgeno
Tanasescu, C <i>et al.</i> (2010) ³⁶	Lúpus eritematoso (LE)	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ de IL-17 (amostras de soro e pele) de pacientes - Importância da IL-17 na imunopatogênese da doença
Zhang, L <i>et al.</i> (2010) ⁴²	Psoríase	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ de células Th17 (sangue periférico e amostras de pele) e correlação com gravidade da doença
Pagliari, C <i>et al.</i> (2011) ³⁸	Paracoccidioidomicose	<ul style="list-style-type: none"> - IL-17 no infiltrado de biópsias de pele e mucosa oral - Célula secundária de defesa contra antígenos fúngicos
Rodriguez-Reyna, TS <i>et al.</i> (2012) ³⁷	Esclerose sistêmica	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ de células Th17 e Th1 nos pacientes
Boos, AC <i>et al.</i> (2014) ⁴³	Síndrome de Hiper-IgE	<ul style="list-style-type: none"> - mutação de STAT3: ↓ células Th17 em relação a pacientes com DA e controles
Koga, C <i>et al.</i> (2008) ²¹ Hayshida (2011) ⁹	DA (Resultados controversos)	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ células T CD4+IL-17+ (PBMC) na DA - ↓ células Th17 (PBMC); correlação com níveis séricos de CCL17, IgE e eosinófilos

As células Th17 não expressam os fatores de transcrição T-bet e GATA-3, mas necessitam de ROR γ t como fator de transcrição para sua diferenciação. A IL-17 coordena a inflamação tecidual local, através de aumento da regulação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-6, TNF- α , IL-1 β , KC/CXCL1, MCP-1/CCL2, MIP-2/CXCL2, MCP-3/CCL7, AND MIP-3 α /CCL20²¹.

Na DA, os achados sobre o papel das células Th17 são controversos. Estudos de análise fenotípica de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com DA demonstram aumento significativo de população celular T CD4+IL-17+, quando comparadas com grupo controle²¹. Outro grupo mostra uma redução nas células Th17 circulantes (PBMC) e concluem que esta diminuição pode contribuir com a atividade da DA, uma vez que se correlaciona com níveis séricos de CCL17, IgE e eosinófilos⁹.

Células Th22

A IL-22 é um membro da família da IL-10 e, além de ser produzida pelas células Th17, é também expressa por células T CD4+, denominadas de células Th22. Estas, por sua vez, são produtoras de altos níveis de IL-22, mas que não expressam IL-17 ou IFN- γ . Em contrapartida, produzem altos níveis de IL-13 e TNF- α . A função da IL-22 parece estar relacionada com a resposta imune inata epitelial e com a fisiopatologia de pele em doenças inflamatórias. Pode mediar a proliferação de queratinócitos cutâneos e hiperplasia epidérmica, tendo um papel fundamental nas doenças inflamatórias com acantose epidérmica^{24, 28, 30, 44}.

No quadro 2 estão sumarizados alguns achados sobre as células Th22 em diferentes condições patológicas.

Quadro 2: Principais achados sobre as células Th22 em diferentes condições patológicas

Referência	Enfermidades	Achados
Liu, Y <i>et al.</i> (2009) ⁴⁴	Candidíase	- ↑ IL-22 sob estímulo com <i>Candida albicans</i> - Importante na defesa contra infecções fúngicas
Truchetet, ME <i>et al.</i> (2011) ⁴⁵	Esclerose sistêmica	- ↑ Th22 circulante em adição a células Th2 e Th17
Miyagaki, T <i>et al.</i> (2011) ⁴⁶	Linfoma cutâneo de células T	- ↑ IL-22 e ↓ IL-17 na pele lesionada - ↑ IL-22 sérica e correlação com gravidade da doença
Luan, L <i>et al.</i> (2014) ⁴⁷	Psoríase	- Correlação positiva entre células Th22, níveis de IL-22 e gravidade da doença - Envolvimento na patogênese da doença
Fujita, H (2013) ²⁵ Gittler, JK <i>et al.</i> (2012) ²²	DA	- Fase crônica da DA: ↑ IL-22 e ↓ IL-17 - Fase aguda da DA: ↑ dos níveis da expressão genética de citocinas Th2/Th22

Sendo assim, durante a fase aguda da DA, ocorre um aumento da produção de citocinas do padrão Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) e citocinas do padrão Th22, especialmente IL-22. Essas citocinas reduzem a diferenciação de células da epiderme e contribuem para a redução de filagrina, como também de peptídeos antimicrobianos^{22, 24}.

Na fase crônica da DA ocorre inversão do padrão Th2 para Th1, o que resulta em um intenso infiltrado de células dendríticas inflamatórias epidérmicas (IDEC), macrófagos e eosinófilos, bem como na produção de IL-12 por esses tipos celulares, gerando aumento da produção de interferon- γ (IFN- γ), o qual é capaz de induzir a apoptose em queratinócitos¹⁰. A subpopulação de células T CD4⁺,

secretores de IL-17 (Th17), está presente tanto na fase aguda quanto na fase crônica da doença²². As principais alterações imunológicas que ocorrem na progressão da fase aguda para a crônica na DA estão ilustradas na Figura 3.

Adaptado de Gittler *et al.* (2012)²².

Figura 3: Ilustração esquemática da fase inicial e progressão para fase crônica da DA

Recentemente, as células Th22 são descritas como células T CD4+IFN-γ-IL-17-IL-22+, mas células T CD8+ também produzem pequena quantidade de IL-22. Sendo assim, outro subtipo celular foi denominado Tc22, e definido como células T CD8+IFN-γ-IL-17-IL-22+, importantes na patogênese da psoríase⁴⁷. Em artigo de revisão, Fujita conclui que a fase crônica da DA é caracterizada por uma elevação na expressão de IL-22 e redução de IL-17, e

que a hipótese original de que a DA seja mediada principalmente pela atividade celular tipo Th2 deveria ser modificada de acordo com os subtipos celulares Th22/Tc22 associados com alterações epidérmicas²⁵.

Após a descrição destes novos subtipos de células T CD4+, objetivamos avaliar simultaneamente a magnitude, o fenótipo e as múltiplas características funcionais destas células, incluindo a expressão de marcadores de superfície, sua produção de citocinas, bem como o possível impacto das enterotoxinas estafilocócicas sobre estes subtipos celulares. Uma avaliação funcional multiparamétrica das células T poderia ser útil para melhor entendimento da disfunção dos linfócitos T descrita na DA.

B. Papel do *Staphylococcus aureus* na dermatite atópica

O *S. aureus* pode ser isolado, em torno de 5 a 30%, na pele de indivíduos saudáveis, principalmente em áreas intertriginosas⁴⁸. Um ponto marcante na DA é a colonização estafilocócica, em cerca de 80 a 100% dos indivíduos, em geral relacionada com o grau de inflamação da pele. O mecanismo pelo qual essa bactéria leva à exacerbação do quadro de DA é controverso: admite-se que possa aumentar a sua colonização por injúria direta na pele (prurido, variação do pH da pele) ou pela liberação de enterotoxinas que funcionam como superantígenos, induzindo a ativação policlonal de células T^{49, 50}.

A susceptibilidade da pele do atópico à colonização pelo estafilococo parece estar relacionada a diversos fatores, entre os quais a aderência bacteriana. Adesinas, que consistem em receptores para laminina e fibronectina, estão localizadas nas paredes bacterianas do *S. aureus*; na DA, os receptores para fibronectina parecem estar descobertos, facilitando, assim, a aderência do estafilococo. Ainda, defeitos na membrana lipídica da pele do atópico facilitam a penetração bacteriana, permeando os espaços intercelulares. A observação de que o *S. aureus* permeia os espaços intercelulares da epiderme sugere que os lipídios da superfície da pele encontram-se deteriorados nos pacientes com DA^{51, 52}.

O *S. aureus* pode secretar várias enterotoxinas (A, B, C, dentre outras), além da toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1); estas toxinas podem atuar como superantígenos, estimulando de forma policlonal linfócitos T e macrófagos, sem a interferência do sistema MHC (complexo principal de histocompatibilidade)⁵³⁻⁵⁵. O superantígeno interage diretamente com porções constantes da cadeia V β do receptor de linfócitos T. Outro mecanismo possível seria a geração de anticorpos IgE específicos para as exotoxinas, ou seja, os superantígenos poderiam atuar como alérgenos, uma vez que 57% dos doentes de DA apresentam IgE dirigida contra SEA, SEB e TSST-1 (Figura 4). Estudos mostram que existe correlação entre gravidade da DA e a presença de anticorpos IgE contra estes superantígenos, o que pode significar: 1) que os superantígenos têm um importante papel na patogênese da DA; 2) que são processados como antígenos convencionais⁵⁶.

Figura 4: Mecanismo de ação do *Staphylococcus aureus*. O *S. aureus* pode atuar como antígeno convencional ou como superantígeno para ativar as células T. Ao contrário dos antígenos, os superantígenos não são processados e podem ligar-se diretamente na superfície da molécula de classe II do MHC, com especificidade pela cadeia V β do TCR. Extraído de Orfali, RL (Dissertação, 2005)⁵⁷

A toxicidade dos superantígenos bacterianos é mediada por potente atividade célula T estimuladora, que gera altos níveis de citocinas, como o TNF (fator de necrose tumoral), IL-1, IL-2, IL-6 e IFN- γ . Ainda, podem induzir anergia, inflamação, citotoxicidade, deleção de células T e autoimunidade⁵⁸.

Outros mecanismos do *S. aureus* envolvidos na resposta inflamatória da DA incluem: influência sobre as células apresentadoras de antígeno (APC) e eosinófilos, modulando a resposta de antígenos de superfície celulares; liberação de toxinas (α -toxinas), que levam ao dano citotóxico em queratinócitos, e estimulam a liberação de TNF- α ; aumento da síntese de IgE e expressão de CD23 in vitro ocasionados por componentes da parede bacteriana, como o ácido teicóico ou peptidoglicanas^{51, 59}. A representação ilustrativa do mecanismo de ação do *S. aureus* nos vários tipos celulares está demonstrada na Figura 5.

Adaptado de Huvenne, W (2013)⁶⁰.

Figura 5: Esquema ilustrativo do mecanismo de ação das enterotoxinas estafilocócicas nos vários tipos celulares

A expressão de CD38 nas células T destaca-se dentre os biomarcadores da ativação crônica na infecção pelo HIV, com poucas evidências ligando este marcador com a disfunção das células T⁶¹. Uma vez que a DA representa dermatose com colonização crônica por *S. aureus*, objetivamos avaliar a expressão de CD38 em células T CD4+/CD8+ polifuncionais (IL-17A, IL-22, IFN- γ , MIP-1 β e TNF) induzida por enterotoxinas estafilocócicas.

2 Objetivos

- **Geral:**

Avaliar a influência das enterotoxinas A e B do *Staphylococcus aureus* (SEA e SEB) na resposta mediada por células Th17 e Th22 nos indivíduos adultos com DA.

- **Específicos:**

- i. Avaliação dos níveis séricos de IL-6, IL-17, IL-22 e IL-12p40/IL-23 em sobrenadantes de culturas de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com SEA e SEB e no soro por ELISA,
- ii. Realização da técnica de imuno-histoquímica para avaliação da citocina IL-17 em biópsias de pele,
- iii. Avaliação das citocinas circulantes IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF, IL-17A e IFN- γ em amostras de soro por citometria de fluxo,
- iv. Avaliação monofuncional e polifuncional de células TCD4+ secretoras das citocinas IL-17, IL-22, TNF, IFN- γ , MIP-1 β , e expressão de marcadores de ativação celular (CD38) por citometria de fluxo,
- v. Avaliação das células Th22 e Tc22 estimuladas com SEA e SEB por citometria de fluxo.

3 Métodos

3.1 Seleção dos Indivíduos

Foram selecionados 38 adultos com DA, que fazem parte do ambulatório especializado de dermatite atópica do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), com idade superior a 18 anos e com início da DA na infância ou de aparecimento tardio. Dentre estes 38 indivíduos, a idade variou entre 19-41 anos (média de idade = $27,68 \pm 8,45$), sendo 26 homens e 12 mulheres. Todos os pacientes incluídos no estudo foram questionados sobre seu histórico de DA: idade de início da doença, internações, uso de medicações imunossupressoras (p.ex.: metotrexato ou ciclosporina), uso de corticoides sistêmicos e história pessoal e/ou familiar de atopia. Todos os pacientes do estudo estavam em uso de terapia de primeira linha para controle da enfermidade (emolientes e corticoides tópicos) e foram diagnosticados segundo os critérios maiores e menores de Hanifin e Rajka⁶² (Anexo 1).

Foi analisado também um grupo controle constituído por 40 indivíduos não atópicos (sem história pessoal de dermatite atópica, asma e/ou rinite alérgica) com idade acima de 18 anos. Dentre estes 40 indivíduos, a idade variou entre 18-53 anos (média de idade = $31,10 \pm 9,05$), sendo 18 homens e 22 mulheres.

Todos os sujeitos foram submetidos ao termo de consentimento livre e esclarecido para posterior inclusão no estudo. Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 26.05.2010, sob protocolo de Pesquisa nº 0007/10, apresentado ao Departamento de Dermatologia, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexos 2 e 3).

3.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídos os indivíduos que não preencheram os critérios de inclusão (idade menor que 18 anos ou que não preencheram os critérios diagnósticos de Hanifin e Rajka⁶²), gestantes, pacientes sob uso de antibióticos e/ou imunossupressores sistêmicos, pacientes com história pessoal de imunodeficiências primárias ou secundárias, e aqueles que, em qualquer momento, solicitaram a sua exclusão.

3.3 Avaliação dos Indivíduos

O índice de gravidade utilizado foi o EASI (*Eczema Area and Severity Index*)⁶³, conforme anexo 4. Os dados demográficos dos sujeitos da pesquisa estão sumarizados nos anexos 5 e 6.

3.3.1 Dosagem de IgE sérica e hemograma

A dosagem de IgE foi realizada no Laboratório Central do Complexo HC-FMUSP, utilizando-se o reagente N Látex IgE Mono (Dade Behring, Marburg/Germany). Foram considerados níveis normais até 100 UI/mL. O hemograma também foi realizado no Laboratório Central do Complexo HC-FMUSP, para estudo da contagem dos eosinófilos circulantes (valor de referência considerado normal entre 0,0 - 5,0%) por método automatizado.

3.3.2 Obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Para obtenção das PBMC, amostras de sangue periférico dos indivíduos foram coletadas em tubo heparinizado estéril e diluídas com solução fisiológica, volume a volume, em tubo plástico. As suspensões das PBMC foram obtidas, após centrifugação por 20 minutos a 950 g (2200 rpm), através de gradiente de concentração Ficoll Hypaque (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) de densidade

1,077. As células obtidas foram quantificadas em contador automático (Cell Dyn 1400, Abbott) e a concentração foi ajustada de acordo com o ensaio realizado. A viabilidade celular foi observada com auxílio do corante Azul de Tripán.

As concentrações das suspensões de PBMC foram ajustadas para 2×10^6 células/mL em meio de cultura RPMI, enriquecido com 10% de pool de soro AB (Sigma) suplementado de gentamicina (10 µg/mL). Foram distribuídos 100 µL da suspensão de células em microplacas de 96 poços (Costar, Cambridge, MA, EUA) e incubados com 100 µL/poço de enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* A (SEA, 0,04 µg/mL) e B (SEB, 1 µg/mL) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) a 37 °C e 5% de CO₂. Após incubações de 48 horas (cinética de tempos de incubação realizada em estudo prévio do nosso grupo^{57, 64}), os sobrenadantes de culturas foram coletados, centrifugados a 250 g (1100 rpm), por 5 minutos, a 10 °C, aliquotados e congelados a -80 °C para posterior dosagem de citocinas por ELISA. As amostras de sangue periférico dos indivíduos foram também coletadas em tubo seco sem aditivo e estéril. O sangue foi centrifugado por 10 minutos, a 250 g (1100 rpm) a 10 °C, e o soro coletado e armazenado a -80 °C para posterior dosagem de citocinas.

3.3.3 Dosagem de citocinas por ELISA

A determinação das citocinas IL-6, IL-17, IL-22 e IL-12p40/IL-23, nos sobrenadantes de cultura celular e soros, foi realizada por ELISA de acordo com as instruções do fabricante (R&D System). Resumidamente, as microplacas de 96 poços (Costar) foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais anti-citocina diluídos em solução salina tamponada (PBS, pH 7,6) e incubados por 18 horas, à temperatura ambiente. Após um ciclo de 4-5 lavagens em tampão *Tris-Tween* 20 (*Tris* 50 mM, 0,2% de *Tween*-20, pH 7,5) as placas foram bloqueadas com solução de PBS/2% SAB (Sigma) por 2 horas, à temperatura ambiente. Em seguida, após novas lavagens, foram adicionadas aos poços diversas diluições de soro e as respectivas citocinas recombinantes, utilizadas como curva padrão e incubadas por um período de 18 horas, à temperatura ambiente. Ao término deste período, os respectivos

anticorpos biotinilados foram incubados por 1 hora, à temperatura ambiente. Após novas lavagens, as placas foram incubadas com avidina peroxidase (Sigma) por 30 minutos, a 37 °C. Posteriormente, a atividade enzimática foi detectada pela adição de 50 µL de tetrametilbenzidina (Calbiochem), aproximadamente, por 20 minutos, à temperatura ambiente. A reação foi bloqueada pela adição de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 1 M) e a leitura realizada a 450 nm em leitor de microplaca de ELISA (Molecular Devices, CA, EUA). O limite de detecção para as referidas citocinas foi: IL-6: 9,38 pg/mL; IL-17: 15,6 pg/mL; IL-22: 31,2 pg/mL; IL-12p40/IL-23: 62,5 pg/mL.

3.3.4 Imuno-histoquímica

Coleta de amostras de pele

Após a seleção dos pacientes, foram realizadas biópsias por *punch* 4 mm em cada indivíduo, sob anestesia local por lidocaína 1%, e, posteriormente, suturadas com fio mononylon 5-0 em pele com lesão. Como grupo controle, foram utilizadas amostras de banco de pele sem histórico de dermatoses. As amostras colhidas foram emblocadas em parafina e posteriormente analisadas por imuno-histoquímica para determinar a expressão de IL-17 em cada grupo. Foi feito controle positivo e negativo de cada uma das reações para confirmar que foram realizadas adequadamente.

Coloração do material de biópsia por imuno-histoquímica

Cortes histológicos de quatro µm de espessura foram obtidos a partir de material embebido em parafina e colhidos em lâminas previamente preparadas com solução adesiva de 3 *amino-propyltriethoxy-silane* (Sigma) a 2%. A seguir, os cortes histológicos foram desparafinizados em dois banhos de xilol de 20 e 10 minutos, respectivamente, em temperatura ambiente. Na sequência, os espécimes foram hidratados em bateria decrescente de etanol (100%, 95% e 70%) e lavagem em água corrente, por cinco minutos. O bloqueio de peroxidase endógena foi feito em câmara escura, com três incubações em água oxigenada 3%, por 10 minutos cada. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água

corrente, durante cinco minutos, e submetidas a tratamento para exposição dos sítios antigênicos, em calor úmido. A exposição foi feita em banho maria a 95 °C, por 20 minutos, na solução *Target Retrieval Solution* pH 9,0 (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA). As lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada, por cinco minutos cada, e submersas em solução salina tamponada (PBS) pH 7,4. A seguir, foi feito o bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido, com incubação em solução de leite desnatado (Molico, Nestlé®) a 10%, durante 30 minutos, à temperatura ambiente.

As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário: IL-17 (R&D Systems), diluído a 1:40 em BSA fração V (SERVA. 1930) 1%, acrescida de azida sódica 0,1%, em tampão PBS pH 7,4, por 18 h, a 4 °C. Após o procedimento de lavagem das lâminas, por duas vezes, em tampão PBS pH 7,4, durante cinco minutos cada, procedeu-se à incubação com o anticorpo secundário anti-IgG/IgM (*mouse/rabbit/goat*) biotilado (LSAB+system-HRP, DakoCytomation) pronto para uso, em câmara úmida, durante 30 minutos, a 37 °C. As lâminas foram lavadas em tampão PBS pH 7,4, por duas vezes, durante cinco minutos cada, e incubadas com o complexo Streptavidina-Biotina-Peroxidase (LSAB+system-HRP, DakoCytomation) pronto para uso, em câmara úmida, durante 30 minutos, a 37 °C. Os sítios de ligações foram revelados com solução cromógena de diaminobenzidina (3,3'-diaminobenzidine, Sigma) 0,03% acrescida de 1,2 mL de água oxigenada 3%. As lâminas foram lavadas em água corrente, por cinco minutos, contracoradas com Hematoxilina de Carazzi, por 20 segundos. A seguir, foram lavadas em água corrente e secas, à temperatura ambiente. A montagem das lâminas foi feita com resina *PermOUNT* (FISHER Scientific, Fair Lawn, NJ/USA).

Análise das lâminas

Depois de coradas, as lâminas foram escaneadas, através de escâner de lâminas *Pannoramic Scan – 3Dhistech*. Para IL-17, foram selecionadas três áreas dérmicas (cada campo = 605µm x 380µm) sob aumento de x200. As fotos foram analisadas com a utilização do programa *Image-Pro Plus* versão 4.5.0.29 para Windows⁶⁵.

3.3.5 Dosagem de citocinas por citometria de fluxo

3.3.5.1 Dosagem de citocinas circulantes por citometria de fluxo

Os níveis circulantes das citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF, IL-17A e IFN- γ foram avaliadas em amostras de soro por citometria de fluxo, utilizando-se um *kit-CBA Human Enhanced Sensitivity Flex Set*, (BD Biosciences, CA, USA). O ensaio foi realizado seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, as amostras de soro e os padrões do kit de citocinas foram incubados com esferas de captura, recobertas com anticorpos específicos para as respectivas citocinas. As amostras foram incubadas com anticorpos conjugados com ficoeritrina (PE). A aquisição das amostras foi realizada por citometria de fluxo (BD Biosciences-LSR Fortessa, CA, EUA), e os resultados obtidos foram analisados com o uso do programa *BD FCAP Array 3,0* (BD Biosciences). O limite de detecção para as referidas citocinas foi: IL-2: 88,9 fg/mL; IL-4: 144,4 fg/mL; IL-5: 67,8 fg/mL; IL-6: 68,4 fg/mL; IL-10: 13,7 fg/mL; IL-17A: 26,1 fg/mL; TNF: 67,3 fg/mL; IFN- γ : 66,7 fg/mL.

3.3.5.2 Dosagem de citocinas de PBMC por citometria de fluxo

Para dosagem de citocinas intracelulares de PBMC, a concentração destas foi ajustada para 2×10^6 /poço e o cultivo foi realizado em microplacas de 96 poços (Costar), a 37 °C e 5% de CO₂ na presença de: SEA (0,04 µg/mL; Sigma), SEB (1 µg/mL; Sigma) e PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate – 10 ng/mL; Sigma) / Ionomicina (1 µg/mL; Sigma) por 6 horas. Brefeldina A (10 µg/mL; Sigma) foi adicionada à cultura, 2 horas após o início da mesma. Depois de 6 horas, as células foram coletadas da placa e marcadas com marcador de viabilidade celular LIVE/DEAD PE-Texas Red (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), por 30 minutos, à temperatura ambiente. As células foram então tratadas conforme as instruções do kit Cytofix / Cytoperm (BD Biosciences) e, posteriormente, marcadas com os anticorpos: CD3-Qdot 605 (Invitrogen), CD4-Horizon V500 (BD), CD8- PerCP-Cy5.5 (BD), TNF- PE-Cy7 (BD), CD38-Alexa 700 (BD), IL-17A-Alexa 488 (eBioscience, San Diego, CA, USA),

IL-22-PE (eBioscience), MIP-1 β -APC-H7 (BD), IFN- γ -Horizon V450 (BD) - vide Quadro 3, por 20 min, a 4 °C. O controle da fluorescência (FMO – *Fluorescence Minus One*) foi realizado para todos os anticorpos do painel, para avaliar a compensação e definir os eventos positivos. As células foram fixadas com paraformaldeído 1% e foram adquiridos 400.000 eventos no citômetro de fluxo LSR Fortessa (BD Biosciences). A análise dos dados obtidos foi realizada utilizando o programa FlowJo v10 (Tree Star, Ashland, OR, USA). Após a criação de estratégias de análise para cada função individual, foi utilizada a plataforma de análise booleana incorporada ao FlowJo, para criar múltiplas combinações possíveis de expressão de citocinas. A subtração do basal e a formatação dos dados exportados do FlowJo foram realizados com o Pestle v.1.6.2. O programa *Simplified Presentation of Incredibly Complex Evaluations* (SPICE) foi utilizado para visualização e obtenção de gráficos tipo pizza, demonstradores das várias combinações obtidas⁶⁶.

Quadro 3: Painel de anticorpos para marcação das células T

	Anticorpo	Fluorocromo	Empresa	Quantidade
1	Viabilidade Live/Dead	PE- Texas red	Invitrogen	
2	CD3	Qdot 605	Invitrogen	0,17 μ L
3	CD4	Horizon V 500	BD	1,25 μ L
4	CD8	PerCP-Cy5.5	BD	2,5 μ L
5	CD 38	Alexa 700	BD	1 μ L
6	IL-17 ^a	Alexa 488	eBioscience	1 μ L
7	IL-22	PE	eBioscience	1 μ L
8	TNF	PE-Cy7	BD	1,5 μ L
9	MIP 1 β	APC-H7	BD	2,5 μ L
10	IFN- γ	Horizon V450	BD	0,7 μ L

3.4 Estatística

A realização da análise estatística dos dados e a construção dos respectivos gráficos, foi através do programa *Graph Pad Prism 5* (Graph Pad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Os testes não-paramétricos de *Mann-Whitney* e *Kruskal-Wallis* foram utilizados respectivamente para comparar dois ou três grupos de dados. A correlação entre os dados foi estabelecida pelo teste de correlação não-paramétrico de Spearman. A diferença entre os grupos analisados foi considerada estatisticamente significativa, quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05.

4 Resultados

4.1 Avaliação dos Adultos com DA

Dos 38 pacientes adultos com DA, sendo 26 homens / 12 mulheres, 36 referiam associação com doença respiratória (5/38=asma, 5/38=rinite, 26/38=ambas) e 2/38 negavam doença respiratória (Figura 6). Com relação à gravidade da doença, 9/38 apresentavam DA leve, 15/38 moderada e 14/38 grave. Destes, 56% tiveram uma ou mais internações em decorrência da dermatose, 25/38 relataram uso de corticoide sistêmico, pelo menos uma vez, durante a(s) crise(s) de DA, e, após breve período de melhora, houve piora rápida do quadro (Tabela 1). A mediana dos níveis séricos de IgE foi 19.750 UI/mL (considerados normais até 100 UI/mL) (Figura 7a). Encontramos uma correlação positiva entre níveis séricos de IgE e gravidade da DA (Figura 7b). Trinta e seis, dentre os 38 pacientes, apresentavam eosinofilia (valores médios de 10,75% - índices considerados normais de 0,0 - 5,0%). Não houve correlação entre IgE sérica e eosinofilia (%) no grupo estudado, tampouco entre eosinofilia (%) e gravidade da DA.

Figura 6: Distribuição níveis séricos de IgE dos adultos com DA, conforme associação ou não com manifestação respiratória (asma e/ou rinite alérgica). Os traços representam a mediana dos níveis séricos de IgE

Tabela 1: Dados demográficos, hospitalização, uso de corticoides sistêmicos e gravidade da doença nos adultos com DA

Pacientes	n = 38
Gênero (homens/mulheres)	26/12
Idade (anos)	19-41
Média de idade	27,68 ± 8,45
Idade de início da DA (anos) / n	0-2 / 9 3-11 / 10 > 12 / 19
EASI (0-72)	Leve – n = 9 Moderado – n = 15 Grave – n = 14
DA	n = 2
DA e asma	n = 5
DA e rinite	n = 5
DA, asma e rinite	n = 26
Internações	n = 22
Uso de corticoide sistêmico	n = 25

Figura 7: Níveis séricos de IgE nos adultos com DA. (a). Níveis séricos totais dos pacientes adultos com DA (n = 38). **(b).** Correlação entre níveis séricos de IgE dos adultos com DA (n = 38), distribuídos conforme a gravidade da doença. Linha horizontal representa a mediana do grupo. $**p \leq 0,01$

4.2 Perfil de secreção de IL-6, IL-17, IL-22 e IL-12p40/IL-23 em células mononucleares do sangue periférico estimuladas com SEA e SEB e no soro por ELISA.

Com o intuito de se analisar a produção de citocinas pró-inflamatórias em resposta às enterotoxinas, foram realizadas culturas de PBMC de 38 pacientes portadores de DA selecionados e 40 controles; a seguir, as PBMC foram estimuladas com SEA e SEB e foi avaliada a produção das citocinas IL-6, IL-17, IL-22 e IL-12p40/IL-23 nos sobrenadantes de cultura. Além disto, foi realizada a dosagem de IL-22 sérica por ELISA.

A Figura 8 mostra que os níveis de IL-6, IL-17 e IL-12p40/IL-23 nos sobrenadantes de cultura de PBMC de pacientes e controles, avaliados pela técnica de ELISA, independente da natureza do estímulo, não exibiram diferenças estatísticas. Entretanto, os níveis de IL-22 induzidos por SEA e SEB no grupo de DA foram significativamente elevados, quando comparados ao grupo controle. Não encontramos relação entre os níveis das referidas citocinas e a gravidade da DA (EASI) (Figura 9).

Da mesma forma, os níveis séricos de IL-22 mostraram-se elevados no grupo DA (Figura 10a), mas não houve relação entre os níveis séricos de IL-22 com a gravidade da doença (EASI) (Figura 10b). Os níveis séricos de IL-6, IL-17 e IL-12p40/IL-23 não foram detectados pela técnica de ELISA.

Estes achados sugeriram o envolvimento da IL-22 na patogênese da DA, e uma possível relação com as enterotoxinas do *S. aureus*.

Figura 8: Secreção de citocinas em sobrenadantes de cultura de PBMC estimulados com SEA e SEB por ELISA. Níveis de IL-6, IL-12p40/IL-23, IL-17 e IL-22 em PBMC, em condições basais e após 48h de estímulo com SEA e SEB e subtração do basal, em pacientes com DA (n = 26) comparados com grupo controle (n = 26). Os traços representam a mediana da secreção das citocinas estudadas. * $p \leq 0,05$

Figura 9: Avaliação da produção de citocinas em PBMC estimuladas com SEA e SEB conforme a gravidade da DA. Distribuição da secreção das citocinas IL-6, IL-12p40/IL-23, IL-17 e IL-22, conforme a escala de gravidade (EASI) dos adultos com DA (n = 26, DA leve = 7, DA moderada = 13, DA grave = 6). Os traços representam a mediana da secreção das citocinas estudadas

Figura 10: Elevação dos níveis séricos de IL-22 na DA. (a) Níveis séricos de IL-22 dos pacientes com DA (n = 40) comparados com o grupo controle (n = 38). (b) Distribuição dos níveis séricos de IL-22 nos adultos com DA (n = 38, DA leve = 9, DA moderada = 19, DA grave = 10), conforme a gravidade da doença (EASI). Os traços representam a mediana da secreção da IL-22. ***p ≤ 0,001

Quadro 4: Perfil de secreção de IL-22 em PBMC estimuladas com SEA e SEB e no soro por ELISA

- A secreção de IL-22, induzida por SEA e SEB, e em amostras de soro no grupo de DA, foi significativamente elevada quando comparados ao grupo controle.

4.3 Expressão de IL-17 em amostras de pele por imuno-histoquímica

Foi avaliada a resposta tecidual inflamatória com enfoque nas células Th17, tanto nos doentes com DA quanto nos controles. A Figura 11 mostra a expressão de IL-17 em biópsias de pele do grupo controle (Figura 11a) e dos pacientes adultos com DA realizada pela técnica de imuno-histoquímica (Figura 11b). Foi encontrado um aumento da expressão de IL-17 nos adultos com DA comparados com os controles (Figura 11c), entretanto, não foi detectada nenhuma correlação entre a expressão desta citocina e a gravidade da DA (EASI) (Figura 11d).

Figura 11: Expressão de IL-17 em biópsias de pele de adultos com DA avaliadas por imuno-histoquímica. Fotografias de lâminas de um indivíduo do grupo controle (a) e de um adulto com DA (b) demonstrando a expressão de IL-17 (200x). (c) Expressão de IL-17 (células/campo) na pele dos controles (n = 25) comparado com os pacientes com DA (n = 32). (d) Correlação entre a gravidade da DA (EASI) e a expressão de IL-17 no grupo com DA. Os traços representam a mediana da expressão da IL-17. ** $p \leq 0,01$

Quadro 5: Expressão de IL-17 em amostras de pele

- Aumento na expressão de IL-17 em amostras de pele de DA por imuno-histoquímica.

4.4 Avaliação dos níveis circulantes de citocinas TH1/TH2/TH17 nos adultos com dermatite atópica por citometria de fluxo

Realizamos também a determinação do perfil de citocinas séricas: IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF, IL-17A e IFN- γ em pacientes com dermatite atópica e controles não atópicos. Vinte e quatro pacientes com dermatite atópica (DA, n = 24) foram comparados com controles saudáveis (n = 26). Todas as citocinas foram testadas por citometria de fluxo - CBA (*Cytometric Bead Array*). Encontramos níveis elevados de IL-2, 5, 6, 10, 17A e IFN- γ no grupo com DA em relação ao grupo controle (Figura 12). Quando comparamos a distribuição dos níveis séricos das citocinas analisadas, conforme a gravidade da DA, detectamos apenas diferença significativa nos níveis circulantes de IL-17A, entre pacientes com DA moderada e grave (Figura 13).

Figura 12: Níveis séricos de citocinas avaliados por citometria de fluxo. Avaliação dos níveis séricos de IL-2, 4, 5, 6, 10, 17A, TNF e IFN- γ de controles (n = 26) e adultos com DA (n = 24) por citometria de fluxo. Os traços representam a mediana dos níveis de citocinas expressos em fg/mL. *p < 0,05, **p ≤ 0,01 e ***p ≤ 0,001

Figura 13: Níveis séricos de citocinas distribuídos conforme a gravidade da doença. Distribuição dos níveis séricos das citocinas IL-2, 4, 5, 6, 10, 17A, TNF e IFN- γ de adultos com DA ($n = 24$) por citometria de fluxo, conforme o escore de gravidade EASI (leve = 9; moderado = 9; grave = 6). Os traços representam a mediana dos níveis de citocinas expressos em fg/mL. * $p < 0,05$

Quadro 6: Níveis circulantes de citocinas Th1/Th2/Th17 nos adultos com dermatite atópica avaliadas por citometria de fluxo

- Níveis séricos elevados de IL-2, 5, 6, 10, 17A e IFN- γ no grupo com DA em relação ao grupo controle.
- Diferença significativa nos níveis circulantes de IL-17A entre pacientes com DA moderada e grave.

4.5 Produção de citocinas intracelulares em células T CD4+/CD8+ estimuladas com SEA e SEB

Em um estudo prévio, demonstramos uma diminuição da resposta proliferativa das PBMC, principalmente frente ao mitógeno SEA, o que evidencia um desequilíbrio imunológico nos pacientes com DA⁶⁴. Uma vez que a IL-17 está relacionada com a patogenia da DA, e a IL-22 ainda não possui função totalmente elucidada na doença, optamos por avaliar o perfil destas citocinas e sua possível relação com as enterotoxinas estafilocócicas nos adultos com DA.

A estratégia de análise das citocinas por citometria de fluxo está demonstrada na Figura 14. Avaliamos então a frequência da produção de IL-17A, IL-22, IFN- γ , TNF e MIP-1 β por células T CD4+/CD8+ induzidas por SEA e SEB (Figura 15a) por citometria de fluxo. Observamos que na DA, a frequência das células T CD4+ em PBMC secretoras de IFN- γ , IL-17A, IL-22 ou TNF mostraram-se reduzidas, após indução por SEA e SEB, quando comparadas ao grupo controle.

Quando avaliamos as células T CD8+, encontramos um perfil diferente das células T CD4+, com uma redução significativa da expressão de TNF sob estímulo de SEB, e aumentada expressão de MIP-1 β na situação basal (Figura 15b).

Não encontramos nenhuma relação entre a gravidade da DA (EASI) e a frequência das citocinas analisadas (Figura 16).

Figura14: Estratégia de análise monofuncional de citocinas. Estratégia de análise representativa com a seleção de populações contendo células T CD3, CD4 e CD8. Cada painel subsequente evidencia apenas a população de interesse de cada citocina estudada, após estímulo com SEA e/ou SEB. Análise booleana foi utilizada para posterior cálculo da polifuncionalidade das células T

Figura 15. SEA/SEB diminui a frequência de células T secretoras de citocinas.

(a) Frequência de células T CD4, positivas para cada citocina (IFN- γ , IL-17A, IL-22, MIP-1 β e TNF) está representada como porcentagem (%) de células T CD4 em situação basal e após estímulo com SEA e SEB, com subtração do basal, comparando controles ($n = 10$) com adultos com DA ($n = 15$). **(b)** Frequência de células T CD8, positivas para cada citocina (IFN- γ , IL-17A, IL-22, MIP-1 β e TNF) em situação basal e após estímulo com SEA e SEB, com subtração do basal, comparando controles ($n = 10$) com adultos com DA ($n = 15$). Os traços representam a mediana dos níveis de cada citocina. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

Figura 16: Frequência de células TCD4+/TCD8+ secretoras de citocinas em distribuídos conforme a gravidade da doença. Distribuição da frequência das citocinas IFN-γ, 17A, IL-22, MIP-1β e TNF de adultos com DA (n = 15), produzidas por células T CD4+, após estímulo com SEA **(a)** e SEB **(c)**; e por células T CD8+, após estímulo com SEA **(b)** e SEB **(d)**, analisadas por citometria de fluxo, conforme o escore de gravidade EASI (leve = 2; moderado = 8; grave = 5). Os traços representam a mediana dos níveis de citocinas expressos em %

Além disso, como controle positivo, nós avaliamos a frequência individual de secreção das referidas citocinas/quimiocina em células T CD4+ e CD8+, após estímulo com PMA/Ionomicina. Observamos o mesmo padrão de inibição de resposta das células T CD4+ e CD8+ na DA com relação à produção das citocinas/quimiocina (Figura 17).

Figura 17: Frequência de células T secretoras de citocinas estimuladas por PMA/Ionomicina. A frequência de células T CD4+ e CD8+ positivas para cada citocina (IFN- γ , IL-17A, IL-22, MIP-1 β e TNF) está representada como porcentagem (%) de células T CD4 ou CD8, em situação basal e, após estímulo com PMA/Ionomicina, com subtração do basal, comparando controles (n = 6) com adultos com DA (n = 3). Os traços representam a mediana dos níveis de cada citocina. *p $\leq$ 0,05

Nossos dados evidenciaram uma resposta comprometida tanto para as enterotoxinas estafilocócicas como para a sinalização da proteína quinase C (PKC), após o estímulo com PMA.

Nós ainda encontramos uma correlação positiva, em situação basal, entre IL-17A e IFN- γ e IL-22, entre MIP-1 β e TNF, e entre IFN- γ e IL-22 e MIP-1 β no grupo com DA (Figura 18). Em contraste, quando fizemos a mesma

avaliação no grupo controle, encontramos apenas correlação positiva entre IL-17A e TNF, e entre IL-17A e IL-22 (dado não demonstrado). Estes resultados evidenciam que há uma correlação positiva entre a produção de citocinas/quimiocina e o perfil inflamatório na DA.

Figura 18: Correlação entre cada citocina/quimiocina secretada por células T CD4+ em situação sem estímulo na DA. Correlação da frequência de células T CD4+ positivas para cada citocina/quimiocina (IFN- γ , IL-17A, IL-22, MIP-1 β and TNF) está representada como porcentagem (%) de células T CD4+ em condição basal nos adultos com DA (n = 15)

Quadro 7: Produção de citocinas intracelulares em células T CD4+/CD8+ estimuladas com SEA e SEB avaliadas por citometria de fluxo

- Reduzida expressão das citocinas IFN- γ , IL-17A, IL-22 ou TNF por células T CD4+ na DA, tanto sob estímulo de SEA quanto de SEB, quando comparadas ao grupo controle.
- Redução significativa da expressão de TNF em células T CD8+ na DA sob estímulo de SEB, e aumentada expressão de MIP-1 β na situação basal.

4.6 Avaliação das células TH22 e TC22 nos pacientes com DA

As células Th22 são caracterizadas por produzir IL-22, mas não secretam IL-17A e IFN- γ ²⁸. Com o intuito de avaliar as células Th22 por citometria de fluxo, excluímos IL-17A e IFN- γ da estratégia de análise (Figura 19a). Definimos como células Th22, as células CD3+CD4+IL-17A-IFN- γ -IL-22+, e como células Tc22, as células CD3+CD8+IL-17A-IFN- γ -IL-22+.

Encontramos um perfil de resposta distinto entre as células Th22 e Tc22 na DA. As células T CD4+ IL-22+ resultaram em resposta reduzida frente aos estímulos SEA e SEB, quando comparamos os pacientes com DA e o grupo controle (Figura 19b). Em contrapartida, quando avaliamos as células T CD8+, encontramos níveis aumentados de IL-22 em situação estimulada com SEA e SEB, comparando adultos com DA e controles (Figura 19c). Estes achados podem indicar que as enterotoxinas estafilocócicas produziram efeito oposto nos subtipos de células T, suprimindo as células Th22 e aumentando as células Tc22 na DA.

Figura 19. Antgenos estafiloccicos induzem efeito oposto nas clulas Th22 e Tc22 circulantes na DA. (a) Estratgia de anlise das clulas Th22 e Tc22 em PBMC. **(b)** A frequncia das clulas Th22+ est representada em porcentagem (%) em clulas T CD4+ em condio basal e, aps estmulo com SEA e SEB (aps subtrao do basal), comparando o grupo controle (n = 10) e os adultos com DA (n = 15). **(c)** A frequncia das clulas Tc22+ est representada como porcentagem (%) em clulas T CD8+ em condio basal e, aps estmulo com SEA e SEB, (aps subtrao do basal), comparando o grupo controle (n = 10) e pacientes com DA (n = 15). Os traos representam a mediana dos nveis das citocinas expressos em %. * p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01.

Quadro 8: Células Th22 e Tc22 nos pacientes com DA avaliadas por citometria de fluxo

- Resposta reduzida das células Th22 aos estímulos SEA e SEB, nos pacientes com DA.
- Resposta elevada de células Tc22 aos estímulos SEA e SEB, nos pacientes com DA.

4.7 Avaliação polifuncional das citocinas produzidas pelas células T CD4+ e CD8+ após estímulo com as enterotoxinas estafilocócicas

A habilidade das células T, em produzir simultaneamente múltiplas citocinas, está associada a respostas imunológicas benéficas⁶⁷. Uma vez que encontramos uma resposta suprimida na produção de citocinas pelas células T, em resposta às enterotoxinas estafilocócicas na DA, especialmente nas células T CD4+, decidimos avaliar o perfil polifuncional das células T CD4+/CD8+ em resposta a SEA e/ou SEB. A combinação de 5, 4 ou 3 citocinas secretadas (IFN- γ , IL-17A, IL-22, MIP-1 β and TNF) por cada tipo celular foi analisada, utilizando-se a estratégia de análise booleana.

Não detectamos diferença significativa comparando-se os pacientes com DA e controles, em situação não estimulada (basal). A combinação de 5 ou 4 citocinas secretadas por células T CD4+ em resposta aos estímulos SEA e SEB não evidenciou nenhuma diferença entre os grupos controle e DA (Figura 19). Entretanto, nos pacientes com DA, observamos diminuição da resposta das células T CD4+, secretando 3 combinações como IFN- γ , IL-22 e TNF ou IL-17A, IL-22 e TNF, quando comparados aos controles (Figura 20). Perfil semelhante com redução da secreção de citocinas por células T CD8+ foi encontrado sob estímulo com SEA e SEB (Figura 21).

A secreção das citocinas estudadas, seja individualmente ou simultaneamente em resposta às enterotoxinas estafilocócicas, mostrou-se reduzida, refletindo um desequilíbrio funcional das células T CD4+ nos pacientes com DA.

Figura 20: Resposta polifuncional alterada das citocinas induzidas por SEA e SEB em células T CD4+ na DA. Análise funcional da frequência (%) das células T CD4+, positivas para cada citocina (IFN- γ , IL-17A, IL-22, MIP-1 β e TNF) com 5, 4 e 3 combinações em condição basal e sob estímulo com SEA e SEB, no pacientes com DA (n = 15), comparados com grupo controle (n = 10) por citometria de fluxo. Os traços representam a mediana dos níveis da combinação das citocinas expressos em %. *p $\leq$ 0,05, **p $\leq$ 0,01

Figura 21: Resposta polifuncional das citocinas induzidas por SEA e SEB em células T CD8+ na DA. Análise funcional da frequência (%) das células T CD8+, positivas para cada citocina (IFN-γ, IL-17A, IL-22, MIP-1β e TNF) com 5, 4 e 3 combinações em condição basal e sob estímulo com SEA e SEB, no pacientes com DA (n = 15), comparados com grupo controle (n = 10) por citometria de fluxo. Os traços representam a mediana dos níveis da combinação das citocinas expressos em %. *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01

Quadro 9: Análise polifuncional das citocinas produzidas por células T CD4+ e CD8+ após estímulo com SEA e SEB

- Diminuição da resposta das células T CD4+/ CD8+ secretando combinações de 3 citocinas, como IFN- γ , IL-22 e TNF ou IL-17A, IL-22 e TNF, quando comparados aos controles frente a SEA e SEB.
- Alteração funcional das células T CD4+ nos pacientes com DA, em resposta às enterotoxinas estafilocócicas, devido à redução da secreção das citocinas, quer seja ela individual ou simultânea.

4.8 Frequência ex vivo de células T CD4+CD38+ polifuncionais na dermatite atópica

A expressão de CD38 em células T se destaca entre os biomarcadores de ativação crônica na infecção por HIV, mas ainda com poucas evidências ligando este marcador à disfunção das células T⁶¹. Visto que a DA é uma doença com colonização cutânea crônica por *S. aureus*, visamos analisar a expressão de CD38 em células T CD4+ / CD8+ (IL-17A, IL-22, IFN- γ , MIP-1 β e TNF), com possível influência das enterotoxinas estafilocócicas.

A estratégia de análise das células CD38+ está demonstrada na Figura 22. Interessantemente, observamos alta frequência nos níveis basais de células T CD4+ secretando 5, 4 ou 3 combinações de citocinas, na dependência de expressão de CD38 (Figura 23a). Em 8/9 combinações de citocinas, detectamos um aumento da produção basal em células T CD4+ na DA, quando comparados com os controles. Em contraste, quando avaliamos as células T CD4+ na ausência de CD38, nenhuma secreção de citocinas foi identificada nos adultos com DA.

Após estímulo com SEA, as células T CD4+CD38+ do grupo com DA apresentaram níveis aumentados de 4 ou 3 combinações de citocinas, quando comparados com o grupo controle. Por outro lado, na ausência de CD38, apenas o grupo controle evidenciou aumento na produção da combinação de citocinas/quimiocina, após estímulo com SEA ou SEB (Figuras 23b e c). Estes

achados indicaram que na DA há inibição de resposta ao SEA/SEB que também acomete as células polifuncionais, em contraste com o grupo controle.

A Figura 23d mostra a representação gráfica da combinação da expressão de 5, 4 ou 3 citocinas/quimiocina estimuladas com SEA e SEB. Observamos que, na presença de CD38, os pacientes com DA expressam mais citocinas/quimiocina do que o grupo controle, enquanto o inverso ocorre na ausência de CD38.

Figura 22: Estratégia de análise de células T CD4⁺CD38⁺. Estratégia de análise representativa com seleção de populações contendo células T CD4⁺CD38⁺ / CD4⁺CD38⁻. Estratégia de análise semelhante foi utilizada para avaliar as células CD8⁺ (dado não ilustrado). Cada painel subsequente mostra apenas a população de interesse produzindo cada citocina/quimiocina estudada após estímulo com SEA e SEB (dado não ilustrado). Análise booleana foi utilizada para posterior cálculo da polifuncionalidade das células T CD38⁺

Figura 23: Elevada frequência *ex vivo* de células T CD4+CD38+ polifuncionais associadas a uma resposta alterada para SEA e SEB na DA. Análise funcional da frequência (%) de células T CD4+ positivas para cada citocina/quimiocina (IL-17A, IL-22, IFN- γ , MIP-1 β and TNF) com 5, 4 e 3 combinações em situação basal **(a)** e, após estímulo com SEA **(b)** e SEB **(c)**, nos pacientes com DA (n = 15), comparados com grupo controle (n = 10), por citometria de fluxo, na presença ou ausência de CD38. Os traços representam a mediana de secreção de cada combinação de citocinas/quimiocina. *p $\leq$ 0,05, **p $\leq$ 0,01, ***p $\leq$ 0,001. **(d)** Representação em gráfico de pizza do perfil funcional das células T. As pizzas representam a capacidade das células T em secretar 5, 4 ou 3 citocinas/quimiocina (IL-17A, IL-22, IFN- γ , MIP-1 β e TNF)

Com relação às células T CD8+, observamos resultados similares aos das células T CD4+, tanto na presença quanto na ausência de CD38 (Figura 24). A estratégia de análise foi a mesma para células T CD4+.

Figura 24: Frequência de células T CD8+CD38+ polifuncionais em resposta a SEA e SEB na DA. Análise funcional da frequência (%) de células T CD8+ positivas para cada citocina/quimiocina (IL-17A, IL-22, IFN- γ , MIP-1 β and TNF) com 5, 4 e 3 combinações em situação basal e, após estímulo com SEA e SEB, nos pacientes com DA (n = 15), comparados com grupo controle (n = 10), por citometria de fluxo, na presença ou ausência de CD38. Os traços representam a mediana de secreção de cada combinação de citocinas/quimiocina. * p $\leq$ 0,05, **p $\leq$ 0,01, ***p $\leq$ 0,001

Nossos achados indicaram que as células T polifuncionais *ex vivo* apresentaram-se cronicamente ativadas na DA e, sob estímulo com SEA/SEB, mostraram uma resposta reduzida, uma vez que estes estímulos não aumentaram a polifuncionalidade das células T CD4⁺ CD38⁻.

Quadro 10: Análise polifuncional das citocinas produzidas por células T CD38⁺ após estímulo com SEA e SEB

- **Aumento na frequência dos valores basais de células T CD38⁺ polifuncionais na DA, indicando que as células T polifuncionais *ex vivo* estão cronicamente ativadas.**
- **Resposta reduzida das células T CD38⁺ polifuncionais ao SEA/SEB na DA, em contraste com as células T CD38⁺ do grupo controle, responsivas aos antígenos estafilocócicos.**

5 Discussão

A dermatite atópica é uma das dermatoses mais frequentes que atinge a população pediátrica; entretanto, em cerca de 40% dos pacientes pode progredir para a forma adulta. A DA do adulto constitui um grupo complexo, no qual a doença afeta de forma relevante a dinâmica pessoal e familiar².

A participação de citocinas inflamatórias na DA é relevante, mostrando um padrão bifásico de resposta imune na pele, dependendo da fase da enfermidade: predomínio do perfil de secreção de citocinas Th2 na fase aguda, e do perfil Th1 na fase crônica. Entretanto, o paradigma Th1/Th2 na DA tem sido recentemente revisado, incluindo o papel de uma nova população de células TCD4+, assim denominadas de Th17, secretoras de IL-17. As células Th17 estão envolvidas na proteção contra patógenos bacterianos, mas também podem ser cruciais na patogênese de várias dermatoses inflamatórias crônicas³⁰. Fator transformador de crescimento (TGF)- β , IL-1 β , IL-6 e IL-23 parecem ser os fatores-chave envolvidos na transformação das células Th naive no fenótipo Th17, distinguindo assim as células Th17 das populações Th1 e Th2. Estas células, por sua vez, caracterizam-se por produzir citocinas inflamatórias, como IL-17A, IL-17F, IL-22 e IL-26, mas seu papel nas doenças alérgicas permanece pouco esclarecido³³⁻³⁵.

Nos doentes de DA analisados, a produção de citocinas por PBMC induzidas por SEA e SEB mostrou perfil similar de secreção de IL-6, IL-12p40/IL-23 e IL-17 em relação aos controles. A avaliação de IL-17 secretada por células mononucleares, em resposta ao estímulo com os superantígenos, deve compreender várias populações como células TCD8+, células NK, células γ/δ e as células iNKT⁶⁸. Em análise imuno-histoquímica das lesões agudas de DA, há evidências do aumento da IL-17, o que não se observa nas lesões crônicas⁶⁹. No sangue periférico de doentes de DA é descrita correlação positiva das células Th17 com a gravidade da doença²¹. Um outro achado interessante é a descrição de que a alfa-toxina do *S. aureus* induz elevada secreção de IL-17A pelas células TCD4+ na DA²³. Nosso estudo

analisou a frequência de células TCD4+ secretoras de IL-17 e IL-22 no intuito de se avaliar possível influência das células Th17 circulantes, como também no tecido na patogênese da DA do adulto.

A análise de IL-17 por imuno-histoquímica, em biópsias de pele, evidenciou aumento dos níveis desta citocina no grupo com DA comparado com controles. Quando avaliamos os níveis séricos circulantes de citocinas por CBA, observamos níveis mais elevados de IL-2, 5, 6, 10, 17A e IFN- γ , em pacientes com DA, quando comparados com os controles. A resposta inflamatória na DA mostrou um perfil misto de citocinas séricas do tipo pró-inflamatório, as quais representam a secreção a partir de variados tipos celulares, que podem incluir as células Th1 / Th2 / Th17. Curiosamente, não foi observada relação significativa entre os níveis circulantes de citocinas e a gravidade da doença, exceto na secreção de IL-17A, comparando-se DA moderada e grave. Tampouco houve correlação significativa entre os níveis circulantes de IL-17 e a expressão *in situ* desta proteína analisada.

Com relação à IL-22, nossos achados indicam significativo aumento dos níveis séricos de IL-22 nos doentes, independente da gravidade da DA. A secreção de IL-22 induzida por SEA e SEB, analisada através do ELISA, mostrou-se elevada no grupo dos doentes de DA, em relação aos controles. Sabe-se que a IL-22 é membro da família da IL-10, produzida principalmente por células T e células *Natural Killer* (NK) e exerce papel central em doenças inflamatórias com acantose epidérmica, como psoríase^{69, 70} e DA³⁰. As frações SEB e α -toxina de *S.aureus* são potenciais indutoras de IL-22 em células mononucleares e células TCD4+ na DA²⁴.

Quando avaliamos a produção intracelular de citocinas em células T CD4+/CD8+, após estímulo com enterotoxinas estafilocócicas, detectamos aumento dos níveis de IL-22 em pacientes com DA. Além disso, foi detectada diminuição da frequência de células T CD4+, produtoras de IFN- γ , IL-17A, IL-22 e TNF, induzidas por SEA e SEB. Verificamos ainda, resposta suprimida de células CD4 + T sob estímulos com PMA/Ionomicina.

Existem controvérsias quanto aos níveis de IL-17 e IL-22 na DA alguns estudos não mostram diferença nos níveis destas citocinas sob estímulo com

PMA/Ionomicina, em comparação com psoríase³⁰, enquanto outros demonstram níveis elevados de IL-22 em células T CD4+ de pacientes com DA, estimuladas com α -toxina de *S. aureus* e SEB^{23, 24}. Acreditamos que a idade dos pacientes com DA possa influenciar o padrão de resposta a SEA/SEB, uma vez que os adultos são cronicamente estimulados com enterotoxinas estafilocócicas, conduzindo a um estado de ativação crônica e anergia, como foi demonstrado em trabalho prévio do nosso grupo. Neste estudo, evidenciou-se diminuição da resposta proliferativa das PBMC frente aos estímulos: mitógenos (SEA, SEB, fitohemaglutinina-PHA e *pokeweed*-PWM) e antígenos (*Candida albicans*-CMA e toxóide tetânico-TT)⁶⁴. A maioria dos estudos de DA relacionados a superantígenos estafilocócicos incluem tanto crianças como adultos, e outros sequer especificam a idade dos sujeitos analisados.

Além da estimulação antígeno-específica, os pacientes com DA apresentaram redução *in vitro* da sinalização via PKC para IFN- γ , IL-22, TNF e IL-17, em células T CD4+/CD8+. O PMA ativa especificamente a PKC ao entrar na célula, enquanto inicia uma série de eventos de sinalização e induz Ras/Raf (*serine/threonine-specific protein kinases*), MEKK (*mitogen-activated protein kinase kinase*), MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) e IKK (*inhibitor of Kappa β kinase*)⁷¹. A Ionomicina é um ativador da via do Ca²⁺, da calcineurina, do NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) e, em conjunto com PMA, pode simular a ativação completa, via sinalização do receptor de células T e co-estimulação. Além disso, estudo prévio do nosso grupo mostrou inibição da resposta proliferativa antigênica a mitógenos e SEA em adultos com DA⁶⁴. Têm sido descrito tanto aumento dos níveis de IL-17 em PBMC estimuladas com PMA/Ionomicina em crianças e em adultos com DA²¹, bem como diminuição de células circulantes Th17 em PBMC, estimuladas com PMA/Ionomicina⁹. Nossos resultados evidenciaram que na DA, ambas as subpopulações de células T apresentaram-se anérgicas frente às enterotoxinas estafilocócicas e com uma resposta deficiente via PKC.

Nossos resultados *in vitro* indicaram que as enterotoxinas estafilocócicas têm efeitos opostos sobre os subtipos de células T, suprimindo as células

Th22, e aumentando as células Tc22 na DA, em comparação com o grupo controle. A resposta funcional das células T CD8+ na DA, sob estimulação com SEA/SEB, parece estar preservada quando comparada com as células T CD4+. No entanto, são descritas frequências semelhantes de células Th22 e Tc22 circulantes, em DA e psoríase, estimuladas com PMA/Ionomicina³⁰, provavelmente devido a alterações das células T CD8+ já descritas na psoríase⁷². Nossos dados prévios demonstraram que há uma importante inibição tanto da resposta proliferativa antígeno-específica como por ativadores policlonais⁶⁴, sugerindo que pode ser reflexo de um perfil anérgico das células TCD4+, decorrente da diminuída produção de citocinas aos estímulos.

Um outro estudo relata que a DA grave é caracterizada por expansão seletiva de células Th2/Tc2 e Th22/Tc22 circulantes, e não de células Th17/Tc17 na população de células T que fazem o *skin-homing*, avaliadas através da expressão de células T CLA+ (*cutaneous lymphocyte antigen*) estimuladas com PMA/Ionomicina. A única citocina que se mostrou aumentada foi a IL-13, dentre as citocinas Th1/Tc1, Th2/Tc2, Th22/Tc22 e Th17/Tc17 avaliadas independentemente da expressão de CLA⁷³.

Para melhor avaliação da magnitude do perfil funcional das células T CD4+/CD8+, secretoras de múltiplas citocinas, realizamos análise pioneira multiparamétrica por citometria de fluxo na DA. Heterogeneidade funcional com redução da secreção de 3 ou 4 combinações de citocinas/quimiocinas em células T CD4+, em resposta a SEA e SEB, foi detectada nos pacientes com DA em comparação com os controles. Perfil semelhante de secreção de citocinas/quimiocinas foi encontrada sob estímulo com SEA e SEB nas células T CD8+. Os dados de polifuncionalidade reforçam o efeito de regulação negativa da presença das enterotoxinas estafilocócicas na secreção de citocinas/quimiocinas pelas células T.

A expressão de CD38 em células T CD4+CD38+ de memória, em indivíduos infectados pelo HIV, após ativação policlonal induzida pelo superantígeno SEB, tem sido reportada⁷⁴, sendo o CD38 um biomarcador da ativação crônica na infecção pelo HIV⁶¹. Nossos resultados, após estímulos com SEA e SEB e análise das células CD38+, mostraram que: 1) pacientes

com DA (*ex vivo*) possuem células T CD4⁺ de memória, preservadas na presença de CD38; 2) células T CD4⁺ de pacientes com DA, sob estímulo com as enterotoxinas estafilocócicas *in vitro*, associadas à ausência da expressão de CD38, contribuem com cronicidade da doença e a inflamação persistente. Esta coorte de pacientes possui histórico de longa duração da doença (mediana de 20,5 anos), enfatizando-se a cronicidade DA, corroborada por seu *status* pró-inflamatório¹⁵.

Nossos achados evidenciaram que, na DA, a ativação crônica com superantígenos estafilocócicos possa contribuir com a alta frequência de células T CD4⁺ CD38⁺ polifuncionais e com a resposta polifuncional anérgica, mediadas por células T CD38⁻. Assim, esta análise corrobora o papel patogênico das enterotoxinas estafilocócicas na DA e reforça a necessidade de se aprimorar o conhecimento das bases da etiopatogenia desta enfermidade.

6 Conclusões

- O aumento de IL-22, tanto em sobrenadantes de cultura estimulados com SEA e SEB quanto no soro, avaliados por ELISA, sugeriram o envolvimento desta citocina na patogênese da DA e uma possível relação com as enterotoxinas do *S. aureus*.
- O aumento na expressão de IL-17 na pele dos pacientes de DA, através da técnica de imuno-histoquímica, corroborou o papel pró-inflamatório desta citocina.
- Os níveis séricos elevados de IL-2, 5, 6, 10, 17A e IFN- γ no grupo com DA, em relação ao grupo controle, reforçaram o papel pró-inflamatório das citocinas de perfil misto de resposta Th1 / Th2 / Th17 na perpetuação da inflamação na DA.
- A reduzida expressão das citocinas IFN- γ , IL-17A, IL-22 ou TNF por células T CD4+, tanto sob estímulo de SEA quanto de SEB, nos pacientes com DA, indicaram que a alteração funcional das células T CD4+, em resposta às enterotoxinas estafilocócicas, seja na secreção mono ou polifuncional, fortaleceriam o papel anérgico exercido por estas enterotoxinas na DA *in vitro*.
- O aumento na frequência dos valores basais de células T CD4+CD38+ polifuncionais na DA indicou que as células T polifuncionais *ex vivo* estavam cronicamente ativadas nesta enfermidade.
- A resposta reduzida das células T CD38+ polifuncionais aos estímulos SEA/SEB na DA, em contraste com o grupo controle, sugeriram que os pacientes com DA permaneceriam cronicamente estimulados com as enterotoxinas estafilocócicas, indicando potencial estado anérgico frente a esta relevante estimulação antigênica.

-
- Nossos dados sugeriram que as células T *ex vivo* polifuncionais refletiram a intensa estimulação antigênica, decorrente do defeito da barreira cutânea, e serviriam como potenciais alvos terapêuticos.
 - A resposta reduzida das células Th22 e elevada de células Tc22, frente aos estímulos SEA e SEB, nos pacientes com DA, evidenciaram a capacidade de modulação das enterotoxinas estafilocócicas na DA do adulto. Linfócitos T CD8+ (Tc22) mostraram-se menos refratários a esta anergia, justificada por possível mecanismo compensatório frente ao déficit apresentado pelas células T CD4+.

7 Anexos

ANEXO 1

Nome: _____ RG: _____

**Critérios diagnósticos da dermatite atópica
Hanifin & Rajka****Deve ter 3 ou mais características básicas:**

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

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

- () Xerose
- () Ictiose
- () Hiperlinearidade palmar
- () Queratose pilar
- () Reatividade imediata a testes cutâneos (tipo I)
- () IgE sérica elevada
- () Início em idade precoce
- () Tendência a infecções cutâneas (especialmente *Staphylococcus aureus* e herpes simples)
- () Imunidade mediada por células diminuída
- () Tendência a dermatite de mão ou de pé não específica
- () Eczema no mamilo
- () Queilite
- () Conjuntivite recorrente
- () Prega infraorbital de Dennie-Morgan
- () Ceratocone
- () Catarata subcapsular anterior e/ou posterior
- () Escurecimento orbital
- () Palidez facial/eritema facial
- () Pitíriase alba
- () Dobra anterior do pescoço
- () Prurido provocado pelo suor
- () Intolerância a fio de lã e solventes lipídicos
- () Acentuação perifolicular
- () Intolerância alimentar
- () Curso influenciado por fatores ambientais/emocionais
- () Dermografismo branco/branqueamento tardio

ANEXO 2

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 26/05/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0007/10**, intitulado: **"AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CÉLULAS TH17 NA DERMATITE ATÓPICA DO ADULTO: RESPOSTA PROLIFERATIVA E PRODUÇÃO DE CITOCINAS DE CÉLULAS MONONUCLEARES FRENTE ÀS ENTEROTÓXINAS A E B DO STAPHYLOCOCCUS AUREUS "** apresentado pelo Departamento de **DERMATOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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. Valéria Aoki**

Pesquisador (a) Executante: **Raquel Leão Orfali**

CAPPesq, 28 de Maio de 2010

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

ANEXO 3**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME: :.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: “ Avaliação do perfil de células Th17 na dermatite atópica do adulto: resposta proliferativa e produção de citocinas de células mononucleares frente às enterotoxinas A e B do *Staphylococcus aureus*”

PESQUISADOR : ..Raquel Leão Orfali.....

CARGO/FUNÇÃO: ..Médica..... INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº ..86689.....

UNIDADE DO HCFMUSP: ..Departamento de Dermatologia.....

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO (X)

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐

RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos.....

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

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

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

Os exames serão feitos no laboratório LIM-56 (hospital das clínicas-FMUSP), sem nenhum custo para o paciente, que pode aproveitar o dia das consultas para colher os exames. Os pacientes continuarão a ser acompanhados como sempre no ambulatório de dermatite atópica. Se houver a necessidade de mais algum exame, o paciente que concordar com o estudo poderá ser ainda convocado via telefone ou carta para vir a uma consulta, mesmo antes do seu retorno e terá toda a informação e assistência que precisar. Todos os pacientes terão acesso aos resultados de seus exames no momento em que quiserem e com as explicações necessárias para seu entendimento.

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

Possíveis desconfortos e riscos esperados: Será coletada amostra de sangue de uma veia. Durante a coleta de sangue pode haver uma dor mínima, parecida com uma picada de formiga, e pode ficar uma mancha roxa no local que desaparece em poucos dias. Algumas pessoas podem às vezes sentir tonturas ou até desmaio após a coleta de sangue, e mais raramente pode haver infecção no local que entrou a agulha na pele.

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

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

Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os investigadores

são as Dras. Valéria Aoki e Raquel Leão Orfali, que podem ser encontradas no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, 5º. Andar, PAMB-Dermatologia CEP: 05403-000, Telefone(s) (11) 3069-6398. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-644 ramal 26, e-mail: cappesq@hcnet.usp.br.

Confidencialidade e liberação dos registros médicos: Apenas os médicos envolvidos no estudo terão, além do próprio paciente, acesso aos resultados dos exames, bem como à identificação dos mesmos. Em nenhum momento do estudo o paciente será identificado pelo nome e também em nenhuma publicação resultante do estudo em questão. Os dados e materiais obtidos serão utilizados única e exclusivamente para esta pesquisa.

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

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: “Avaliação do perfil de células Th17 na dermatite atópica do adulto: resposta proliferativa e produção de citocinas de células mononucleares frente às enterotoxinas A e B do *Staphylococcus aureus*”.

Eu discuti com a Dra. *Raquel Leão Orfali* sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

_____ Data ____ / ____ / ____
Assinatura do paciente/representante legal

_____ Data ____ / ____ / ____
Assinatura da testemunha

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto) Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

_____ Data ____ / ____ / ____
Assinatura do responsável pelo estudo

ANEXO 4

Nome: _____ RG: _____

EASI

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

Adultos:

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

Porcentagem de área envolvida par cada uma das 4 regiões:

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

Sinais:

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

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

Total:

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

ANEXO 5

Tabela 2: Distribuição dos pacientes adultos com DA conforme gravidade da doença, gênero, dosagem de IgE sérica, porcentagem de eosinófilos no sangue, antecedentes pessoais de atopia e infecções e tempo de evolução da doença

Identificação	Gênero	Idade	EASI	IgE (UI/mL)	Eosinófilos %	AP de MR	Tempo de evolução da DA	AP de infecções (bacterianas ou virais)
PC1	M	30	48,4	18300	6,6	asma	14	EVK, SA
PC2	F	22	25	40100	8,2	asma, rinite	19	HS, SA
PC3	F	29	40,6	59500	19,4	rinite	29	EVK, SA, MC, VV, HS
PC4	M	21	47,7	39100	11,3	asma, rinite	18	EVK, SA, HS, HZ
PC5	F	43	33,5	2680	5,7	asma	19	SA
PC6	M	28	40,2	16700	6,4	asma, rinite	23	SA
PC7	M	24	47,9	3120	10,1	asma, rinite	32	EVK, SA
PC8	F	22	10,3	26200	7,8	asma, rinite	25	EVK, SA, HS
PC9	M	37	47,4	59900	5,1	asma, rinite	23	SA
PC10	M	43	18,4	28300	12,7	asma, rinite	21	SA
PC11	F	22	31,6	40100	8,2	asma, rinite	23	SA
PC12	F	24	49	21200	5,2	asma	25	SA
PC13	M	22	17,8	3400	8,7	asma	3	SA
PC14	M	24	50	46300	22	asma, rinite	28	VV, SA
PC15	M	39	35,4	5080	6,7	asma, rinite	22	EVK, SA
PC16	M	20	24,7	26900	36,1	asma, rinite	4	SA
PC17	M	19	25,9	67500	6,4	asma, rinite	21	MC, SA
PC18	M	34	35,8	5530	13,2	asma, rinite	33	VV, HS, SA
PC19	M	24	35	30000	15,2	rinite	5	EVK, HS, SA
PC20	M	20	14,4	4910	7,6	asma, rinite	16	EVK, HS, SA
PC21	M	21	48,2	54200	9,9	asma, rinite	9	EVK, VV, SA
PC22	M	28	47,1	23300	9,1	asma, rinite	17	HS, SA
PC23	M	31	41,9	23800	25	rinite	17	SA
PC24	M	29	11,2	4070	14,2	asma, rinite	28	SA
PC25	M	21	38,5	2870	6,8	asma, rinite	17	SA
PC26	F	42	8,6	5180	9,9	rinite	17	EVK, SA
PC27	M	27	51	37600	5,1	asma	22	SA
PC28	M	19	22	4140	5,9	rinite, asma	19	SA
PC29	F	28	70	45900	14	rinite, asma	21	EVK, HS, HZ
PC30	M	24	45,8	13100	12	nega	4	ndn
PC31	F	48	8,7	343	1,1	asma, rinite	30	MC, HS, VG, SA
PC32	M	48	41,4	34800	14,9	asma, rinite	20	EVK, HS, VV, SA
PC33	F	20	34,8	119000	5,5	nega	9	MC, SA
PC34	F	25	31,2	13400	9,2	rinite	22	EVK, SA
PC35	M	28	35,2	5260	6,6	asma, rinite	28	SA
PC36	M	19	35,2	58400	24,2	asma, rinite	14	EVK, HZ, SA
PC37	F	31	12	3400	6,9	asma, rinite	26	EVK, HZ, SA
PC38	M	19	21,4	6050	10,7	asma, rinite	16	EVK, SA

M = masculino; F = feminino; EASI = *eczema area and severity index*; DA = dermatite atópica; AP = antecedentes pessoais; MR = manifestação respiratória; MC = molusco contagioso; EVK = erupção variceliforme de Kaposi; HS = herpes simples; HZ = herpes zoster; VV = verruga vulgar; VG = verruga genital; SA = infecção por *Staphylococcus aureus*.

ANEXO 6

Tabela 3: Dados demográficos do grupo controle

Identificação	Idade	Sexo
C1	21	F
C2	35	F
C3	29	M
C4	20	F
C5	21	F
C6	31	M
C7	26	M
C8	25	F
C9	24	M
C10	43	F
C11	25	F
C12	30	M
C15	29	M
C14	25	M
C13	28	M
C16	27	F
C17	53	M
C18	31	M
C19	43	M
C20	46	M
C21	33	M
C22	30	F
C23	26	F
C25	25	F
C24	31	M
C26	51	F
C27	52	F
C28	19	F
C29	22	F
C32	28	F
C30	41	F
C31	40	F
C33	29	M
C34	41	F
C35	24	M
C38	26	F
C36	38	F
C37	24	M
C39	26	M
C40	26	F

M = masculino; F = feminino.

8 Referências

1. Hanifin JM. Atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*. 1982;6(1):1-13.
2. Leung DY. New insights into atopic dermatitis: role of skin barrier and immune dysregulation. *Allergol Int*. 2013;62(2):151-61.
3. Leung DY. Pathogenesis of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104(3 Pt 2):S99-108.
4. Orfali RL, Shimizu MM, Takaoka R, Zaniboni MC, Ishizaki AS, Costa AA, et al. Atopic dermatitis in adults: clinical and epidemiological considerations. *Rev Assoc Med Bras*. 2013;59(3):270-5.
5. Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA. New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest*. 2004;113(5):651-7.
6. Hanifin JM, Rajka G. Diagnostic Features of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*. 1980;92(suppl):44-7.
7. Elias PM, Schmutz M. Abnormal skin barrier in the etiopathogenesis of atopic dermatitis. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2009;9(5):437-46.
8. Leung DY, Soter NA. Cellular and immunologic mechanisms in atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*. 2001;44(1 Suppl):S1-S12.
9. Hayashida S, Uchi H, Moroi Y, Furue M. Decrease in circulating Th17 cells correlates with increased levels of CCL17, IgE and eosinophils in atopic dermatitis. *J Dermatol Sci*. 2011;61(3):180-6.
10. Leung DYM. New Insights into Atopic Dermatitis: Role of Skin Barrier and Immune Dysregulation. *Allergology International*. 2013;62(2):151-61.

11. Orfali RL, Sato MN, Dos Santos VG, Titz TO, Duarte AS, Takaoka R, et al. Atopic dermatitis in adults: Augmented circulating IgG4 and IgE antibodies against *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013;133:S44-S.
12. Pugliarello S, Cozzi A, Gisondi P, Girolomoni G. Phenotypes of atopic dermatitis. *Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 2011;9(1):12-20.
13. Peng W, Novak N. Pathogenesis of atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy*. 2015;45(3):566-74.
14. Addor FA, Takaoka R, Rivitti EA, Aoki V. Atopic dermatitis: correlation between non-damaged skin barrier function and disease activity. *International journal of dermatology*. 2012;51(6):672-6.
15. Batista DI, Perez L, Orfali RL, Zaniboni MC, Samorano LP, Pereira NV, et al. Profile of skin barrier proteins (filaggrin, claudins 1 and 4) and Th1/Th2/Th17 cytokines in adults with atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014.
16. Hoffjan S, Stemmler S. On the role of the epidermal differentiation complex in ichthyosis vulgaris, atopic dermatitis and psoriasis. *Br J Dermatol*. 2007;157(3):441-9.
17. Verdier-Sevrain S, Bonte F. Skin hydration: a review on its molecular mechanisms. *J Cosmet Dermatol*. 2007;6(2):75-82.
18. De Benedetto A, Agnihothri R, McGirt LY, Bankova LG, Beck LA. Atopic dermatitis: a disease caused by innate immune defects? *J Invest Dermatol*. 2009;129(1):14-30.
19. Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. Staphylococcal enterotoxins. *Toxins (Basel)*. 2010;2(8):2177-97.

-
20. Turksen K, Troy TC. Barriers built on claudins. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 12):2435-47.
 21. Koga C, Kabashima K, Shiraishi N, Kobayashi M, Tokura Y. Possible pathogenic role of Th17 cells for atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2008;128(11):2625-30.
 22. Gittler JK, Shemer A, Suarez-Farinas M, Fuentes-Duculan J, Gulewicz KJ, Wang CQ, et al. Progressive activation of T(H)2/T(H)22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130(6):1344-54.
 23. Niebuhr M, Gathmann M, Scharonow H, Mamerow D, Mommert S, Balaji H, et al. Staphylococcal alpha-toxin is a strong inducer of interleukin-17 in humans. *Infect Immun.* 2011;79(4):1615-22.
 24. Niebuhr M, Scharonow H, Gathmann M, Mamerow D, Werfel T. Staphylococcal exotoxins are strong inducers of IL-22: A potential role in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2010.
 25. Fujita H. The role of IL-22 and Th22 cells in human skin diseases. *J Dermatol Sci.* 2013;72(1):3-8.
 26. Auriemma M, Vianale G, Amerio P, Reale M. Cytokines and T cells in atopic dermatitis. *European cytokine network.* 2013;24(1):37-44.
 27. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med.* 2006;203(10):2271-9.
 28. Duhon T, Geiger R, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol.* 2009;10(8):857-63.

-
29. Matsuzaki G, Umemura M. Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. *Microbiol Immunol.* 2007;51(12):1139-47.
 30. Nograles KE, Zaba LC, Shemer A, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Kikuchi T, et al. IL-22-producing "T22" T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123(6):1244-52 e2.
 31. Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, Kamradt T. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol.* 2000;165(11):6107-15.
 32. Romagnani S. Human Th17 cells. *Arthritis research & therapy.* 2008;10(2):206.
 33. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med.* 2007;204(8):1849-61.
 34. Di Cesare A, Di Meglio P, Nestle FO. A role for Th17 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis? *J Invest Dermatol.* 2008;128(11):2569-71.
 35. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:485-517.
 36. Tanasescu C, Balanescu E, Balanescu P, Olteanu R, Badea C, Grancea C, et al. IL-17 in cutaneous lupus erythematosus. *European journal of internal medicine.* 2010;21(3):202-7.
 37. Rodriguez-Reyna TS, Furuzawa-Carballeda J, Cabiedes J, Fajardo-Hermosillo LD, Martinez-Reyes C, Diaz-Zamudio M, et al. Th17 peripheral cells are increased in diffuse cutaneous systemic sclerosis compared with limited illness: a cross-sectional study. *Rheumatology international.* 2012;32(9):2653-60.

-
38. Pagliari C, Fernandes ER, Stegun FW, da Silva WL, Seixas Duarte MI, Sotto MN. Paracoccidioidomycosis: cells expressing IL17 and Foxp3 in cutaneous and mucosal lesions. *Microbial pathogenesis*. 2011;50(5):263-7.
 39. Zhao Y, Balato A, Fischelevich R, Chapoval A, Mann DL, Gaspari AA. Th17/Tc17 infiltration and associated cytokine gene expression in elicitation phase of allergic contact dermatitis. *Br J Dermatol*. 2009;161(6):1301-6.
 40. Bi Y, Liu G, Yang R. Th17 cell induction and immune regulatory effects. *J Cell Physiol*. 2007;211(2):273-8.
 41. Caruso R, Pallone F, Monteleone G. Emerging role of IL-23/IL-17 axis in H pylori-associated pathology. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2007;13(42):5547-51.
 42. Zhang L, Yang XQ, Cheng J, Hui RS, Gao TW. Increased Th17 cells are accompanied by FoxP3(+) Treg cell accumulation and correlated with psoriasis disease severity. *Clinical immunology*. 2010;135(1):108-17.
 43. Boos AC, Hagl B, Schlesinger A, Halm BE, Ballenberger N, Pinarci M, et al. Atopic dermatitis, STAT3- and DOCK8-hyper-IgE syndromes differ in IgE-based sensitization pattern. *Allergy*. 2014;69(7):943-53.
 44. Liu Y, Yang B, Zhou M, Li L, Zhou H, Zhang J, et al. Memory IL-22-producing CD4+ T cells specific for *Candida albicans* are present in humans. *Eur J Immunol*. 2009;39(6):1472-9.
 45. Truchetet ME, Brembilla NC, Montanari E, Allanore Y, Chizzolini C. Increased frequency of circulating Th22 in addition to Th17 and Th2 lymphocytes in systemic sclerosis: association with interstitial lung disease. *Arthritis research & therapy*. 2011;13(5):R166.
 46. Miyagaki T, Sugaya M, Suga H, Kamata M, Ohmatsu H, Fujita H, et al. IL-22, but not IL-17, dominant environment in cutaneous T-cell lymphoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17(24):7529-38.

-
47. Luan L, Ding Y, Han S, Zhang Z, Liu X. An increased proportion of circulating Th22 and Tc22 cells in psoriasis. *Cellular immunology*. 2014;290(2):196-200.
 48. Matsui K, Nishikawa A, Suto H, Tsuboi R, Ogawa H. Comparative study of *Staphylococcus aureus* isolated from lesional and non-lesional skin of atopic dermatitis patients. *Microbiol Immunol*. 2000;44(11):945-7.
 49. Leung DY. Infection in atopic dermatitis. *Curr Opin Pediatr*. 2003;15(4):399-404.
 50. Ong PY, Leung DY. The infectious aspects of atopic dermatitis. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2010;30(3):309-21.
 51. Leung DY. Atopic dermatitis and the immune system: the role of superantigens and bacteria. *J Am Acad Dermatol*. 2001;45(1 Suppl):S13-6.
 52. Boguniewicz M, Leung DY. Recent insights into atopic dermatitis and implications for management of infectious complications. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(1):4-13; quiz 4-5.
 53. Lin YT, Shau WY, Wang LF, Yang YH, Hwang YW, Tsai MJ, et al. Comparison of serum specific IgE antibodies to staphylococcal enterotoxins between atopic children with and without atopic dermatitis. *Allergy*. 2000;55(7):641-6.
 54. Krakauer T. Update on staphylococcal superantigen-induced signaling pathways and therapeutic interventions. *Toxins (Basel)*. 2013;5(9):1629-54.
 55. Macias ES, Pereira FA, Rietkerk W, Safai B. Superantigens in dermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2011;64(3):455-72.
 56. Zollner TM, Wichelhaus TA, Hartung A, Von Mallinckrodt C, Wagner TO, Brade V, et al. Colonization with superantigen-producing *Staphylococcus aureus* is associated with increased severity of atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy*. 2000;30(7):994-1000.

-
57. Orfali RL. Avaliação da resposta proliferativa das células mononucleares do sangue periférico às enterotoxinas A e B do *Staphylococcus aureus* e dos níveis de interleucina-18 na dermatite atópica do adulto [Dissertação]. <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5133/tde-05052006-095411/>: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2005.
58. Campbell DE, Kemp AS. Proliferation and production of interferon-gamma (IFN-gamma) and IL-4 in response to *Staphylococcus aureus* and staphylococcal superantigen in childhood atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol*. 1997;107(2):392-7.
59. Wehner J, Neuber K. *Staphylococcus aureus* enterotoxins induce histamine and leukotriene release in patients with atopic eczema. *Br J Dermatol*. 2001;145(2):302-5.
60. Huvenne W, Hellings PW, Bachert C. Role of staphylococcal superantigens in airway disease. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013;161(4):304-14.
61. Olvera-Garcia G, Espinosa E, Sieg SF, Lederman MM. Cytomegalovirus-specific responses of CD38+ memory T cells are skewed towards IFN-gamma and dissociated from CD154 in HIV-1 infection. *Aids*. 2014;28(3):311-6.
62. Hanifin JM, Rajka G. Diagnostic Features of Atopic-Dermatitis. *Acta Dermato-Venereologica*. 1980:44-7.
63. Hanifin JM, Thurston M, Omoto M, Cherill R, Tofte SJ, Graeber M. The eczema area and severity index (EASI): assessment of reliability in atopic dermatitis. EASI Evaluator Group. *Exp Dermatol*. 2001;10(1):11-8.
64. Orfali RL, Sato MN, Takaoka R, Azor MH, Rivitti EA, Hanifin JM, et al. Atopic dermatitis in adults: evaluation of peripheral blood mononuclear cells proliferation response to *Staphylococcus aureus* enterotoxins A and B and analysis of interleukin-18 secretion. *Exp Dermatol*. 2009;18(7):628-33.
65. Prasad K, Prabhu GK. Image analysis tools for evaluation of microscopic views of immunohistochemically stained specimen in medical research-a review. *Journal of medical systems*. 2012;36(4):2621-31.

-
66. Roederer M, Nozzi JL, Nason MC. SPICE: exploration and analysis of post-cytometric complex multivariate datasets. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2011;79(2):167-74.
67. Han Q, Bagheri N, Bradshaw EM, Hafler DA, Lauffenburger DA, Love JC. Polyfunctional responses by human T cells result from sequential release of cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(5):1607-12.
68. Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(7):479-89.
69. Toda M, Leung DY, Molet S, Boguniewicz M, Taha R, Christodoulopoulos P, et al. Polarized in vivo expression of IL-11 and IL-17 between acute and chronic skin lesions. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(4):875-81.
70. Boniface K, Guignouard E, Pedretti N, Garcia M, Delwail A, Bernard FX, et al. A role for T cell-derived interleukin 22 in psoriatic skin inflammation. *Clin Exp Immunol*. 2007;150(3):407-15.
71. Severin S, Ghevaert C, Mazharian A. The mitogen-activated protein kinase signaling pathways: role in megakaryocyte differentiation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2010;8(1):17-26.
72. Batista MD, Tincati C, Milush JM, Ho EL, Ndhlovu LC, York VA, et al. CD57 expression and cytokine production by T cells in lesional and unaffected skin from patients with psoriasis. *PLoS One*. 2013;8(2):e52144.
73. Czarnowicki T, Gonzalez J, Shemer A, Malajian D, Xu H, Zheng X, et al. Severe atopic dermatitis is characterized by selective expansion of circulating T2/T2 and T22/T22, but not T17/T17, cells within the skin-homing T-cell population. *J Allergy Clin Immunol*. 2015.
74. Espinosa E, Ormsby CE, Reyes-Teran G, Asaad R, Sieg SF, Lederman MM. Dissociation of CD154 and cytokine expression patterns in CD38+ CD4+ memory T cells in chronic HIV-1 infection. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*. 2010;55(4):439-45.