HELIANA FREITAS DE OLIVEIRA GÓES

**Mecanismos pró-inflamatórios e reguladores na dermatite de contato
alérgica a metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona**

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

Programa de Dermatologia

Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Maria Notomi Sato

São Paulo – 2019

HELIANA FREITAS DE OLIVEIRA GÓES

**Mecanismos pró-inflamatórios e reguladores na dermatite de contato
alérgica a metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona**

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

Programa de Dermatologia

Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Maria Notomi Sato

São Paulo – 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Góes, Heliana Freitas de Oliveira
Mecanismos pró-inflamatórios e reguladores na
dermatite de contato alérgica a
metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona /
Heliana Freitas de Oliveira Góes. -- São Paulo, 2019.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.
Orientadora: Maria Notomi Sato.

Descritores: 1.Dermatite alérgica de contato
2.Aditivos em cosméticos 3.Citocinas 4.Linfócitos T
reguladores 5.Interleucina-10 6.Imunidade inata
7.Interleucina-6

USP/FM/DBD-373/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha família, meu pai Hédio (para sempre em nossos corações), minha mãe Maria, meus irmãos Harley, Jacqueline e Hédio, ao meu marido Renato por todo amor, carinho e força nesta etapa de minha vida.

Agradecimentos Especiais

À Professora Dra. Maria Notomi Sato, por ser um exemplo de humildade, compreensão e competência, além de um exemplo como pesquisadora e profissional. Seus ensinamentos nos fazem entender que o trabalho em grupo, o respeito ao próximo aliados ao carinho e a dedicação são fundamentais para um bom trabalho. Obrigada por todo o apoio intelectual, paciência e incentivo para a execução deste trabalho.

Agradecimentos

A Deus por me propor desafios e me permitir confiar em um resultado positivo.

A meu pai (Hélio - *in memoriam*) e minha mãe (Maria) e meus irmãos (Harley, Jacqueline e Hélio) pelo amor e criação que me deram.

A meu marido (Renato) que com amor, carinho, parceria todo momento esteve presente para me confortar.

A toda minha família que agrega todo apoio emocional, a compreensão e o companheirismo.

À médica e amiga Anangelica Rodrigues Virgens, pela parceria desde o início deste trabalho.

Ao professor Dr. Vitor Manoel Silva dos Reis pela ajuda e direcionamento dos pacientes.

Ao Dr. Gabriel Costa de Carvalho por toda a ajuda prestada, por todo auxílio com a estrutura necessária para este trabalho.

Às mestres e amigas do LIM-56 Anna Cláudia e Anna Júlia por toda a ajuda com o trabalho e a análise dos resultados.

Ao professor Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva pela ajuda com a análise imunohistoquímica.

Aos amigos do LIM-56: Luanda, Josenilson, Yasmin, Yara, Franciane e Milena.

A Noemia, Rosangela e Patricia (setor de Citometria de Fluxo), Tatiana (setor de Cultura Celular), Naiura (Setor de Patologia), Luiz, Lucio, Edna, Evelyn e Cristina (secretaria), Anderson (TI), Daniel (coleta), Silvia e Adriana (limpeza e lavagem) e a todos amigos do LIM-56 que contribuíram direta ou indiretamente para a realização

deste trabalho. E a todos os outros amigos do LIM-56 que contribuíram direta e indiretamente com este trabalho.

À Joyce por toda a ajuda com o escaneamento das lâminas.

Ao Ricardo (setor de Teste de Contato) por toda a ajuda com os pacientes e a todos amigos do Ambulatório de Dermatologia que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2017/12475-4) pelo suporte financeiro.

Ao Fundo de Apoio à Dermatologia de São Paulo - Sebastião Sampaio (FUNADERSP) (74/2018) pelo suporte financeiro.

Aos pacientes com dermatite de contato alérgica que tornaram possível este estudo.

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese 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

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	02
1.1 Isotiazolinonas	05
1.2 Fases da dermatite de contato alérgica	08
1.3 A importância dos agentes sensibilizantes como ligantes dos TLRs	11
1.4 Mecanismos Reguladores na Dermatite de Contato Alérgica	15
2. OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo principal	22
2.2 Objetivos específicos	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. Casuística	24
3.2 Obtenção de células mononucleares (CMNs) de sangue periférico	26
3.3 Obtenção de amostras de pele	26
3.4 Indução de citocinas pelo composto MCI/MI	27
3.5 Determinação de citocinas	27
3.6 Análise da expressão por reação em PCR em tempo real	28
3.7 Expressão de IL-6, IL-10, Foxp3, TLR4 por imunohistoquímica	29
3.8 Análise estatística	31

4. RESULTADOS	33
4.1 Características demográficas dos controles e pacientes com alergia a MCI/MI	33
4.2 MCI/MI é capaz de induzir citocinas através da sinalização NF-κB	35
4.3 Expressão transcricional de fatores pró-inflamatórios e reguladores na DCA para MCI/MI	37
4.4 Expressão de proteína na reação cutânea a MCI/MI	39
5. DISCUSSÃO	45
6. CONCLUSÃO	53
7. ANEXOS	55
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

LISTA DE ABREVIATURAS

AH: Ácido hialurônico
AIM2: *Absent in melanoma 2*
APCs: *Antigen-presenting cells* – Células Apresentadoras de Antígenos
ATP: Adenosina trifosfato
cAMP: AMP cíclico
CAPPesq: Comissão de Ética para análise de Projetos de Pesquisa
CCL: ligante quimiocina C-C
CCR: receptor de quimiocinas
CD: *Cluster of Differentiation*
CD4: Células T CD4 auxiliaadoras
CD8: Células T CD8 citotóxicas
CLA: Antígeno Associado ao Linfócito Cutâneo
CLs: Células de Langerhans
CpG: *Cytosine phosphate Guanine*
CTLA-4: *Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4*
CXCL: Ligante quimiocina (motivo C-X-C)
DAMPs: *Danger Associated Molecular Pattern* – Padrões Moleculares Associados ao Perigo
DCA: Dermatite de Contato Alérgica
DCs: *Dendritic cells* – Células Dendríticas
dDCs: Células dendríticas dérmicas
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DNCB: Dinitroclorobenzeno
FOXP3: *Forkhead Box P3*
GAPDH: *Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase*
GBEDC: Grupo Brasileiro de Estudo em Dermatite de Contato
GM-CSF: *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* – Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
ICOS: Co-estimulador induzível de células T
iDCs: Células Dendríticas inflamatórias
IFN β : Interferon beta
IFN γ : Interferon gamma
IKK: *I κ B kinase* – Quinase I κ B
IL-1 – Interleucina 1
IL-10 – Interleucina 10
IL-13 – Interleucina 13
IL-16 – Interleucina 16
IL-17 – Interleucina 17
IL-18 – Interleucina 18
IL-1 α – Interleucina 1 α
IL-1 β – Interleucina 1 beta
IL-2 – Interleucina 2
IL-33 – Interleucina 33
IL-4 – Interleucina 4
IL-6 – Interleucina 6
IPAF: *Ice Protease Activating Factor*

IPEX: *Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance* – Distúrbio linfoproliferativo autoimune, poliendocrinopatia e enteropatia ligada ao cromossomo X
 IRF3: *Interferon Regulatory Factor 3* – Fator Regulatório de Interferon 3
 iTregs: Células T Reguladoras Induzidas
 LAG-3: *Lymphocyte-activation gene 3* – Gene 3 de Ativação Linfocitária
 LMWHA: *Low Molecular Weight Hyaluronan* – Hialuronano de Baixo peso Molecular
 LPS: Lipopolissacáride
 MCI: Metilcloroisotiazolinona
 mDCs: Células Dendríticas mieloides
 MDP: Muramil-dipeptídeo
 MHCI: *Major Histocompatibility Complex class I* – Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe I
 MHCII: *Major Histocompatibility Complex class II* – Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe II
 MI: Metilisotiazolinona
 MYD88: *Myeloid differentiation factor 88* – Fator de Diferenciação Mielóide fator 88
 NF-κB: Fator Nuclear Kappa B
 NLRs: *NOD-like Receptors* – Receptores do tipo NOD
 nTregs: Células T Reguladoras de ocorrência natural
 PAMPs: *Pathogen Associated Molecular Pattern* – Padrões Moleculares Associados ao Patógeno
 PBS: *Phosphate Buffered Saline* – Tampão fosfato-salino
 PD-1: Proteína programada 1 da morte celular
 pDCs: Células Dendríticas plasmocitóides
 PPD: Parafenilenodiamina
 PRR: *Pattern Recognition Receptors* – Receptores de Reconhecimento de Padrões
 qPCR: *Polymerase Chain Reaction Quantitative Real Time* – Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo em Tempo Real
 RNA: Ácido Ribonucleico
 RNAm: RNA mensageiro
 ROS: *Reactive Oxygen Species* – Espécies Reativas de Oxigênio
 RPMI-1640: *Roswell Park Memorial Institut*
 SLS: *Sodium Lauryl Sulfate* – Lauril Sulfato de Sódio
 STAT3: *Signal Transducers and Activators of Transcription* (Transdutor de sinal e ativador da transcrição)
 T-bet: *T-box Transcription Factor* – Fator de transcrição T-box
 Tc: T citotóxicas
 TCR: Receptor das células T
 TGF-β: *Transforming Growth Factor beta* – Fator de transformação do crescimento beta
 Th: *T helper* – T auxiliador
 TLR: *Toll-like Receptors* – Receptores tipo Toll
 TLR4: Receptor tipo Toll 4
 TLRs: *Toll-like Receptors* – Receptores tipo Toll
 TNF: Fator de Necrose Tumoral
 TNF-α: Fator de Necrose Tumoral alfa
 TPCA-1: 2-[(Aminocarbonyl)amino]-5-(4-fluorophenyl)-3-thiophenecarboxamide
 Tr1: Células T reguladoras Tipo 1

Tregs: Células T reguladoras

UVA: Ultravioleta A

UVB: Ultravioleta B

VARV-CrmB: *Cytokine response-modifying protein B* – Proteína modificadora da resposta de citocinas. É um Receptor Recombinante do Vírus da Varíola.

LISTA DE SÍMBOLOS

% Por Cento

< Menor que

> Maior que

± Mais ou menos

≤ Menor ou igual a

mL Mililitro

°C Graus Celsius

pg Picograma

pH potencial Hidrogeniônico

ppm: Partes por milhão

rpm: Rotações por minuto

µg Micrograma

µL Microlitro

µm Micrômetro

kU quilo unidades

L Litro

n Tamanho da amostra

+ Positivo

- Negativo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática dos mecanismos imunológicos na DCA	10
Figura 2. Cascata de sinalização intracelular de TLR4	14
Figura 3. MCI/MI induziu citocinas através da sinalização de NF- κ B em CMNs de indivíduos com e sem DCA	36
Figura 4. Indução de citocinas por estimulação de MCI/MI ou MI por sujeito	36
Figura 5. Citocinas induzidas por LPS de CMNs de indivíduos com e sem DCA para o composto MCI/MI	37
Figura 6. Fatores de expressão pró-inflamatórios alterados na DCA para o composto MCI/MI	38
Figura 7. Aumento dos níveis de expressão de fatores reguladores na DCA para o composto MCI/MI	39
Figura 8. Expressão dos níveis de proteína TLR4 na resposta da DCA para o composto MCI/MI	40
Figura 9. Expressão dos níveis de proteína IL-6 na resposta da DCA para o composto MCI/MI	41
Figura 10. Expressão dos níveis de proteína FOXP3 na resposta da DCA para o composto MCI/MI	42
Figura 11. Expressão dos níveis de proteína IL-10 na resposta da DCA para o composto MCI/MI	43
Figura 12: Representação esquemática da reação de DCA para o composto MCI/MI	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de qPCR	29
Tabela 2. Recuperação antigênica por calor úmido	30
Tabela 3. Diluições dos anticorpos	30
Tabela 4. Tabela demográfica de indivíduos com DCA a MCI/MI e controles	34

Resumo

Goes, HFO. *Mecanismos pró-inflamatórios e reguladores na dermatite de contato alérgica a metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona*. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

INTRODUÇÃO: As dermatites de contato representam de 4 a 7% das consultas dermatológicas de acordo com estudos europeus e americanos, dentre elas está a dermatite de contato alérgica (DCA) que é uma reação imune cutânea de hipersensibilidade do tipo IV mediada por linfócitos T. Dentre as substâncias causadoras de DCA estão as isotiazolinonas utilizadas como conservantes em produtos cosméticos e industriais. Os dois principais produtos desse grupo são: metilcloroisotiazolinona (MCI) e metilisotiazolinona (MI). Embora existam estudos evidenciando a participação de receptores *Toll-like* (TLR), de mecanismos pró-inflamatórios e reguladores em lesões cutâneas de indivíduos com DCA, não há evidências sobre a participação destes componentes na DCA a MCI/MI. **OBJETIVO:** Avaliar o equilíbrio dos fatores pró-inflamatórios e reguladores no local da reação de DCA ao composto MCI/MI. **MÉTODOS:** Foram selecionados indivíduos com DCA a MCI/MI identificada no teste de contato. A expressão de fatores pró-inflamatórios foi avaliada por q-PCR e por imunohistoquímica após 48 horas da aplicação do teste de contato com MCI/MI no grupo com DCA e de água estéril no grupo sem DCA. Análises da secreção de IL-1 β , TNF e IL-6 induzidas por MCI/MI ou MI por células mononucleares do sangue periférico (CMNs) foram realizadas por citometria de fluxo. **RESULTADOS:** Foram evidenciados uma expressão diminuída de mRNA para *TLR4* e aumento dos níveis de *IL6* e dos fatores reguladores como *FOXP3*, *IL10* e *TGF β* no local da reação positiva a MCI/MI. Além disso, detectamos níveis aumentados de proteínas de TLR4, FOXP3, IL-6 e IL-10 na camada dérmica na reação de DCA. Observamos também que o composto MCI/MI é capaz de induzir citocinas pró-inflamatórias TNF, IL-1 β e IL-6 de CMNs, em ambos os grupos, positivos ou não ao composto, pela via de sinalização de NF- κ B. **CONCLUSÃO:** A sensibilização com MCI/MI induz fatores pró-inflamatórios e possui acentuada capacidade de elicitar componentes reguladores para controlar o processo imunopatológico. Isto destaca que o efeito tolerogênico é um mecanismo crucial para a resolução da DCA, considerando que muitas substâncias de exposição ocupacional e de uso pessoal podem conter compostos biocidas e conservantes.

Descritores: Dermatite alérgica de contato; Aditivos em cosméticos; Citocinas; Linfócitos T reguladores; Interleucina-10; Imunidade inata; Interleucina-6.

Abstract

Goes, HFO. *Proinflammatory and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis to methylchloroisothiazolinone and methylisothiazolinone*. [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

INTRODUCTION: Contact dermatitis accounts for 4 to 7% of dermatological consultations according to European and American studies, including allergic contact dermatitis (ACD), which is a T-lymphocyte-mediated type IV hypersensitivity skin reaction to the allergen. Among the substances that cause ACD are isothiazolinones used as preservatives in cosmetic and industrial products. The two main products in this group are methylchloroisothiazolinone (MCI) and methylisothiazolinone (MI). Although there are studies showing the participation of Toll-like receptors (TLR), proinflammatory and regulatory mechanisms in cutaneous lesions of individuals with ACD, there is no evidence on the participation of these components in ACD to MCI/MI.

OBJECTIVE: To evaluate the balance of proinflammatory and regulatory factors at the site of ACD reaction to the MCI/MI compound. **METHODS:** Individuals with ACD to MCI/MI identified in the patch test were selected. The expression of proinflammatory factors was assessed by q-PCR and immunohistochemistry 48 hours after the application of the MCI/MI patch test in the group with ACD and sterile water in the group without ACD. Analysis of MCI/MI or MI induced IL-1 β , TNF and IL-6 secretion by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was performed by flow cytometry. **RESULTS:** Decreased mRNA expression for *TLR4* and increased *IL6* levels were observed, as well as regulatory factors such as *FOXP3*, *IL10* and *TGF β* at the site of positive MCI/MI reaction. In addition, we detected increased levels of TLR4, FOXP3, IL-6 and IL-10 proteins in the dermis layer in the ACD reaction. We also observed that MCI/MI compound is capable of inducing in the PBMC TNF, IL-1 β and IL-6 proinflammatory cytokines in both groups, positive or not to the compound, by the NF- κ B signaling pathway. **CONCLUSION:** Sensitization with MCI/MI induces proinflammatory factors and it has marked ability to elicit regulatory components to control the immunopathological process. This highlights that the tolerogenic effect is a crucial mechanism for the resolution of ACD, considering that many occupational and personal exposure substances may contain biocidal compounds and preservatives.

Descriptors: Dermatitis, allergic contact; Additives in cosmetics; Cytokines; T-Lymphocytes, regulatory; Interleukin-10; Immunity, innate; Interleukin-6.

1. Introdução

1. Introdução:

As dermatites de contato, que incluem as formas irritativas, alérgicas e as reações imediatas, representam 4 a 7% das consultas dermatológicas, de acordo com estudos europeus e americanos, além de uma das principais causas de doenças dermatológicas ocupacionais (1-5).

A dermatite de contato alérgica (DCA) é uma reação imune cutânea de hipersensibilidade do tipo IV, mediada por linfócitos T específicos ao alérgeno. Em geral um hapteno, uma substância química de baixo peso molecular, com reatividade química e solubilidade lipídica capaz de penetrar o extrato córneo e reagir com componentes do sistema imune da pele. A sensibilização prévia, dose do alérgeno, coexistência de fatores irritantes, alterações da barreira epidérmica e componentes genéticos, são fatores que podem contribuir o desenvolvimento da DCA (1, 2, 6-8).

Após a sensibilização por um hapteno, as exposições subsequentes à mesma substância ou a outras quimicamente semelhantes podem desencadear sintomas em geral de 12 a 48 horas, com prurido que pode ser intenso e lesões que podem cronificar, de modo que a DCA pode afetar os pacientes durante anos constituindo um impacto na qualidade de vida e um problema socioeconômico grave (9).

A apresentação clínica da DCA está dentro do espectro de eczema com eritema, edema, vesículas, exsudação, pápulas, ou cronicamente, descamação, liquenificação e/ou fissuras, que dependem da substância causadora, do local afetado e forma de exposição, se aguda ou crônica (1, 6, 10). Reações mais brandas podem apresentar apenas eritema visível no local de contato, às vezes com suspeição da substância causadora. Reações mais fortes incluem vesículas que rompem rapidamente devido a coçadura, com exsudação intensa e posterior formação de crostas (6).

Nas DCAs causadas por uma única exposição, todas as lesões podem estar no mesmo estágio (11). Quando cronificam, podem-se observar hiperqueratose, descamação, liquenificação e fissuras mais proeminentes. As lesões se tornam menos circunscritas, com aumento de infiltração e espessura da pele (12).

A localização desempenha um papel importante na morfologia da DCA e é predominante na área de contato, mas pode se espalhar para outras regiões do corpo. Além disso, a área de pele acometida fornece pistas importantes para a causa da DCA e é o ponto de partida para a coleta de anamnese detalhada, que é crucial para orientar o teste de contato para identificação do alérgeno responsável e assim fazer o diagnóstico. Em áreas com estrato córneo mais fino como pálpebras, região oral, pênis, bolsa escrotal e vulva, eritema e edema geralmente superam pápulas e vesículas (6, 12).

Pode ocorrer DCA generalizada, com mecanismo imunopatológico ainda incerto. Exposição a altas doses de alérgenos, disseminação hematogênica ou ativação generalizada de células efetoras imunológicas já foram sugeridas como possíveis explicações (13). Formas atípicas de DCA são disidróticas, reações tipo eritema multiforme, púrpura pigmentada, reações pustulares, granulomas e lesões esclerodérmicas (11).

Os diagnósticos diferenciais são inúmeros, sendo os principais os vários tipos de dermatites: irritativa, atópica, disidrótica, numular, seborreica, de estase, além de líquen simples crônico, psoríase, pitiríase rósea, pustulose palmoplantar, dermatite liquenóide, linfoma e tinea (14).

O teste de contato é o padrão-ouro para o diagnóstico de DCA e consiste na aplicação de uma série de alérgenos em câmaras específicas diretamente na pele. É a prova *in vivo* dos efeitos causados pela doença, evocando em pequena escala a fase de elicitação da DCA (15).

Em relação ao tratamento, uma das medidas mais importantes na prevenção da DCA é evitar o contato com os respectivos alérgenos. DCA aguda e crônica são tratadas com corticosteroides tópicos (classe II-III, mais comumente furoato de mometasona ou betametasona) (6). Em áreas de epiderme fina, como intertriginosas, inibidores tópicos da calcineurina (por exemplo: tacrolimus, pimecrolimus) são boas escolhas para terapia de manutenção após um curto período de corticosteroides para reduzir a inflamação. Em alguns casos, os anti-histamínicos podem ser utilizados para reduzir o prurido (16).

Indivíduos com DCA crônica podem se beneficiar da fototerapia com UVB de banda estreita ou psoraleno com UVA (PUVA), além de retinóides sistêmicos, como a acitretina (17). Em casos especiais, um curto período de terapia sistêmica com corticosteroides pode ser útil, principalmente em casos de alergias sistêmicas de contato como resultado de disseminação hematogênica. Raramente, imunossuppressores, ciclosporina, azatioprina ou micofenolato são utilizados na DCA crônica (18). Há estudos em andamento com efeitos favoráveis de imunobiológicos como o antagonista de IL-4/IL-13, dupilumab ou o antagonista de IL-6, tocilizumab (6, 19, 20).

A prevalência em 01 ano para o eczema de contato alérgico é de cerca de 20% na Europa (21). Em relação à DCA ocupacional, um estudo de Warshaw *et al* (4), com dados do Grupo Norte-Americano de Dermatite de Contato, de 39.332 pacientes que realizaram teste de contato, 0,3% eram operadores de máquina de impressão. Dentre estes, a DCA foi encontrada em 58,3%, sendo o cobalto o principal alérgeno responsável nos trabalhadores (4).

No Brasil, a doença ainda é sub-relatada e muitas pessoas afetadas não procuram tratamento (22). Um estudo retrospectivo de Plombom *et al* (23), com dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), observou que a maioria dos casos de dermatites ocupacionais entre 2007 e 2012, ocorriam em homens trabalhadores no

setor de construção e as mãos eram as mais afetadas. O setor de serviços domésticos foi o segundo na ocorrência de dermatite, possivelmente devido ao contato excessivo com produtos de limpeza e luva de borracha (23).

Dentre as substâncias químicas sensibilizantes presentes em produtos domésticos e industriais estão as isotiazolinonas, que mostram serem importantes indutores de DCA.

1.1 Isotiazolinonas

Isotiazolinonas são compostos heterocíclicos usados como biocidas devido suas propriedades antimicrobianas, com amplo espectro contra bactérias gram-positivas e negativas, fungos e algas. São utilizados como conservantes em detergentes, produtos industriais, tintas, cosméticos, principalmente nos produtos de higiene pessoal (10, 24). Os dois principais produtos desse grupo são: metilcloroisotiazolinona (MCI) e metilisotiazolinona (MI) e menos frequentemente a butilisotiazolinona, e podem ser encontrados nas fórmulas em combinação MCI/MI na proporção 3:1 (nome comercial Kathon CG® – Dow Chemical Company Midland, Michigan, USA) ou isoladamente MI (10, 24-26).

Desde meados da década de 80, descobriu-se que o composto MCI/MI é um agente sensibilizante para humanos e cobaias (27-31). Desde os anos 2000, aumentaram os relatos de DCA ocupacional causada por MCI/MI e a produtos cosméticos (32). O uso continuado de MCI/MI como conservante em cosméticos, principalmente os que são à base de água como xampus, condicionadores e produtos de cuidados da pele (cremes, loções hidratantes e de limpeza, lenços umedecidos), produtos domésticos e industriais resultaram em um aumento na prevalência de DCA ao composto MCI/MI na Europa (28, 33-37).

Aerts *et al* (28) analisaram prontuários médicos de 6.599 pacientes, entre 2010 e 2013, submetidos ao teste de contato em diferentes centros universitários e clínicas privadas na Bélgica e mostraram que a taxa de sensibilização para MCI/MI em 2010 era de 3,6%, chegando a 5,3% em 2013. No mesmo estudo, a porcentagem de pacientes sensibilizados por MI era de 3,1% em 2010 e subiu para 6% em 2012 e 7,2% em 2013 (28). Este aumento da sensibilização por MI nos últimos anos parece estar relacionado à maior exposição dos consumidores e trabalhadores a esta substância (33, 37-39). Além disso, o crescimento observado das reações ao composto MCI/MI pode também ser atribuído à MI, o que pode ser justificado por possíveis mecanismos de reação imunológica cruzada entre MCI e MI ou mesmo pela sensibilização à MI (40-45).

Quanto a apresentação clínica de DCA por MCI/MI, os adultos são mais afetados nas regiões de couro cabeludo, face (principalmente as pálpebras), região cervical, devido exposição aérea e a produtos de higiene pessoal (46) e as mãos (28, 37, 47-49) devido ao manuseio de detergentes domésticos e produtos químicos como tintas (50). Em crianças, a região perioral, genital e nádegas, foram comumente afetadas devido a presença de MI em lenços umedecidos no passado (51).

Na Europa, a MI era autorizada como conservante em produtos cosméticos nos termos do número de ordem 57 do anexo V do Regulamento da Comissão Europeia n.º 1223/2009, a uma concentração máxima de 0,01 % (100 ppm). O mesmo regulamento autorizava também a MCI/MI, como conservante em todos os produtos cosméticos a uma concentração máxima de 0,0015 % (15 ppm). Em 26 de setembro de 2014, foi publicada uma medida que limitava a utilização desta mistura a produtos com enxágue (xampus, condicionadores, etc) (49, 52, 53).

Em 2013, a Comissão Europeia solicitou um parecer do Comitê Científico de Segurança do Consumidor que concluiu que a concentração de 100 ppm de MI nos

produtos cosméticos poderia sensibilizar o consumidor e que para produtos cosméticos com enxágue, uma concentração de 15 ppm de MI seria considerado seguro. Em 2016, os Estados-membros da União Europeia chegaram ao acordo sobre a proibição da utilização de MI nos produtos cosméticos sem enxágue sem licença, que entrou em vigor desde janeiro de 2017, após um período de transição de seis meses, durante os quais a indústria cosmética poderia ainda produzir produtos contendo MI (10, 49).

Nos EUA, o composto MCI/MI é permitido como conservante para produtos com enxágue a 15ppm e para produtos sem enxágue a 7,5ppm (10, 54, 55). No Japão, é permitido apenas para produtos com enxágue, a 15ppm. No Brasil, é permitido a 15ppm e é testado a 1% em água no teste de contato (Bateria Padrão Brasileira) (56).

Scherrer e Rocha (57) encontraram 11,14% de sensibilização a MCI/MI nos pacientes que realizaram testes de contato em serviço universitário no Brasil durante o período 2009 a 2012, contrastando com 3,35% no período de 2006 a 2009 (57).

Em um estudo multicêntrico, com nove países envolvidos, a alergia de contato a MI e/ou a MCI/MI poderia explicar ou contribuir para a dermatite em mais de 60% dos pacientes alérgicos a MI (50). Estudo retrospectivo de Wilford e De Gannes (58) com 2.177 pacientes de clínicas de Dermatologia em Vancouver, Canadá, de janeiro de 2008 a abril de 2015 demonstrou uma crescente prevalência de alergia a MCI/MI e MI, sendo o maior percentual de 15,29%, em 2015, quando comparado aos anos anteriores (58). Atualmente, os últimos trabalhos publicados demonstram casos entre crianças com uso de colas escolares e “slimes” (59, 60).

Embora a maioria dos casos de DCA a MCI/MI sejam devidos aos produtos cosméticos e domésticos, a utilização deste composto em produtos profissionais como tintas à base de água, indústrias pelo uso de fluidos de metais e detergentes industriais também é responsável pelo maior número de casos, principalmente após 2010 (61, 62).

Esses conservantes são responsáveis em alguns estudos por mais de 50% dos casos de DCA (25, 34, 63) e, apesar da frequência, não se sabe de forma específica os mecanismos imunológicos da MCI/MI na DCA.

1.2 Fases da dermatite de contato alérgica

O processo de sensibilização na DCA se inicia com a entrada dos haptenos na pele, que apesar de não possuírem antigenicidade, se ligam a proteínas carreadoras da pele formando o complexo hapteno-proteína que funciona como um antígeno, que é capturado pelas células dendríticas (*Dendritic cells* - DCs) (6, 64, 65).

As DCs são as principais células apresentadoras de antígenos (*Antigen-presenting cells* - APCs) da fase de sensibilização ou indução na DCA (65-69). Elas possuem vários subtipos que diferem quanto a localização, função e fenótipo (70). Na pele humana podem ser DCs plasmocitóides (pDCs), DCs inflamatórias (iDCs), DCs mielóides (mDCs) ou DCs dérmicas (dDCs) e células de Langerhans (CLs) (71-74). Estas últimas estão presentes na epiderme e são derivadas de monócitos do fígado fetal e macrófagos do saco vitelino. Já as mDCs são encontradas na derme e são provenientes de células tronco hematopoéticas (75, 76). As dDCs podem ser de subtipos CD1c⁺, CD141⁺ e CD14⁺ (77).

As CLs possuem a capacidade de produzir interleucina (IL) -1 β e fazer com que os queratinócitos produzam TNF- α e GM-CSF que, juntamente com a IL-1 β , determinam a maturação e migração dessas DCs para os linfonodos regionais (78-80). Logo as DCs apresentam o antígeno no contexto de moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC) às células T *naive* antígeno-específica que se proliferam

e se diferenciam em vários subtipos de células T, como as células T *helper* CD4⁺ (Th)1 e T citotóxicas CD8⁺ (Tc)1 (6, 64, 78, 79).

Alternativamente, outras células incluindo: queratinócitos, mastócitos e macrófagos dérmicos que infiltram o local de aplicação do hapteno nos estágios iniciais da resposta também podem atuar no microambiente inflamatório, ou eventualmente na apresentação do antígeno. Contudo, a ativação das APCs é necessária para que madurem e migrem aos linfonodos (81, 82).

A fase de elicitação na DCA ocorre quando um mesmo hapteno penetra na pele e as células Th1/Tc1 antígeno-específicas são ativadas pelas DCs. As células Th1/Tc1 ativadas produzem citocinas como IFN- γ que estimulam células presentes da epiderme, como os queratinócitos. O contexto inflamatório desta fase pode ocorrer cerca de 24 a 48 horas após a exposição do hapteno (64, 79, 81, 82).

Apesar de vários tipos celulares estarem envolvidos no desenvolvimento da hipersensibilidade de contato, as células T antígeno-específicas possuem um papel efetor importante. Ambas as células Th e Tc desempenham funções distintas para o desenvolvimento da DCA e o reconhecimento específico durante um contexto pró-inflamatório é dependente do hapteno e sua dose (64, 83, 84). A **figura 1** é uma representação esquemática dos mecanismos imunológicos na DCA.

Figura 1. Representação esquemática dos mecanismos imunológicos na DCA.

Etapa 1: Ativação de células imunes inatas (por exemplo: queratinócitos, mastócitos) e indução da produção de vários mediadores químicos. Etapa 2: DCs ativadas capturam o antígeno e migram para os linfonodos regionais. Etapa 3: DCs apresentam o antígeno para as células T virgens, que se diferenciam principalmente em células Th1 e Tc1. Etapa 4: Inflamação com ativação de células imunes inatas e recrutamento de neutrófilos. Etapa 5: Leucócitos, incluindo células T efetoras específicas ao antígeno são recrutadas. Etapa 6: Células T efetoras específicas ao antígeno são ativadas na pele por DCs dérmicas que capturaram o antígeno, com a criação de um ambiente de inflamação específica ao antígeno. A ativação de células T efetoras ocorre principalmente em grupos de leucócitos (modificado) (79).

As CLs, foram consideradas responsáveis por induzir células Th1/Tc1 na hipersensibilidade de contato devido a sua abundância na pele, a fácil acessibilidade aos haptens e a forte habilidade na apresentação de antígenos *in vitro*. Contudo, estudos em murinos revelaram que a depleção de CLs durante a fase de sensibilização não prejudica as respostas da hipersensibilidade de contato, diferentemente da depleção das dDCs CD103⁺ (85, 86). Portanto, as dDCs CD103⁺, homólogas às DCs CD141⁺ humanas, são essenciais para a mediação da hipersensibilidade de contato (86, 87).

A última fase da DCA é chamada de resolução, em que ocorre a indução de células T reguladoras (Tregs), que possuem o fator de transcrição Foxp3 e alta expressão do receptor de IL-2 (CD25), um subtipo de linfócitos T capaz de inibir a resposta imune através da liberação de IL-10, TGF- β e IL-33 ou por inativar as células T efetoras via CTLA-4 (antígeno-4 do linfócito T citotóxico), ectonucleotidases CD39 e CD73 para produção de cAMP, entre outras moléculas (6, 64).

1.3 A importância dos agentes sensibilizantes como ligantes dos TLRs

Geralmente, são encontrados nas lesões dermatológicas padrões moleculares associados ao patógeno (*Pathogen Associated Molecular Pattern* - PAMPs) como o lipopolissacáride (LPS) proveniente de bactérias gram-negativas pela ruptura da barreira cutânea, muramil-dipeptídeo (MDP) ou o próprio RNA bacteriano, assim como padrões moleculares associados ao perigo (*Danger Associated Molecular Pattern* - DAMPs), devido aos danos celulares existentes, que podem ser a proteína β -amilóide, ATP (adenosina trifosfato), cristais de ácido úrico ou fatores de agressão externos como asbesto, sílica e radiação ultravioleta (88).

Esses padrões atuam como agonistas que ativam as células via receptor *Toll-like* (TLR), que é um receptor de reconhecimento de padrões (*Pattern recognition receptors* – PRR), importante para geração da IL-1 β em sua forma imatura, como também de outras citocinas pró-inflamatórias (89-93).

Foram descritos dez receptores funcionais em humanos, destes seis localizados na membrana celular (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR10) e outros quatro em compartimentos intracelulares como os retículos endoplasmáticos e endossomos (TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9). Eles são capazes de reconhecer diversos tipos de

PAMPs e DAMPs, desde lipoproteínas de origem bacteriana (TLRs 1,2,6), LPS (TLR4) e flagelina (TLR5), até RNA e DNA virais (TLRs 3,7,8 e 9) (89-93). Além de radiação ultravioleta B (UVB), bactérias, CpG, produtos virais, células necróticas e componentes da matriz extracelular, como sulfato de heparano. Todas as vias de sinalização de TLR culminam na ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B), que controla a expressão de uma série de genes de citocinas inflamatórias (94, 95).

Diversos tipos celulares expressam esses receptores, como CLs, macrófagos, e células não linfóides como queratinócitos e fibroblastos, entretanto, a sua atuação dependerá do tipo celular e do tecido onde estão expressos. Ainda que a inflamação gerada via ativação pelos TLRs seja protetora em muitos casos, a constante estimulação pode gerar necrose e liberar fatores endógenos que podem cronificar o processo inflamatório (89, 90, 96).

Além disso, os TLRs promovem a oligomerização e ativação dos inflamassomas que são complexos citoplasmáticos multiprotéicos que medeiam a maturação de IL-1 β , IL-18 e possivelmente IL-33. A IL-18, necessária para maturação e migração de DCs e ativação de células T, desempenha um papel chave na indução de DCA (94, 97).

A formação dos inflamassomas depende de membros da família dos receptores do tipo NOD (*NOD-like receptors* – NLRs), que fazem o reconhecimento de produtos bacterianos no citoplasma. Os componentes de inflamassomas, como NALP-1, NALP-3, IPAF e AIM2, são responsáveis pela clivagem da pró-caspase 1 em caspase 1 que, por sua vez, cliva a pró-IL-1 β e pró-IL-18 em suas formas ativas denominadas IL-1 β e IL-18 (89, 90, 98, 99). A ativação do inflamassoma que leva à produção de IL-1 β pode ser uma característica comum a todos os haptenos de sensibilização (79, 100).

A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória responsável pela fase aguda da inflamação, estimula a produção de TNF- α e IL-6 e exerce potente atividade pirogênica

(98). De maneira semelhante, a IL-18 atua em sinergia com a IL-23 na produção de IL-17 pelas células Th17, mas não possui atividade pirogênica (88, 99).

Alguns agentes sensibilizantes modulam o metabolismo de ácido hialurônico (AH), promovem a quebra dessa substância, gerando fragmentos de AH, como o hialuronano de baixo peso molecular (*Low molecular weight hyaluronan* - LMWHA). Esta molécula endógena é membro dos DAMPs, que funcionam como agentes pró-inflamatórios na hipersensibilidade de contato (101). A produção de IL-18 da linhagem celular NCTC2544 de queratinócitos humanos pelos alérgenos de contato dinitroclorobenzeno (DNCB) e parafenilenodiamina (PPD) *in vitro* depende da degradação do AH (94). Os fragmentos de AH funcionam como DAMPs que resultam na ativação de DCs dependentes de TLR2, TLR4 e CD44. A liberação de espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species* - ROS) dependente dos alérgenos de contato também é importante na ativação dos queratinócitos, uma vez que os resultados desses eventos podem ser bloqueados usando antioxidantes, além de mecanismos que impeçam a degradação do AH, regulando negativamente a produção de IL-18 (94, 101).

Nas reações inflamatórias mediadas pelo níquel e cobalto pelos íons Ni^{2+} e Co^{2+} podem desencadear a dimerização via TLR4 e a ativação da via de sinalização NF- κ B, independente de MD2 (outro complexo de superfície celular) em um modelo específico em que os metais se ligam as histidinas H456 e H458 (84). O níquel também pode ativar o inflamassoma NLRP3 resultando na produção de IL-1 β madura (95, 102-104). A **Figura 2** demonstra a cascata de sinalização intracelular de TLR4.

Figura 2. Cascata de sinalização intracelular de TLR4. A via independente MYD88 induz a translocação de NF- κ B ou IRF3, levando à expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias pelos genes NF- κ B ou IFN- β e TNF- α pelo IRF3. Esta via de sinalização canônica é baseada em publicações sobre TLR4 de ratos e humanos (modificado) (105).

Além disso, um papel importante para ROS foi demonstrado na alergia de contato por níquel, cobalto, DNCB e PPD (103, 106, 107). Buters e Biedermann (108) abordaram o mecanismo da dermatite de contato irritativa e alérgica induzida pelo cromo. O cromo (VI), que penetra na pele, é reduzido ao hapteno cromo (III), que reage com proteínas de células T cromo-específicas, levando ao acúmulo de ROS, o que resulta em efluxo de potássio, ativando o inflamassoma NLRP3 (108).

Embora existam diversos estudos evidenciando a presença de TLRs em lesões cutâneas de indivíduos com DCA, há poucos estudos sobre a frequência e participação destes componentes e dos mecanismos imunológicos envolvidos no desenvolvimento de DCA por MCI e MI (109-111).

1.4 Mecanismos Reguladores na Dermatite de Contato Alérgica

As APCs apresentam o complexo hapteno-proteína às células T $CD4^+$ e $CD8^+$ *naive* via MHCII e MHCI, respectivamente nos linfonodos (112, 113). A ligação do receptor TCR das células T com o complexo peptídeo-MHC é um primeiro sinal às células T e as características de cada hapteno, as moléculas co-estimuladoras e as citocinas fornecem o segundo sinal que modulam positivamente ou negativamente a resposta das células T (114-116). Assim, este conjunto de fatores promove a proliferação dos linfócitos T, gerando as células T efectoras, de memória e Tregs induzidas (117, 118).

Há escassa pesquisa sobre os mecanismos imunológicos envolvidos na DCA por MCI e MI (109-111). Na DCA, a ativação efetiva de CLs e DCs é essencial para que um indivíduo se torne sensível a um antígeno (81). Diferentes elementos do sistema imune inato desempenham um papel crucial na indução de células T efectoras, que atuam na fase de elicitação da DCA. A reação e a finalização do controle da DCA são mediadas por células Tregs (Foxp3 +) (119, 120).

As DCs têm importante tarefa no controle das respostas imunes ao ambiente e potenciais agentes sensibilizadores para o sistema imunológico cutâneo. Este último pode ser mediado por vários mecanismos que incluem apoptose de linfócitos T efetores por indução de morte celular decorrente de ativação, anergia, produção de citocinas anti-inflamatórias e indução de subtipos de linfócitos Tregs (83, 121).

A reação e a finalização do controle da DCA são mediadas por células Tregs. Elas são capazes de secretar IL-10 e, conseqüentemente, inibir o influxo de leucócitos, bem como a desestabilização da ligação de células DC-T, promovendo a prevenção de

respostas imunes indesejáveis a antígenos inócuos na pele e atenuando a ativação de células T locais em indivíduos alérgicos (100, 121).

Queratinócitos e mastócitos também liberam IL-10 e, por meio da radiação UVB, DCs imaturas ou parcialmente maduras, são mais tolerogênicas e capazes de induzir a expansão de células Tregs (60, 122). O TGF- β também está envolvido no mecanismo de supressão, indicando que o sistema imune tem a capacidade intrínseca de regular as respostas a produtos químicos (90, 123). A concomitância de sinais de perigo durante a exposição ao hapteno, como bactérias, vírus ou a propriedade irritante do próprio produto químico, pode ser um fator relevante na quebra da tolerância aos produtos químicos aplicados à pele (121, 124).

Após a ativação das células TCD4⁺ *naive* e células TCD8⁺ citotóxicas, as Th se diferenciam e secretam citocinas e fatores de transcrição, sendo classificadas em Th1, Th2, Th17, Th22, e Th9 (123, 125-127) e as Tcs após expansão clonal e diferenciação, originam os subtipos Tc1, Tc2, Tc17 e Tc9 (123, 128).

As células T efetoras alcançam os tecidos periféricos inflamados, no entanto, tem um tempo de vida curto e após o *clearance* do antígeno a maioria é eliminada (129). Enquanto que as células T de memória são duradouras e podem persistir por anos no organismo (130, 131).

Na fase de elicitação, o sistema imune inato é novamente ativado pois há aumento de expressão de moléculas *homing* e receptores de quimiocinas, para recrutamento de células do sangue para o tecido (79, 132, 133). As células Th1 e Tc1, caracterizadas principalmente pela expressão de T-bet e produção de IFN- γ , são os principais subtipos nesta fase, mas também são encontrados outros subtipos celulares como as células Tc17/Th17, Tc2/Th2 e Tc9/Th9. Portanto, com estas células presentes na pele e

submetidas à estímulos adequados, interagem com as dDCs e liberam citocinas e quimiocinas (134, 135).

Modelos animais de hipersensibilidade de contato mostram que quando o sítio cutâneo é irradiado com UVB, ou o agente sensibilizador é administrado por via oral, antes da fase de sensibilização, é induzida uma tolerância imunológica específica ao antígeno (136, 137). A radiação UVB afeta a viabilidade das dDCs, causa danos ao DNA e apoptose de CLs e promovem sua migração aos linfonodos regionais (138). Em paralelo, há uma expressão reduzida de MHC e moléculas co-estimuladoras, que resultam em uma capacidade de apresentação de antígeno prejudicada (139).

O papel das células Tregs na imunossupressão induzida por UVB é observado pela evidência de que a tolerância pode ser transferida para receptores *naive* com células CD4⁺CD25⁺ expressando altos níveis de CTLA-4 isolado de animais isogênicos irradiados com UVB (140). As células CD4⁺CD25⁺Tregs podem impedir a indução de hipersensibilidade em animais *naive*, mas elas não impedem a hipersensibilidade em camundongos já sensibilizados (141).

Este achado depende da capacidade de *homing* das células Tregs induzidos por UVB, que expressam a L-selectina para o *homing* linfonodal, mas não expressam o antígeno associado ao linfócito cutâneo (CLA). As células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs no sangue periférico expressam o receptor CCR4, 80% das Tregs expressam CLA e 73% expressam CCR6, o que mostra potencial *homing* à pele (142). Embora as células CD4⁺CD25⁺Tregs canônicas não liberem IL-10, as Tregs induzidas pela liberação de UVB liberam essa citocina, que, juntamente com a IL-10 derivada do hospedeiro, contribuem para os mecanismos de imunossupressão (121).

As Tregs podem ser classificadas em Tregs de ocorrência natural (nTregs) (138), incluindo o co-estimulador induzível de células T (ICOS) (+) Tregs (139), Tregs

induzidas (iTregs) (136), Tregs Tipo 1 (Tr1) (143), CD8 (+) Tregs e Tregs produtoras de IL-17 (144). Estas células compartilham algumas características comuns, incluindo a expressão de Foxp3 (exceto para células Tr1), e secreção de citocina inibidora IL-10 e/ou TGF- β (145).

Em humanos, o papel de Foxp3 no desenvolvimento de TregCD25⁺, é constatado pela mutação desse fator de transcrição que é capaz de induzir um distúrbio linfoproliferativo autoimune, poliendocrinopatia e enteropatia ligada ao cromossomo X (IPEX) caracterizada por poliendocrinopatia tipo 1 autoimune neonatal, anemia hemolítica, enteropatia e eczema, com manifestações clínicas consequentes da proliferação e ativação descontrolada de células T (146).

Além das células Tregs naturais, as quais são responsáveis pelo controle de células T autorreativas que escaparam da seleção tímica, existem as Tregs CD25⁺ adaptativas com uma ampla especificidade antigênica que se expandem após encontros com antígenos exógenos. As células Tregs adaptativas regulam as respostas imunes a antígenos ambientais, incluindo bactérias, fungos, protozoários, moléculas alergênicas e substâncias químicas (147).

Nos seres humanos, foi demonstrado que as células CD4⁺CD25⁺ do sangue periférico de indivíduos saudáveis, não alérgicos, podem regular *in vitro* a ativação da resposta de células T de memória níquel específicas e nativas. Em comparação, as células T CD4⁺CD25⁺ isoladas de indivíduos alérgicos ao níquel mostram uma capacidade limitada ou ausente para suprimir células T CD4⁺ e CD8⁺ específicas para níquel (148).

Células CD4⁺CD25⁺Tregs têm um padrão de comportamento migratório semelhante ao das células Tr1, ambas expressando altos níveis de CCR4 e CCR8, receptores para CCL17 e CCL1, indicando que mecanismos comuns governam o

recrutamento de subgrupos de Tregs distintos em tecidos periféricos. Além disso, uma pequena fração de células T $CD4^+CD25^+$ circulantes co-expressam CLA e podem ser recrutadas no local da inflamação da pele. De acordo com essa hipótese, apesar da negatividade da reação epicutânea ao sulfato de níquel em indivíduos não alérgicos, o local de aplicação do níquel exibe um infiltrado de células T conspícuo, que inclui células $CD25^+$ (148). Uma vez isoladas, estas células $CD4^+CD25^+$ infiltrantes suprimiram fortemente respostas *in vitro* de células T específicas para o níquel. Assim, $CD4^+CD25^+$ Tregs poderiam bloquear a ativação de células T para produtos químicos através de múltiplas vias: no local de entrada dessas substâncias, controlando a ativação de células T $CD8^+$ efetoras específicas, e em órgãos linfoides secundários, onde elas podem impedir a expansão de $CD4^+$ efetoras de memória e células T $CD8^+$ (147, 148).

As células Tr1 são células Tregs adaptativas, caracterizadas pela capacidade de secretar níveis elevados de IL-10 e quantidades mínimas de IL-4 e IL-17, expressam CD49b e LAG-3 identificados em camundongos e humanos. As células Tr1 suprimem as respostas das células T e das APCs principalmente através da secreção de IL-10 e TGF- β , além de liberarem granzima B e perforina e provocarem apoptose de células mieloides. Além disso, são capazes de inibir as respostas de células T através de mecanismos dependentes de contato celular mediados por CTLA-4 ou PD-1 e por perturbação do estado metabólico de células T efetoras via as ectoenzimas CD39 e CD73 (124).

Células Tr1 específicas ao níquel estão enriquecidas no sangue periférico de indivíduos não alérgicos expostos ao metal (147). Embora em uma menor frequência, as células Tr1 níquel específicas também podem ser isoladas das reações de contato ao níquel em indivíduos alérgicos, indicando que podem ser recrutadas no local de exposição ao hapteno para modular a magnitude da resposta imune. A secreção de IL-

IL-10 não está limitada as células Tr1, em camundongos, as células Th2 podem secretar IL-10 e contribuir para a regulação da hipersensibilidade. Em humanos, ambas as células Th1 e Th2 podem secretar IL-10 e seu papel efetivo na DCA pode depender da relação entre citocinas antagônicas (149).

Até o momento, não há estudos que avaliem os eventos iniciais da fase de elicitação do composto MCI/MI, para controle do processo imunopatológico. Portanto, é essencial avaliar a intensidade de inflamação, pela produção de fatores pró-inflamatórios, o que pode explicar a intensidade e/ou cronicidade da reação de DCA observada em alguns pacientes. Além disso, a resolução da reação por células e citocinas de potencial regulador, também são chaves para avaliar o desfecho da reação.

O conhecimento específico dessas vias pode ajudar a compreender futuramente diversos quadros clínicos de DCA a MCI/MI, além de fornecer possibilidades para muitos estudos em relação a terapêuticas que bloqueiem a nível celular, de receptor ou citocina envolvida no mecanismo de hipersensibilidade de contato.

2. Objetivos

2. Objetivos:

2.1 Objetivo principal

Avaliar o equilíbrio dos fatores pró-inflamatórios e reguladores no local da reação de DCA ao composto MCI/MI.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar pelo método de reação em cadeia de polimerase em tempo real (PCR *real time*) em fragmentos de pele (obtidos através de biópsia) do teste de contato ao composto MCI/MI positivo e de indivíduos com teste negativo e sem reatividade a alérgenos de contato: perfil transcricional de *TLR4* e de citocinas pró-inflamatórias (*TNF*, *pro-IL1B* e *IL-6*) e componentes da regulação (*Foxp3*, *IL-10* e *TGFβ*);
- Avaliar em fragmentos de pele (obtidos através de biópsia) do teste de contato ao composto MCI/MI positivo e de indivíduos com teste negativo e sem reatividade a alérgenos de contato: de expressão de *TLR4*, *IL-6*, *Foxp3* e *IL-10* por imunohistoquímica;
- Averiguar a capacidade de MCI/MI e MI na indução de *TNF*, *IL1β* e *IL-6* por células mononucleares e se essas citocinas são inibidas na presença de inibidor seletivo de *IκB* quinases (*IKK*), *TPCA-1*, para avaliar a sinalização de *NF-κB*.

2. Materiais e métodos

3. Materiais e métodos:

3.1 Casuística

Foram selecionados indivíduos, de ambos os sexos, durante procedimento de teste de contato cutâneo, com teste positivo ao composto MCI/MI (n=13). Os indivíduos foram selecionados no Ambulatório de Dermatite de Contato do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Foi utilizada a Bateria Padrão Brasileira (Endoderme, São Paulo, SP, Brasil) que contém 30 substâncias (**Anexo 1**) (56, 150). Antes do teste ser fixado no dorso superior, os pacientes foram informados sobre evitar molhar o dorso e atividades que levassem à sudorese excessiva. Cada alérgeno foi colocado em contensores AlergoChambers (Neoflex, São Paulo, SP, Brasil), de 8 mm em uma segunda-feira e a retirada realizada após 48 horas da aplicação, em uma quarta-feira, com a realização da primeira leitura. A segunda leitura e confirmatória foi realizada após 96 horas, em uma sexta-feira.

Os indivíduos positivos a MCI/MI, foram reconvocados após 30 dias, no mínimo, para reaplicação do teste de contato apenas com esta substância. Somente os indivíduos que apresentaram leituras do teste de contato a MCI/MI, como positivo forte (++) ou positivo muito forte (+++) foram selecionados. A interpretação do teste de contato de acordo com Wilkinson *et al* (151), de acordo com o Grupo Internacional de Pesquisa em Dermatite de Contato é: - (negativo); + (positivo fraco: eritema, infiltração leve); ++ (positivo forte: eritema, infiltração moderada, vesículas); +++ (positivo muito forte: eritema, infiltração intensa, vesículas que coalescem formando bolhas).

O grupo controle (n=11) foi constituído por indivíduos com teste de contato negativo e sem histórico de dermatite atópica, de acordo com os critérios de Hanifin e Rajka, 1980 (152), inclusive com dosagem de IgE total sérica, devido fazer parte dos critérios menores desta classificação. Eles foram reconvocados após 30 dias do teste de contato completo, no mínimo, para aplicação de água estéril no local correspondente aos dos indivíduos com teste de contato positivo a MCI/MI. O sexo e a idade foram pareados entre os grupos controle e estudo.

Foram considerados aptos a este estudo: pacientes de ambos os sexos, que apresentaram teste de contato positivo forte ou positivo muito forte para MCI/MI (n=13), no caso dos controles com teste de contato negativo, com faixa etária de 18 a 55 anos e que assinaram o termo de consentimento (**Anexo 2**) após explicação clara, individual e extensa.

Foram considerados fatores de exclusão: idade abaixo de 18 anos ou acima de 55 anos, gestantes e lactantes, uso de imunossuppressores, antecedente de doença autoimune, antecedente de melanoma, positividade para os vírus HIV ou da hepatite C ou da hepatite B, exposição à radiação ultravioleta no local do teste de contato há menos de 15 dias do teste, uso de corticoide sistêmico ou tópico no local do teste há menos de 30 dias, presença de lesões cutâneas sugestivas de DCA ativas no momento da aplicação do teste de contato, alergia a qualquer componente do anestésico a ser utilizado nas biópsias e pacientes que se recusassem a assinar o termo de consentimento. Todos os pacientes do grupo estudo e os indivíduos controles saudáveis foram informados do conteúdo da pesquisa, assinando um termo de consentimento livre e esclarecido 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 (69963217.5.0000.0068 – **Anexo 3**).

3.2 Obtenção de células mononucleares (CMNs) de sangue periférico

Foram coletados 20 mL de sangue periférico em tubos heparinizados, diluídos, volume a volume, em solução fisiológica e centrifugado em solução gradiente de *Ficoll-Hypaque* (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, EUA) por 20 minutos a 2200 rpm para obtenção de CMNs. Após duas lavagens em meio de cultura RPMI-1640 (Gibco, Invitrogen, EUA) suplementado com gentamicina (10µg/mL) por 10 minutos a 1200 rpm, as células obtidas foram quantificadas e a concentração definida de acordo com o experimento. A viabilidade celular foi avaliada por uso do corante vital *Trypan blue* em câmara de Neubauer.

3.3 Obtenção de amostras de pele

Foram obtidas amostras de pele através de biópsias de aproximadamente 6mm de diâmetro (por meio de *punch*) da lesão reproduzida no contensor AlergoChamber dos indivíduos com reação positiva para MCI/MI ou da mesma região da pele de indivíduos saudáveis, no momento da retirada do teste de contato com somente MCI/MI (grupo DCA) ou água estéril (grupo não-DCA), ou seja, 48 horas após a fixação do mesmo. O tecido foi coletado após antissepsia com solução de clorexidina 0,5% alcoólica, colocação de campos de panos estéreis, aplicação de anestesia local infiltrativa com agulha gengival 27G e seringa de metal esterilizada, injetando 0,5mL de solução de cloridrato de lidocaína a 2% com hemitartarato de norepinefrina 1:50.000. Todo o procedimento foi realizado utilizando luvas e gazes estéreis. O fechamento da região de onde foi retirada a amostra foi feito com sutura simples, utilizando fio preto nylon 3.0. O paciente foi orientado quanto aos cuidados locais e quanto aos sinais de alerta

para possíveis complicações decorrentes do procedimento. No período de duas semanas o paciente retornou para procedimento de retirada dos pontos.

O tecido coletado foi dividido ao meio, uma parte armazenada em solução de formol a 10% e outra em solução de RNA *later* (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO/USA) e estocado a -70°C para análise de transcritos pelo método de reação em cadeia de polimerase em tempo real (PCR *real time*).

3.4 Indução de citocinas pelo composto MCI/MI

As CMNs ($2,0 \times 10^5$ células/poço) foram incubadas em microplacas de 96 poços (Costar, Cambridge, MA, U.S.A.) em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco) na presença ou não de MCI/MI (0,5 µg/mL, Endoderme, São Paulo, SP, Brasil) ou MI (0,5 µg/mL, Sigma, St. Louis, MO/USA) após experimentos preliminares, em que esta dose foi não-tóxica para as CMNs, durante 48 h à 37 ° C e 5% de CO₂. Em algumas culturas foi adicionado o inibidor da via NF-κB / IKK, TPCA-1 (1 µM, Invivogen San Diego, CA), por 1 hora antes de MCI/MI ou MI (Sigma, St. Louis, MO/USA) ou o agonista de TLR4, lipopolissacaríde (ultrapure LPS-SM, 1 µg/mL, Invivogen San Diego, CA). Os sobrenadantes foram colhidos após 48 horas de cultura e armazenados à -70°C. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.5 Determinação de citocinas

As citocinas: IL1β, IL-6, TNF foram mensuradas a partir dos sobrenadantes coletados, utilizando o kit flex (pg/mL) de cytometric bead array (CBA). Os limites mínimos de detecção para as citocinas foram: IL-1β: 10 pg/mL; IL-6: 2.4 pg/mL; TNF:

3.8 pg/mL. As aquisições foram feitas em citômetro de fluxo, LSR Fortessa (BD Biosciences) e os resultados foram gerados utilizando o BD CBA *Analysis Software*.

3.6 Análise da expressão por reação em PCR em tempo real

A avaliação dos transcritos: *TLR4*, *FOXP3*, *IL10*, *IL6*, *proIL1B*, *TGFβ*, *TNF*, e o controle interno pelo gene *GAPDH* foi realizada por PCR em tempo real.

As amostras de pele armazenadas em RNA *later* (Sigma) a 20°C foram processadas com o aparelho *Tissue Ruptor* (Qiagen Valencia, CA, USA). Após a remoção de fragmentos por centrifugação, os sobrenadantes foram utilizados para a extração de RNA. A extração de RNA total foi obtida com o kit *RNeasy Plus Mini Kit* (Qiagen) seguindo as recomendações do fabricante. Os níveis de RNA foram mensurados com auxílio do espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (ThermoScientific). Para obtenção de cDNA a partir do RNA total purificado foi utilizado o kit iScript™ (Biorad) de acordo com as recomendações do fabricante.

A reação de amplificação em tempo real foi feita utilizando, para cada amostra, 5 µL de cDNA, 7 µL da solução SYBR® Green (Applied Biosystem) e 2 µL dos *primers* sense e anti-sense (1 µM) para os genes alvos e controle interno *GAPDH*, todos sintetizados pela Invitrogen. A amplificação foi realizada no aparelho 7500 (Applied Biosystem) e a análise dos resultados foi realizada no programa 7500 Software v2.0.6 (Applied Biosystems) utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$, como já descrito por Livak e Schmittgen, 2001 (153) e os resultados foram normalizados. As sequências dos primers utilizados estão listadas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de qPCR.

Gene	Sequências
<i>FOXP3</i>	F: 5'-CAGCACATTCCCAGAGTTCCTC-3' R: 5'-GCGTGTGAACCAGTGGTAGATC-3'
<i>GAPDH</i>	F: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGT-3' R: 5'-GAAGATGGTGTATGGGATTTC-3'
<i>IL6</i>	F: 5'-CCTGAGAAAGGAGACATGTAA-3' R: 5'-GGCAAGTCTCCTCATTGAATCC-3'
<i>IL10</i>	F: 5'-TAGAGTCGCCACCCTGATGT-3' R: 5'-ACATCAAGGCGCATGTGAAC-3'
<i>pro-IL1B</i>	F: 5'-TCCCCAGCCCTTTTGTGA-3' R: 5'-TTAGAACCAAATGTGGCCGTG-3'
<i>TGFβ</i>	F: 5'-GGAAATTGAGGGCTTTCGCC-3' R: 5'-AGTGAACCCGTTGATGTCCA-3'
<i>TLR4</i>	F: 5'-CAGAGTTTCCTGCAATGGATCA-3' R: 5'-GCTTATCTGAAGGTGTTGCACA-3'
<i>TNF</i>	F: 5'-CCCAGGCAGTCAGATCATCTTC-3' R: 5'-GCTTGAGGGTTTGCTACAACAT-3'

F= Sense (*forward*). R= Anti-sense (*reverse*). GAPDH foi utilizado como controle interno.

FOXP3, *forkhead box P3*; GAPDH, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*; IL, interleucina; TGF, *transforming growth factor* - fator de transformação do crescimento; TLR, *toll like receptor*, TNF, *fator de necrose tumoral*.

3.7 Expressão de IL-6, IL-10, Foxp3, TLR4 por imunohistoquímica

Foram realizados cortes histológicos de 4µm de espessura de fragmentos de pele emblocadas em parafina em lâminas silanizadas (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO/USA, cód. A3648). Os cortes histológicos foram desparafinizados em banhos de xilol e posteriormente hidratados em concentrações decrescentes de etanol. O bloqueio da peroxidase endógena (H₂O₂) foi realizado em câmara escura com três incubações

em água oxigenada 3% por 10 minutos cada. Logo foi realizada a exposição antigênica em calor úmido em banho maria a 95°C, no qual as lâminas foram colocadas na solução *Target Retrieval Solution* pH 9,0 (cód. S2367, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) ou na solução *Target Retrieval Solution* (cód. S1699, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA), conforme a tabela abaixo (**Tabela 2**).

Tabela 2. Recuperação antigênica por calor úmido

Anticorpo	Tampão	Tempo de exposição (minutos)
Foxp3	<i>Target Retrieval Solution</i> pH 9,0	25
IL-6	<i>Target Retrieval Solution</i>	20
IL-10	<i>Target Retrieval Solution</i> pH 9,0	20
TLR4	<i>Target Retrieval Solution</i>	20

O bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido foi feito com incubação em solução de leite desnatado (Molico, Nestlé) a 10%, por 30 minutos. As lâminas foram incubadas com anticorpos primários diluídos em solução de albumina bovina (BSA) 1% em tampão PBS pH 7.4, *overnight* a 4°C (**Tabela 3**).

Tabela 3. Diluições dos anticorpos

Anticorpo	Clone	Código	Marca	Diluição	Sistema de amplificação
Foxp3	PH101 (rato)	144776-82	e-Bioscience	1:200	LSAB
IL-6	Policlonal (coelho)	21865-1-AP	Proteintech	1:50	Reveal
IL-10	Policlonal (cabra)	AF-217-NA	R&D Systems	1:20	LSAB
TLR4	25 (camundongo)	SC-293072	Santa Cruz	1:50	Novolink

No dia seguinte, as lâminas foram incubadas com os sistemas de amplificação (**Tabela 3**). Para a reação com o anticorpo anti-Foxp3, foi utilizado um anticorpo secundário anti-rato e posterior incubação com o streptavidina do sistema LSAB.

A seguir, os sítios de ligações foram revelados com solução cromógena de diaminobenzidina (3,3'-diaminobenzidine, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO/USA, cód. D5637) 0,03% acrescida de 1,2 ml de água oxigenada 3% e contracoradas com Hematoxilina de Carazzi.

Os controles negativos das reações foram obtidos através da omissão do anticorpo primário, substituído por PBS pH 7,4. Após a montagem das lâminas com resina *Permount* (FISHER Scientific, Fair Lawn, NJ/USA), elas foram escaneadas no aparelho *Aperio Scan-scope Cs* (Aperio Technologies, Vista, CA) no aumento de 20X e analisadas no software *Image-Pro Plus* (Media Cybernetics Inc., Bethesda, Maryland). A avaliação na distribuição global em micrômetros de IL-6, IL-10, Foxp3 e TLR4 ocorreu mediante a divisão de áreas marcadas pela área total da epiderme ou derme mensurada. Os tecidos utilizados como controles positivos das reações foram: amígdala para IL-6, cólon para IL-10, pele com líquen plano para Foxp3 e pele normal para TLR4.

3.8 Análise estatística

O teste de *Mann-Whitney* foi utilizado para comparar os dados de pacientes do grupo estudo (DCA) e pacientes do grupo controle (não-DCA) e o teste de *Wilcoxon* para amostras pareadas para comparações dentro do grupo DCA e não-DCA. O nível de significância foi considerado quando $p \leq 0.05$. Todas as representações gráficas foram executadas com auxílio do software GraphPad Prisma versão 7.0 (GraphPad Software).

4. Resultados

4. Resultados

4.1 Características demográficas dos controles e pacientes com alergia a MCI/MI

Os pacientes com DCA (n=13), a proporção foi de 4 homens e 9 mulheres, com idade média $43,61 \pm 11,62$ anos (variação: 21-55 anos). A maioria dos pacientes com DCA com teste de contato positivo para MCI/MI teve reação forte (2+, 11/13, 84,6%) e apenas dois pacientes mostraram positividade para outras substâncias na bateria padrão de teste de contato, um para sulfato de níquel e outro para lanolina e perfume mix (**Tabela 4**). Após 48 horas da retirada do teste de contato positivo para MCI/MI em pacientes com DCA ou negativo para a bateria de todas as substâncias, a biópsia da região do teste de contato foi realizada. Nenhum paciente era soropositivo a hepatites ou HIV. Quanto a IgE Total (os pacientes que dosaram a IgE foi realizada na Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas – Faculdade de Medicina/USP) (Valor de referência – acima de 16 anos – inferior a 100 kU/L), a média foi de $275,6 \pm 252,76$ (variação: 37,7-551,6 kU/L), para os que foram solicitados (n=5).

A distribuição dos indivíduos não-DCA por sexo foi predominante de mulheres (8) em relação aos homens (3), com idade média de $41,18 \pm 10,28$ anos (variação: 24-53 anos). Quanto a IgE Total, a média foi de $173,86 \pm 227,72$ (variação: 14,9- 693,2 kU/L), para os que foram solicitados (n=8). As idades e os valores de IgE total dos grupos DCA e não-DCA foram pareados de acordo com o teste estatístico de *Mann-Whitney*, que demonstrou que os grupos possuíam níveis similares de IgE.

Tabela 4. Tabela demográfica de indivíduos com DCA a MCI/MI e controles

Indivíduos	Gênero	Idade (anos)	Teste original (ano)	Reteste Positivo (2018) (MCI/MI)	Outras substâncias	Ocupação
DCA1	F	53	++ (2015)	++	Sulfato de níquel (+++)	Diarista
DCA2	F	54	++ (2014)	++	-	Do lar
DCA3	M	55	++ (2016)	++	-	Pedreiro
DCA4	F	36	++ (2016)	++	-	Auxiliar de escritório
DCA5	F	51	+++ (2016)	++	-	Técnica de enfermagem
DCA6	F	47	++ (2017)	++	-	Do lar
DCA7	M	46	+++ (2017)	+++	Lanolina (++), Perfume mix (+)	Padeiro
DCA8	F	52	++ (2018)	++	-	Do lar
DCA9	M	35	+++ (2017)	+++	-	Auxiliar de almoxarifado
DCA10	F	22	++ (2017)	++	-	Caixa de restaurante
DCA11	F	21	++ (2015)	++	-	Esteticista
DCA12	F	43	++ (2018)	++	-	Oficial administrativo
DCA13	M	52	+++ (2011)	++	-	Profissional de tecnologia da informação
Média	4M/9F	43,61± 11,62 [§]				
Não-DCA	3M/8F	41,18±10,28 [§]	-	-	-	

DCA (Dermatite de Contato Alérgica) e não-DCA (Sem Dermatite de Contato Alérgica); [§] média ± SD.

4.2 MCI/MI é capaz de induzir citocinas através da sinalização NF- κ B

Para melhor investigar se os compostos MCI/MI ou MI são capazes de desencadear uma resposta pró-inflamatória nas CMNs de sangue periférico, avaliamos a produção de citocinas destas células na presença destes dois compostos. A **Figura 3** mostra que MCI/MI (0,5 μ g/mL) ou MI (0,5 μ g/mL) foram capazes de induzir TNF, IL-1 β ou IL-6 em ambos os grupos.

Entre os indivíduos respondedores, DCA ou não-DCA, altos níveis de citocinas foram observados mais em MI do que MCI/MI (**Figura 4**). Não foi possível detectar a produção de IL-17, IL-13 e IL-10 por CMNs em nenhum dos grupos analisados.

Para avaliar se a produção dessas citocinas foi desencadeada pela sinalização da via NF- κ B, utilizamos um inibidor seletivo de I κ B / IKK, TPCA-1 (1 μ M). As células foram primeiro incubadas com TPCA seguido por MCI/MI ou MI. Podemos observar que o TPCA-1 é capaz de inibir essas citocinas pró-inflamatórias induzidas tanto pelo composto MCI/MI quanto pela MI. As percentagens de inibição de TPCA variaram de 50-87% em ambos, MCI/MI ou MI. Para o controle positivo da sinalização de NF- κ B, foi utilizado o LPS como agonista do TLR-4 (**Figura 5**).

Estes achados mostram, pela primeira vez, que o composto MCI/MI induz a ativação de citocinas pró-inflamatórias, dependente da via NF- κ B, independente do estado alérgico.

Figura 3. MCI/MI induziu citocinas através da sinalização de NF- κ B em CMNs de indivíduos com e sem DCA. CMNs de indivíduos com DCA para MCI/MI (DCA, n = 4, símbolo fechado) e não-DCA (não-DCA, n = 3, símbolo aberto) foram incubadas com um inibidor de NF- κ B (TPCA-1, 1 μ M) durante 1 hora e estimuladas com 0,5 μ g/mL de MCI/MI ou MI durante 48 horas. Os sobrenadantes das culturas foram determinados para TNF, IL1 β e IL-6 por citometria de fluxo.

Figura 4. Indução de citocinas por estimulação de MCI/MI ou MI por sujeito. CMNs de indivíduos com DCA para MCI/MI (DCA, n = 4, símbolo fechado) e não-DCA (não-DCA, n = 3, símbolo aberto) foram incubadas com MCI/MI ou MI durante 48 horas. Os sobrenadantes das culturas foram determinados para TNF, IL1 β e IL-6 por citometria de fluxo.

Figura 5. Citocinas induzidas por LPS de CMNs de indivíduos com e sem DCA para o composto MCI/MI. (DCA, $n = 5$, símbolo fechado) e não-DCA (não-DCA, $n = 6$, símbolo aberto). As CMNs foram incubadas com um inibidor de NF- κ B (TPCA-1, 1 μ M) durante 1 hora antes da estimulação com LPS (1 μ g/mL) durante 48 horas.

4.3 Expressão transcricional de fatores pró-inflamatórios e reguladores na DCA para MCI/MI

A fim de avaliar a expressão de componentes relacionados com eventos pró-inflamatórios da imunidade inata no local da reação a MCI/MI, análises de PCR em tempo real de *TLR4*, *IL6*, *TNF*, *pro-IL1B*, bem como fatores reguladores, *FOXP3*, *IL10* e *TGF β* foram realizados. A **Figura 6** mostra uma modulação negativa da expressão de *TLR4* e aumento da expressão de *IL6* em pacientes com DCA em comparação com indivíduos sem DCA. As análises foram realizadas 48 horas após a aplicação do teste de contato (no dia da remoção deste). Neste período, não foram detectadas alterações nas expressões *pro-IL1B* e *TNF*. Em seguida, para verificar o equilíbrio dos fatores reguladores, avaliou-se a expressão de *FOXP3*, como inferência de células Tregs, crucial para o controle das reações da DCA. Detectamos um aumento nos níveis de expressão de *FOXP3* em pacientes com DCA, acompanhados por níveis elevados das citocinas reguladoras *IL10* e *TGF- β* (**Figura 7**). Em conjunto, esses achados mostram

que a reação ao composto MCI/MI altera a expressão de TLR4 e é capaz de desencadear mecanismos reguladores.

Figura 6. Fatores de expressão pró-inflamatórios alterados na DCA para o composto MCI/MI. Os níveis de RNAm de *TLR4*, *pro-IL1B*, *IL6* e *TNF* foram analisados nas amostras de pele obtidas através de biópsias realizadas em 48 horas, após a remoção do teste de contato positivo para indivíduos com DCA a MCI/MI (n = 13, barra fechada) e água estéril para não-DCA (n = 8-10, barra aberta) por PCR em tempo real. Os valores são expressos em medianas e intervalos interquartis. ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Figura 7. Aumento dos níveis de expressão de fatores reguladores na DCA para o composto MCI/MI. Os níveis de RNAm de *FOXP3*, *IL10* e *TGFβ* foram analisados nas amostras de pele obtidas através de biópsias realizadas em 48 horas, após a remoção do teste de contato positivo para indivíduos com DCA a MCI/MI (n = 13, barra fechada) e água estéril para não-DCA (n = 9-11, barra aberta) por PCR em tempo real. Os valores são expressos em medianas e intervalos interquartis. * $p \leq 0.05$.

4.4 Expressão de proteína na reação cutânea a MCI/MI

Após a avaliação dos níveis de transcrição no local da reação ao composto MCI/MI, selecionamos alguns alvos para serem avaliados quanto a expressão proteica, como TLR4, IL-6 e as proteínas reguladoras FOXP3 e IL-10, por imunohistoquímica.

Expressões similares de TLR4 (**Figura 8**), IL-6 (**Figura 9**), FOXP3 (**Figura 10**) e IL-10 (**Figura 11**) foram detectadas em ambos os grupos analisados na camada epidérmica. Enquanto que na região dérmica, o local principal onde ocorreu a reação alérgica, expressões aumentadas de TLR4 e IL-6, bem como para FOXP3 e IL-10 foram detectadas. Os níveis de transcritos e a análise de proteínas confirmam seus níveis de transcritos na fase de elicitação em associação a fatores da fase de resolução da reação de DCA.

TLR4

Figura 8. Expressão de TLR4 na resposta da DCA para o composto MCI/MI. A. Coloração de TLR4 em amostras de pele da reação de DCA a MCI/MI em pacientes DCA e em amostras de pele com água estéril em pacientes não-DCA. Ampliação de 40 $\times$. B. A quantificação foi realizada na epiderme e derme da pele da reação de DCA (n = 13, símbolo fechado) e de pacientes não-DCA (n = 11, símbolo aberto). Os valores são expressos como medianas e intervalos interquartis. * p < 0,05.

IL-6

A)

Não-DCA

DCA

B)

Figura 9. Expressão de IL-6 na resposta da DCA para o composto MCI/MI. A. Coloração de IL-6 em amostras de pele da reação de DCA a MCI/MI em pacientes DCA e em amostras de pele com água estéril em pacientes não-DCA. Ampliação de 40 $\times$. B. A quantificação foi realizada na epiderme e derme da pele da reação de DCA (n = 13, símbolo fechado) e de pacientes não-DCA (n = 11, símbolo aberto). Os valores são expressos como medianas e intervalos interquartis. * p < 0,05.

FOXP3

A)

B)

Figura 10. Expressão de FOXP3 na resposta da DCA para o composto MCI/MI.

A. Coloração de FOXP3 em amostras de pele da reação de DCA a MCI/MI em pacientes DCA e em amostras de pele com água estéril em pacientes não-DCA. Ampliação de 40 ×. B. A quantificação foi realizada na epiderme e derme da pele da reação de DCA (n = 13, símbolo fechado) e de pacientes não-DCA (n = 11, símbolo aberto). Os valores são expressos como medianas e intervalos interquartis. ** p < 0,01.

IL-10

A)

Não-DCA

DCA

B)

Figura 11. Expressão de IL-10 na resposta da DCA para o composto MCI/MI. A. Coloração de IL-10 em amostras de pele da reação de DCA a MCI/MI em pacientes DCA e em amostras de pele com água estéril em pacientes não-DCA. Ampliação de 40 ×. B. A quantificação foi realizada na epiderme e derme da pele da reação de DCA (n = 13, símbolo fechado) e de pacientes não-DCA (n = 11, símbolo aberto). Os valores são expressos como medianas e intervalos interquartis. ** p < 0,01.

5. Discussão

5. Discussão

MCI/MI *in vitro* em dose mais baixa foi capaz de induzir TNF, IL-1 β e IL-6 por CMNs de sangue periférico em indivíduos com e sem DCA. Além disso, observamos que nos indivíduos respondedores, houve maior produção de citocinas pró-inflamatórias pelo MI.

Apesar das amostras de pele serem reduzidas em nosso trabalho, alguns indivíduos que produziram citocinas elevadas após a incubação dos sensibilizadores, não parecem se relacionar com o grau clínico do teste de contato, frequência de contato com alergia ou ocupação do paciente.

Os nossos dados corroboram os de Masjedi *et al* (111), que mostrara, que TNF- α e IL-1 β estimuladas por MCI/MI são encontrados por ambos, grupos alérgico e não-alérgico, sugerindo que a indução dessas citocinas não está associada a uma resposta alérgica ao composto MCI/MI. Portanto, nossos dados sugerem que a produção das citocinas TNF, IL-1 β e IL-6 induzidas por MCI/MI em CMNs de sangue periférico pode ser devido a um processo irritativo inespecífico, capaz de induzir uma resposta pró-inflamatória.

Considerando que os haptenos podem ativar a imunidade inata via TLR (100), tentamos bloquear TLR4 com LPS-RS, de *Rodobacter sphaeroides*, um antagonista seletivo de TLR4 nas culturas de CMNs, para verificar a interferência de MCI/MI na indução de citocinas. Não conseguimos verificar o uso de TLR4 por MCI/MI ou MI. No entanto, ao usar TPCA-1, um antagonista de I κ B quinases, que inibe a sinalização de NF- κ B e também bloqueia a sinalização de STAT3, observamos uma inibição de citocinas inflamatórias induzidas por MCI/MI ou MI tais como TNF, IL-1 β e IL-6. A sinalização de NF- κ B não é exclusiva e outras vias de sinalização poderiam participar da produção dessas citocinas. Em contraste, o metal iônico, como o Ni²⁺, desencadeou

uma resposta inflamatória ao ativar diretamente o TLR4 humano específico do local, através do mecanismo dependente da dimerização que requer seu co-receptor MD2 (104). A ativação imune inata pelo Ni^{2+} é única ou compartilhada por alérgenos metálicos relacionados, como o Co^{2+} (95).

Até o momento, não há estudos quanto a via de sinalização da produção de citocinas para o composto MCI/MI, portanto nossos dados evidenciam que a produção de citocinas pró-inflamatórias pelo composto é dependente da via NF- κ B.

Ao avaliar a presença de fatores imunológicos pró-inflamatórios, como *TLR4*, *IL6*, *TNF* e *pro-IL1B* no local da reação do teste de contato, observamos uma modulação negativa dos transcritos de *TLR4* enquanto a *IL6* foi regulada positivamente em indivíduos com DCA. Temos que considerar que as análises de PCR em tempo real foram realizadas em 48 horas após a fixação do teste de contato. Nesse período, é possível que eventos precoces de respostas inatas possam ser modulados como mecanismos homeostáticos. No entanto, o aumento do nível de expressão da proteína TLR4 foi detectado na camada dérmica, sem alteração na camada epidérmica.

Muitos tipos de células poderiam contribuir para a expressão de TLR4 no local do teste de contato, incluindo queratinócitos da epiderme, DCs dérmicas, fibroblastos, macrófagos, monócitos, células endoteliais de microvasos dérmicos humanos e outras células imunes inatas (105, 154). A diminuição dos níveis de TLR4 na epiderme, observado em outros estudos, pode ser decorrente de um mecanismo de controle, considerando que o TLR4 é capaz de regular negativamente a proliferação de queratinócitos (155). Desta forma, apesar dos transcritos estarem diminuídos, os níveis proteicos estão equilibrados na DCA, o que pode ser um mecanismo para manutenção da homeostase celular.

É possível observar que a expressão de TLR4 nos indivíduos do grupo controle são mais heterogêneas do que os do grupo estudo, o que pode representar um reflexo da exposição a LPS de bactérias gram-negativas, ligante de TLR4. Tem sido descrito que na dermatite de contato, dermatite atópica e psoríase a expressão de TLR4 é concentrada na camada superior da pele sendo que nas peles saudáveis situa-se mais na camada basal (156). Além disto, os autores descrevem que por PCR há baixa expressão de TLR4 nas dermatites. Outra hipótese é de que o TLR4 possa ser um alvo do composto, ou seja que utilize este receptor, e assim a sua interação pode promover uma regulação negativa no transcrito do receptor. Na DCA para o níquel foi descrito que o metal pode interagir com resíduos de AH, ativar via TLR4 em humanos (91, 104). Contudo não fomos capazes de demonstrar se o composto MCI/MI pode interagir diretamente com o receptor TLR4.

Apesar do TLR4, outros PRRs podem contribuir com a produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a via do inflamassoma que culmina na produção da citocina pró-inflamatória IL-1 β . De fato, detectamos a expressão de transcritos *pro-IL1B* em níveis semelhantes entre os grupos analisados. A via do inflamassoma é um dos possíveis caminhos através dos quais o níquel pode ser reconhecido pelo sistema imune inato através de NLRP3 na epiderme, ativando a via do inflamassoma (103).

Um estudo do extrato córneo da epiderme obtido por *tape stripping* após o teste de contato, foi avaliada uma gama de mediadores, a vários agentes de contato, mostrando que o lauril sulfato de sódio (*Sodium Lauryl Sulfate* - SLS) e MCI/MI induziram a maior parte dos imunomediadores. Detectaram altos níveis de IL-16 no teste de contato para alérgenos, mas não para SLS. Entre os mediadores, foi avaliado IL-6, TNF- α , IL1 β , CXCL10, sendo que apenas CXCL10 diferiu em relação ao controle *petrolatum* (157).

Os fatores pró-inflamatórios são comumente encontrados em eventos precoces da DCA. A IL-1 β é necessária para a migração de CLs induzidas no processo de sensibilização de contato, juntamente com várias outras citocinas (TNF- α , GM-CSF, IL-1 α , IL-6 e IL-10), de queratinócitos (158, 159). As CLs podem apresentar antígenos para as células T virgens e de memória. Além disso, o hapteno penetra na derme e também pode ser apresentado por DCs dérmicas (160).

Não houve diferença quanto aos transcritos de *TNF* no nosso estudo, apesar disso, este é um componente pró-inflamatório que contribui para a DCA. Um estudo com murinos com DCA ao DNCB, ao utilizar o antagonista de TNF, VARV-CrmB (*Cytokine response-modifying protein B* - Proteína modificadora da resposta de citocinas) que é um receptor recombinante do vírus da varíola, houve redução da migração de leucócitos para a pele na fase de elicitação, além de normalizar os efeitos da DCA ao DNCB (161).

Detectamos um aumento dos níveis de mRNA de *IL6* e da proteína na camada dérmica de pacientes com DCA. A IL-6 pode ser produzida por macrófagos de humanos e camundongos, especialmente os do tipo M2, subtipo M2b, que apesar de também produzirem altos níveis de TNF- α e IL-1 β , produzem quantidades consideráveis de IL-10, indicando que essas células possuem plasticidade e podem ser pró-inflamatórias (162-164).

A IL-6 também é regulada por irritantes, induzindo a infiltração de células mononucleares, contribuindo para a inflamação da pele. É uma citocina pró-inflamatória associada, paradoxalmente, à cicatrização da pele e à inflamação. Curiosamente, foi demonstrado que a IL-6 também pode exercer alguns efeitos anti-inflamatórios na dermatite irritativa e que esses efeitos podem ser dependentes da natureza química do irritante (165).

A imunidade inata inadequada pode ser influenciada pela indução do mecanismo regulador na fase de resolução da DCA. Mecanismos reguladores que levam à regulação da DCA são importantes para limitar o dano tecidual excessivo, promover o término da reação alérgica e manter a integridade da pele. Detectamos alta expressão de FOXP3 e IL-10 gênica e proteica na reação da DCA para MCI/MI. A maior expressão foi detectada na camada dérmica, região onde as células Tregs expressando FOXP3 poderiam atuar para controlar as células T efectoras, que em conjunto com a IL-10, são essenciais na regulação da resposta DCA.

As células Tregs são capazes de secretar IL-10, enquanto outras células T podem também contribuir para esta citocina, tais como as células Tr1. Acredita-se que esses linfócitos, células Tr1, estejam envolvidos na tolerância ao hapteno induzida pela radiação ultravioleta em camundongos (140) ou culturas de queratinócitos humanos com a irradiação UVB (166).

Além disso, a presença de Tregs na DCA, parece ser essencial para controlar a expansão de células TCD8⁺ efectoras, por outro lado, a expansão exagerada de células TCD8⁺ pode ser uma consequência da disfunção das células Tregs (121).

Outro fator regulador avaliado na reação ao composto MCI/MI, foi *TGFβ*, que foi encontrado em níveis elevados do transcrito. O TGF-β1 tem um papel crítico no desenvolvimento de CLs. Além disso, em ratos, após a resolução da infecção cutânea pelo vírus da vaccinia, as células TCD8⁺ de memória circulantes que migram através da pele, requerem a citocina TGF-β para a sua persistência. A ativação de TGF-β na pele é necessária para a recirculação persistente de células TCD8⁺ de memória (167), além de sustentar localmente um microambiente que promove a diferenciação e expansão de Tregs específicas aos alérgenos estimulando a tolerância do sistema imunológico (120).

Em conjunto, estes dados mostram que a sensibilização ao composto MCI/MI tem impacto nos eventos imunológicos precoces, enquanto é capaz de desencadear uma via reguladora expressiva. Nossos dados evidenciam que alguns compostos orgânicos hidrofílicos podem ativar a resposta pró-inflamatória, via TLR4, além de evocar mecanismos reguladores, provavelmente por células Tregs e IL-10.

Embora não tenhamos detectado a co-localização de Foxp3 com CD4 no tecido analisado, para constatar a presença de células Tregs, e avaliar o tipo celular que está relacionado com aumento de IL-10 observado, será nossa perspectiva avaliar este quesito.

Em resumo, após o estímulo com MCI/MI na pele, observamos uma regulação positiva de fatores pró-inflamatórios, como TLR4, IL-6 e de componentes reguladores FOXP3 e IL-10. Todos estes foram detectados na camada dérmica na reação da DCA para MCI/MI, que também induz a ativação de citocinas pró-inflamatórias em CMNs de sangue periférico, dependente da via NF- κ B, independente do estado alérgico (**Figura 12**).

Figura 12. Representação esquemática da reação de DCA para o composto MCI/MI. A reação é regulada positivamente pelos fatores pró-inflamatórios TLR4, IL-6 e pelos componentes reguladores FOXP3 e IL-10 na derme. Além de promover a ativação de citocinas pró-inflamatórias em CMNs de sangue periférico, dependente da via NF- κ B, independente do estado alérgico.

6. Conclusão

6. Conclusão

- MCI/MI induz a produção das citocinas TNF, IL1 β e IL-6, dependente da via de sinalização NF- κ B, independente do estado alérgico dos indivíduos, provavelmente por um efeito irritativo.
- A fase de elicitação da reação de DCA por MCI/MI apresenta regulação positiva, na camada dérmica, de fatores pró-inflamatórios, como TLR4, IL-6 e de componentes reguladores FOXP3 e IL-10. Assim, tal reação ativa a resposta pró-inflamatória e também evoca mecanismos reguladores, provavelmente por células Tregs e IL-10.

7. Anexos

ANEXO 1

Bateria Padrão Brasileira sugerido pelo Grupo Brasileiro de Estudo em Dermatite de Contato (GBEDC) (56)

Substância	Concentração (%)	Veículo
Antraquinona	2	Vaselina sólida
Bálsamo-do-peru	25	Vaselina sólida
PPD - “mix” (a)	0,4	Vaselina sólida
Hidroquinona	1	Vaselina sólida
Bicromato de potássio	0,5	Vaselina sólida
Propilenoglicol	10	Vaselina sólida
Butil fenol para terciário	1	Vaselina sólida
Neomicina	20	Vaselina sólida
Irgasan	1	Vaselina sólida
Kathon® CG (MCI/MI)	1	Água
Cloreto de cobalto	1	Vaselina sólida
Lanolina	30	Vaselina sólida
Tiuran-“mix” (b)	1	Vaselina sólida
Etilenodiamina	1	Vaselina sólida
Perfume-“mix” (c)	7	Vaselina sólida
Mercapto-“mix” (d)	2	Vaselina sólida
Benzocaína	5	Vaselina sólida
Quaternium 15	1	Vaselina sólida
Quinolina-“mix” (e)	6	Vaselina sólida
Nitrofurazona	1	Vaselina sólida
Parabeno-“mix” (f)	15	Vaselina sólida
Epóxi-resina	1	Vaselina sólida
Timerosal	0,1	Vaselina sólida
Terebintina	10	Vaselina sólida
Carba-“mix” (g)	3	Vaselina sólida
Prometazina	1	Vaselina sólida
Sulfato de níquel	5	Vaselina sólida
Colofônia	20	Vaselina sólida
Parafenilenodiamina	1	Vaselina sólida
Formaldeído	1	Água

(a) N-Isopropil-N-fenil-PPD 0,2%, N-N-difenil-PPD 0,2%; (b) Tetrametiltiuran monossulfeto 0,5%, Tetrametiltiuram dissulfeto 0,5%; (c) Eugenol 1%, Ioeugenol 1%, Geraniol 1%, Álcool cinâmico 1%, Aldeído alfa amilcinâmico 1%, Oak moss absoluto 1%, Hidroxicitronelal 1%; (d) N-Ciclohexil 2 benzotiazol sulfenamida 0,5%, Morfolinilmercaptobenzotiazol 0,5%, Dibenzotiazol dissulfito 0,5%, Mercaptobenzotiazol 0,5%; (e) Clioquinol 3%, Clorquinaldol 3%; (f) Butil 3%, Etil 3%, Propil 3%, Benzil 3%, Metil 3%, Parabenos; (g) Difenilguanidina 1%, Dimetilcarbamato de zinco 1%, Dietilcarbamato de zinco 1%.

ANEXO 2

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DA PESQUISA

Título da pesquisa: Mecanismos pró-inflamatórios e reguladores na dermatite de contato alérgica a metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona

Pesquisador principal: Professora Doutora Maria Notomi Sato

Instituto: Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da USP

Convite à participação, justificativa e objetivos da pesquisa: Convidamos o(a) Sr(a). para participar da pesquisa

“Mecanismos pró-inflamatórios e reguladores na dermatite de contato alérgica a metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona”. O objetivo dessa pesquisa é estudar e entender melhor a sua doença de pele, a dermatite de contato alérgica. Dermatite de contato alérgica é uma alergia da pele. Esse tipo de alergia é causada pelo contato da pele com substâncias alérgicas. Neste estudo avaliaremos duas substâncias alérgicas que são a causa da sua alergia, a metilisotiazolinona e a metilcloroisotiazolinona. A metilisotiazolinona e a metilcloroisotiazolinona estão presentes em muitos produtos que usamos no dia a dia, como por exemplo, xampus e condicionadores, e também em produtos industriais, como tintas de parede. Nesta pesquisa estudaremos como os componentes do sistema imunológico agem na alergia por metilisotiazolinona e metilcloroisotiazolinona. Por causa deste estudo, poderemos entender melhor os mecanismos imunológicos que acontecem na sua alergia, compreender melhor a sua doença e também permitir a descoberta, no futuro, de novas terapias e medicações.

Procedimentos que serão realizados e métodos que serão empregados: Para que seja possível realizar este estudo, precisaremos realizar dois exames que não seriam solicitados normalmente para o tratamento da sua alergia. Esses dois exames somente serão realizados por causa desta pesquisa. Um deles é a biópsia de pele. Para a biópsia de pele, numa segunda feira, será aplicada a metilisotiazolinona e a metilcloroisotiazolinona em uma câmara (objeto parecido com uma tampinha de metal) nas costas. Essa câmara terá de permanecer colada nas costas até a quarta feira seguinte, ou seja, por dois dias. Durante esse período a câmara não poderá ser molhada e nem o participante poderá pegar sol na região. Quando a câmara for removida, dois dias depois da aplicação, a biópsia de pele será feita. Na biópsia de pele será retirado de um pedaço de pele das costas de 6mm (um pouco menor que a metade de uma moeda nova de 1 centavo) do mesmo lugar onde estava aplicada a câmara. A biópsia será feita somente depois de injeção de anestesia local na pele e, após a retirada do pedaço de pele, serão dados de um a três pontos para fechar a pele. A biópsia será realizada no Hospital das Clínicas e os pontos serão retirados também no Hospital das Clínicas, duas semanas após a realização da biópsia. No mesmo dia da biópsia será feito o outro exame, que é a coleta de 20ml (quatro colheres de sopa) de sangue. O sangue será colhido de uma veia do antebraço direito ou esquerdo no laboratório da Dermatologia. Tanto o sangue

colhido quanto o material da biópsia, serão enviados para análise no laboratório da Dermatologia e submetidos a exames específicos: citometria de fluxo, imunohistoquímica e reação em cadeia da polimerase. Estas análises específicas permitirão identificar como os mecanismos pró-inflamatórios e reguladores participam da dermatite de contato alérgica por metilisotiazolinona e metilcloroisotiazolinona.

Possíveis desconfortos e riscos decorrentes da participação na pesquisa: No local de aplicação das substâncias nas costas poderá ocorrer vermelhidão, alergia e coceira durante o tempo em que estiver com as substâncias aplicadas e até alguns dias depois. No momento da coleta de sangue o participante poderá sentir dor no local da picada. No momento da coleta de sangue algumas pessoas podem sentir tontura ou enjôo. Após a coleta, o participante pode sentir um pouco de dor no local no dia em que o sangue for colhido. Também pode ficar uma mancha roxa no local da coleta e essa mancha geralmente leva uma semana para sair. Na biópsia o participante poderá sentir dor na hora em que o anestésico for injetado na pele. Depois da anestesia o participante poderá sentir pressão na pele mas não deverá sentir dor. Depois da biópsia o local pode ficar dolorido por alguns dias. Também poderá ocorrer, nos dias depois da biópsia, formação de mancha roxa, coceira, vermelhidão e também infecção no local. No momento da retirada dos pontos o participante também poderá sentir um pouco de desconforto ou até dor. No local da biópsia ficará uma cicatriz, que terá mais ou menos o mesmo tamanho da biópsia (6mm). Essa cicatriz poderá ser uma linha branca, como também um quelóide. Todas as complicações decorrentes do procedimento serão tratadas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

Benefícios esperados para o participante: No momento não há benefício direto para o participante. A participação nesta pesquisa será importante para que seja possível entender melhor a sua doença e o papel do sistema imunológico nela. Além disso, essa pesquisa poderá permitir que no futuro surja algum medicamento ou terapia nova para a sua doença. Nesse caso, o participante terá acesso garantido a qualquer benefício ou tratamento para sua doença que surja a partir desta pesquisa.

Medidas para reduzir e evitar efeitos adversos: A aplicação das substâncias nas costas será feita por um biólogo com as substâncias em baixa concentração e apenas nos participantes que estiverem sem lesões de alergia ativas. A coleta de sangue será realizada por um enfermeiro experiente, num ambiente adequado para isso, e com a técnica correta. A biópsia de pele e a retirada dos pontos será feita por médicos dermatologistas. Todos os materiais utilizados serão estéreis e serão empregadas as técnicas corretas de limpeza e de biópsia. O participante terá livre acesso aos profissionais participantes da pesquisa antes, durante e após os exames.

Esclarecimento sobre a forma de acompanhamento e assistência a que terão direito os participantes da pesquisa: Após a retirada dos pontos, o participante não precisará continuar nenhum acompanhamento específico para a pesquisa. O participante continuará o seguimento no Ambulatório de Alergia do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da USP conforme as condições do seu quadro clínico de alergia e de forma independente da pesquisa. É importante ressaltar que se você não quiser fazer parte desta pesquisa isso não afetará em nada seu sigilo, privacidade, seguimento ou tratamento no Ambulatório de Dermatite de Contato do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da USP. Caso você decida participar, você será mantido atualizado quanto aos resultados da pesquisa que forem do conhecimento dos pesquisadores, sejam eles resultados parciais, finais, ou que

ocorram futuramente em decorrência da pesquisa. O contato deverá ser feito conforme o participante desejar, via telefone, mensagem de texto em celular, e-mail ou carta. Também é importante ressaltar que, mesmo que você aceite participar do estudo, você é livre para decidir deixar de fazer parte dele à qualquer momento e sem nenhum prejuízo ao seu sigilo, privacidade, acompanhamento ou tratamento no Ambulatório de Alergia do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da USP.

Garantia de que o participante receberá uma via do termo de consentimento: Esse termo de consentimento é feito em duas vias. Uma fica com o participante e outra com o pesquisador. Caso você decida participar da pesquisa, uma das vias deste termo deverá ser entregue a você.

Despesas e compensações: O participante do estudo não terá despesas pessoais em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

Material biológico: O material biológico obtido na biópsia de pele para esta pesquisa será armazenado de acordo com a resolução 441/2011 do Conselho Nacional de Saúde. O material coletado para esta pesquisa permanecerá armazenado em local apropriado e poderá ser utilizado apenas para esta pesquisa. Qualquer pesquisa futura, em que se deseje utilizar este material, deverá primeiro informar o participante que forneceu o material e obter sua aprovação, assinatura de novo termo de consentimento e nova aprovação pelo sistema CEP/CONEP. O participante, ou outra pessoa por ele indicado em caso de óbito ou incapacidade, é livre para negar o uso do material em outras pesquisas sem qualquer prejuízo ao seu sigilo, privacidade, tratamento ou seguimento no Ambulatório de Alergia do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. Em caso de necessidade de descarte do material armazenado, o participante deverá ser informado quanto aos motivos do descarte e caberá a ele autorizar o descarte. Em caso de perda ou destruição do material armazenado, o paciente também deverá ser informado do acontecimento e dos motivos que levaram a ele. Caso haja necessidade de transferir o material armazenado para outro local o participante também deverá ser informado sempre que possível. Se não for possível o contato com o participante, será apresentada justificativa ao Sistema CEP/CONEP. A pele coletada e armazenada é do participante da pesquisa e ficará guardada no Biorrepositório do Laboratório da Dermatologia e sob a guarda e responsabilidade da instituição.

Acesso aos pesquisadores: Em qualquer etapa do estudo, o participante terá livre acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. O principal investigador é a Dra Maria Notomi Sato, que pode ser encontrada no endereço: Instituto de Medicina Tropical, Prédio II, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 500, telefones: 3061-7499/3061-7457, e e-mail: marisato@usp.br. 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: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br.

Fui suficientemente informado a respeito do estudo “Mecanismos pró-inflamatórios e reguladores na dermatite de contato alérgica a metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona”.

Eu discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável Professora Doutora Maria Notomi Sato ou pessoa por ela delegada: Heliana Freitas de Oliveira Góes sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

Assinatura do participante /representante legal

Data / /

Assinatura do responsável pelo estudo

Data / /

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO (OU ETIQUETA INSTITUCIONAL DE IDENTIFICAÇÃO) DO PARTICIPANTE 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.)

.....

NOME:

.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE No :

SEXO : .M ☐ F ☐ DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO No APTO: BAIRRO:.....

CIDADE: CEP:.....

TELEFONE: DDD (.....)PROFISSÃO:.....

POSITIVIDADE: POSITIVIDADE TESTE PRÉVIO:.....

DATA:

ANEXO 3

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise dos receptores de reconhecimento de padrões e inflamassomas na dermatite de contato alérgica a metilcloroisotiazolinona / metilisotiazolinona

Pesquisador: Maria Notomi Sato

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 69963217.5.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.162.138

Apresentação do Projeto:

Estudo sobre mecanismo específico responsável pela indução da resposta imunológica ao composto MCI/MI na dermatite de contato alérgica.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a ativação de componentes da imunidade inata na fase de elicitação da dermatite de contato ao componente MCI/MI, pela indução de espécie reativa de oxigênio, expressão de receptores Toll-Like e de inflamassomas. Serão avaliados 30 indivíduos e 15 em grupo controle, onde serão colhidos 20 ml de sangue periférico e realizada biópsia.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são os envolvidos na realização do teste de contato, da coleta de sangue e complicações locais da biópsia.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não apresenta questionamentos de natureza ética.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Aprovado.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 2.162.138

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_902344.pdf	16/06/2017 21:55:34		Aceito
Outros	Registro_Online_16476.pdf	16/06/2017 21:53:03	Maria Notomi Sato	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	07/06/2017 15:21:36	Maria Notomi Sato	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	30/05/2017 19:04:07	Maria Notomi Sato	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	1projetoMetilsothiazolinone1.doc	30/05/2017 18:54:48	Maria Notomi Sato	Aceito
Brochura Pesquisa	1projetoMetilsothiazolinone.doc	30/05/2017 18:54:24	Maria Notomi Sato	Aceito
Outros	DeclaracaoBeneficios.pdf	22/05/2017 20:11:08	Maria Notomi Sato	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio.pdf	22/05/2017 20:09:55	Maria Notomi Sato	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_MCIMI_grupoestudo.docx	17/05/2017 08:06:49	Maria Notomi Sato	Aceito
Outros	TCLE_MCIMI_grupocontrole.docx	17/05/2017 08:05:45	Maria Notomi Sato	Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 2.162.138

Declaração de Instituição e Infraestrutura	Parque_de Equipamentos.pdf	10/05/2017 17:06:53	Maria Notomi Sato	Aceito
Orçamento	7OrcamentoHelianaPlataforma.doc	07/05/2017 18:36:27	Maria Notomi Sato	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 07 de Julho de 2017

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

ANEXO 4

03/09/2019

ScholarOne Manuscripts

Journal of the European Academy of Dermatology and
Venereology

[Home](#)[Author](#)[Review](#)

Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to

Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology

Manuscript ID

JEADV-2019-2079

Title

Proinflammatory and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis to Methylchloroisothiazolinone and Methylisothiazolinone

Authors

Freitas de Oliveira Góes, Heliana
Virgens, Anangelica
de Carvalho, Gabriel Costa
Pietrobon, Anna Julia
Calvielli Castelo Branco, Anna Cláudia
da Silva Oliveira, Luanda Mara
Vieira Pereira, Naiura
Sotto, Mirian
Silva dos Reis, Vitor Manoel
SATO, Maria Notomi

Date Submitted

02-Sep-2019

03/09/2019

ScholarOne Manuscripts

Author Dashboard

© Clarivate Analytics | © ScholarOne, Inc., 2019. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.
ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

@ScholarOneNews | System Requirements | Privacy Statement | Terms of Use

8. Referências bibliográficas

8. Referências bibliográficas:

1. Pestana C, Gomes R, Pinheiro V, Gouveia M, Antunes I, Gonçalo M. [Main Causes of Occupational Allergic Contact Dermatitis: A Three Year Study in the Center of Portugal]. *Acta Med Port.* 2016;29(7-8):449-55.
2. Peng W, Novak N. Pathogenesis of atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy.* 2015;45(3):566-74.
3. Mowad CM, Anderson B, Scheinman P, Pootongkam S, Nedorost S, Brod B. Allergic contact dermatitis: Patient diagnosis and evaluation. *J Am Acad Dermatol.* 2016;74(6):1029-40.
4. Warshaw EM, Hagen SL, Belsito DV, DeKoven JG, Maibach HI, Mathias CGT, et al. Occupational Contact Dermatitis in North American Print Machine Operators Referred for Patch Testing: Retrospective Analysis of Cross-Sectional Data From the North American Contact Dermatitis Group 1998 to 2014. *Dermatitis.* 2017;28(3):195-203.
5. Contestable JJ. Jet Fuel-Associated Occupational Contact Dermatitis. *Mil Med.* 2017;182(3):e1870-e3.
6. Kostner L, Anzengruber F, Guillod C, Recher M, Schmid-Grendelmeier P, Navarini AA. Allergic Contact Dermatitis. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2017;37(1):141-52.
7. Malajian D, Belsito DV. Cutaneous delayed-type hypersensitivity in patients with atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol.* 2013;69(2):232-7.
8. Shaughnessy CN, Malajian D, Belsito DV. Cutaneous delayed-type hypersensitivity in patients with atopic dermatitis: reactivity to surfactants. *J Am Acad Dermatol.* 2014;70(4):704-8.
9. Soltanipoor M, Kezic S, Sluiter JK, Rustemeyer T. The effectiveness of a skin care program for the prevention of contact dermatitis in health care workers (the Healthy Hands Project): study protocol for a cluster randomized controlled trial. *Trials.* 2017;18(1):92.
10. Schwensen JF, Friis UF, Menné T, Flyvholm MA, Johansen JD. Contact allergy to preservatives in patients with occupational contact dermatitis and exposure analysis of preservatives in registered chemical products for occupational use. *Int Arch Occup Environ Health.* 2017;90(4):319-33.
11. Brasch J, Becker D, Aberer W, Bircher A, Kränke B, Denzer-Fürst S, et al. Contact dermatitis. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2007;5(10):943-51.
12. Ale IS, Maibacht HA. Diagnostic approach in allergic and irritant contact dermatitis. *Expert Rev Clin Immunol.* 2010;6(2):291-310.
13. Veien NK. Systemic contact dermatitis. *Int J Dermatol.* 2011;50(12):1445-56.
14. Quah CH, Koh D, How CH, Quah JH. Approach to hand dermatitis in primary care. *Singapore Med J.* 2012;53(11):701-4; quiz p.5.
15. Zhu TH, Suresh R, Warshaw E, Scheinman P, Mowad C, Botto N, et al. The Medical Necessity of Comprehensive Patch Testing. *Dermatitis.* 2018;29(3):107-11.
16. Wong E, Kurian A. Off-Label Uses of Topical Calcineurin Inhibitors. *Skin Therapy Lett.* 2016;21(1):8-10.
17. Ruzicka T, Lynde CW, Jemec GB, Diepgen T, Berth-Jones J, Coenraads PJ, et al. Efficacy and safety of oral alitretinoin (9-cis retinoic acid) in patients with severe chronic hand eczema refractory to topical corticosteroids: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *Br J Dermatol.* 2008;158(4):808-17.
18. Brasch J, Becker D, Aberer W, Bircher A, Kränke B, Jung K, et al. Guideline contact dermatitis: S1-Guidelines of the German Contact Allergy Group (DKG) of the German Dermatology Society (DDG), the Information Network of Dermatological Clinics (IVDK), the German Society for Allergology and Clinical Immunology (DGAKI), the Working Group for Occupational and Environmental Dermatology (ABD) of the DDG, the Medical Association of German Allergologists (AeDA), the Professional Association of German Dermatologists (BVDD) and the DDG. *Allergo J Int.* 2014;23(4):126-38.

19. Navarini AA, French LE, Hofbauer GF. Interrupting IL-6-receptor signaling improves atopic dermatitis but associates with bacterial superinfection. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128(5):1128-30.
20. van der Schaft J, Thijs JL, de Bruin-Weller MS, Balak DMW. Dupilumab after the 2017 approval for the treatment of atopic dermatitis: what's new and what's next? *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2019;19(4):341-9.
21. Diepgen TL, Naldi L, Bruze M, Cazzaniga S, Schuttelaar ML, Elsner P, et al. Prevalence of Contact Allergy to p-Phenylenediamine in the European General Population. *J Invest Dermatol.* 2016;136(2):409-15.
22. Alchorne AeO, Alchorne MM, Silva MM. Occupational dermatosis. *An Bras Dermatol.* 2010;85(2):137-45; quiz 46-7.
23. Plombom GY, Oliveira MS, Tabushi FL, Kassem AJ, Purim KS, Nisihara RM. Epidemiological analysis of occupational dermatitis notified in Brazil in the period 2007 to 2012. *An Bras Dermatol.* 2016;91(6):732-6.
24. Raymond J, Konya J, Bakis-Petsoglou S. Lichenoid contact dermatitis secondary to methylisothiazolinone (MI). *JAAD Case Rep.* 2016;2(5):380-3.
25. Bunyavaree M, Kasemsarn P, Boonchai W. Cosmetic preservative labelling on the Thai market. *Contact Dermatitis.* 2016;74(4):217-21.
26. Herman A, Aerts O, de Montjoye L, Tromme I, Goossens A, Baeck M. Isothiazolinone derivatives and allergic contact dermatitis: a review and update. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2019;33(2):267-76.
27. Devos FC, Pollaris L, Van Den Broucke S, Seys S, Goossens A, Nemery B, et al. Methylisothiazolinone: dermal and respiratory immune responses in mice. *Toxicol Lett.* 2015;235(3):179-88.
28. Aerts O, Baeck M, Constandt L, Dezfoulan B, Jacobs MC, Kerre S, et al. The dramatic increase in the rate of methylisothiazolinone contact allergy in Belgium: a multicentre study. *Contact Dermatitis.* 2014;71(1):41-8.
29. de Groot AC, Liem DH, Weyland JW, Kathon CG: cosmetic allergy and patch test sensitization. *Contact Dermatitis.* 1985;12(2):76-80.
30. de Groot AC, Herxheimer A. Isothiazolinone preservative: cause of a continuing epidemic of cosmetic dermatitis. *Lancet.* 1989;1(8633):314-6.
31. Elder R. Final report on the safety assessment of methylisothiazolinone and methylchloroisothiazolinone. *JACT*1992.
32. Isaksson M, Gruvberger B, Bruze M. Occupational contact allergy and dermatitis from methylisothiazolinone after contact with wallcovering glue and after a chemical burn from a biocide. *Dermatitis.* 2004;15(4):201-5.
33. Gameiro A, Coutinho I, Ramos L, Gonçalo M. Methylisothiazolinone: second 'epidemic' of isothiazolinone sensitization. *Contact Dermatitis.* 2014;70(4):242-3.
34. Zaragoza-Ninet V, Blasco Encinas R, Vilata-Corell JJ, Pérez-Ferriols A, Sierra-Talamantes C, Esteve-Martínez A, et al. Allergic contact dermatitis due to cosmetics: A clinical and epidemiological study in a tertiary hospital. *Actas Dermosifiliogr.* 2016;107(4):329-36.
35. Giménez-Arnau AM, Deza G, Bauer A, Johnston GA, Mahler V, Schuttelaar ML, et al. Contact allergy to preservatives: ESSCA* results with the baseline series, 2009-2012. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2017;31(4):664-71.
36. Aerts O, Goossens A, Lambert J, Lepoittevin JP. Contact allergy caused by isothiazolinone derivatives: an overview of non-cosmetic and unusual cosmetic sources. *Eur J Dermatol.* 2017;27(2):115-22.
37. Urwin R, Wilkinson M. Methylchloroisothiazolinone and methylisothiazolinone contact allergy: a new 'epidemic'. *Contact Dermatitis.* 2013;68(4):253-5.
38. Lundov MD, Thyssen JP, Zachariae C, Johansen JD. Prevalence and cause of methylisothiazolinone contact allergy. *Contact Dermatitis.* 2010;63(3):164-7.

39. Ackermann L, Aalto-Korte K, Alanko K, Hasan T, Jolanki R, Lammintausta K, et al. Contact sensitization to methylisothiazolinone in Finland--a multicentre study. *Contact Dermatitis*. 2011;64(1):49-53.
40. Geier J, Lessmann H, Schnuch A, Uter W. Recent increase in allergic reactions to methylchloroisothiazolinone/methylisothiazolinone: is methylisothiazolinone the culprit? *Contact Dermatitis*. 2012;67(6):334-41.
41. Isaksson M, Bruze M, Gruvberger B. Cross-reactivity between methylchloroisothiazolinone/methylisothiazolinone, methylisothiazolinone, and other isothiazolinones in workers at a plant producing binders for paints and glues. *Contact Dermatitis*. 2008;58(1):60-2.
42. Bruze M, Dahlquist I, Fregert S, Gruvberger B, Persson K. Contact allergy to the active ingredients of Kathon CG. *Contact Dermatitis*. 1987;16(4):183-8.
43. Wilkinson JD, Shaw S, Andersen KE, Brandao FM, Bruynzeel DP, Bruze M, et al. Monitoring levels of preservative sensitivity in Europe. A 10-year overview (1991-2000). *Contact Dermatitis*. 2002;46(4):207-10.
44. Tudela E, MacPherson C, Maibach HI. Long-term trend in patch test reactions: a 32-year statistical overview (1970-2002), part II. *Cutan Ocul Toxicol*. 2008;27(3):187-202.
45. Thyssen JP, Engkilde K, Lundov MD, Carlsen BC, Menné T, Johansen JD. Temporal trends of preservative allergy in Denmark (1985-2008). *Contact Dermatitis*. 2010;62(2):102-8.
46. Van Steenkiste E, Goossens A, Meert H, Apers S, Aerts O. Airborne-induced lymphomatoid contact dermatitis caused by methylisothiazolinone. *Contact Dermatitis*. 2015;72(4):237-40.
47. Uter W, Geier J, Bauer A, Schnuch A. Risk factors associated with methylisothiazolinone contact sensitization. *Contact Dermatitis*. 2013;69(4):231-8.
48. Castanedo-Tardana MP, Zug KA. Methylisothiazolinone. *Dermatitis*. 2013;24(1):2-6.
49. Schwensen JF, Uter W, Bruze M, Svedman C, Goossens A, Wilkinson M, et al. The epidemic of methylisothiazolinone: a European prospective study. *Contact Dermatitis*. 2017;76(5):272-9.
50. Isaksson M, Ale I, Andersen KE, Elsner P, Goh CL, Goossens A, et al. Multicenter Patch Testing With Methylisothiazolinone and Methylchloroisothiazolinone/Methylisothiazolinone Within the International Contact Dermatitis Research Group. *Dermatitis*. 2017;28(3):210-4.
51. Goldenberg A, Lipp M, Jacob SE. Appropriate Testing of Isothiazolinones in Children. *Pediatr Dermatol*. 2017;34(2):138-43.
52. Uter W, Schnuch A, Wilkinson M, Dugonik A, Dugonik B, Ganslandt T. Registries in Clinical Epidemiology: the European Surveillance System on Contact Allergies (ESSCA). *Methods Inf Med*. 2016;55(2):193-9.
53. Regulation C. (EU) No 1003/2014 of 18 September 2014 amending Annex V to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products (Text with EEA relevance). .
54. Zug KA, Warshaw EM, Fowler JF, Maibach HI, Belsito DL, Pratt MD, et al. Patch-test results of the North American Contact Dermatitis Group 2005-2006. *Dermatitis*. 2009;20(3):149-60.
55. Burnett CL, Bergfeld WF, Belsito DV, Klaassen CD, Marks JG, Shank RC, et al. Final report of the safety assessment of methylisothiazolinone. *Int J Toxicol*. 2010;29(4 Suppl):187S-213S.
56. Duarte IA, Tanaka GM, Suzuki NM, Lazzarini R, Lopes AS, Volpini BM, et al. Patch test standard series recommended by the Brazilian Contact Dermatitis Study Group during the 2006-2011 period. *An Bras Dermatol*. 2013;88(6):1015-8.

57. Scherrer MA, Rocha VB. Increasing trend of sensitization to Methylchloroisothiazolinone/methylisothiazolinone (MCI/MI). *An Bras Dermatol*. 2014;89(3):527-8.
58. Wilford JE, de Gannes GC. Methylisothiazolinone Contact Allergy Prevalence in Western Canada: Increased Detection With 2000 ppm Patch Test Allergen. *J Cutan Med Surg*. 2017;21(3):207-10.
59. Salman A, Demir G, Apti O. "Slime": A trending cause of isothiazolinone contact allergy in children. *Contact Dermatitis*. 2019;80(6):409-11.
60. Zhang AJ, Boyd AH, Asch S, Warshaw EM. Allergic contact dermatitis to slime: The epidemic of isothiazolinone allergy encompasses school glue. *Pediatr Dermatol*. 2019;36(1):e37-e8.
61. Pónyai G, Németh I, Temesvári E. Methylchloroisothiazolinone/Methylisothiazolinone and Methylisothiazolinone Sensitivity in Hungary. *Dermatol Res Pract*. 2016;2016:4579071.
62. Schwensen JF, Lundov MD, Bossi R, Banerjee P, Giménez-Arnau E, Lepoittevin JP, et al. Methylisothiazolinone and benzisothiazolinone are widely used in paint: a multicentre study of paints from five European countries. *Contact Dermatitis*. 2015;72(3):127-38.
63. Goossens A. Contact-allergic reactions to cosmetics. *J Allergy (Cairo)*. 2011;2011:467071.
64. Martins LE, Reis VM. Immunopathology of allergic contact dermatitis. *An Bras Dermatol*. 2011;86(3):419-33.
65. GELL PG, BENACERRAF B. Studies on hypersensitivity. IV. The relationship between contact and delayed sensitivity: a study of the specificity of cellular immune reactions. *J Exp Med*. 1961;113:571-85.
66. Descotes J, Choquet-Kastylevsky G. Gell and Coombs's classification: is it still valid? *Toxicology*. 2001;158(1-2):43-9.
67. Bos JD, Meinardi MM. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp Dermatol*. 2000;9(3):165-9.
68. Lepoittevin JP, Karlberg AT. Interactions of allergenic hydroperoxides with proteins: a radical mechanism? *Chem Res Toxicol*. 1994;7(2):130-3.
69. Landsteiner K, Jacobs J. STUDIES ON THE SENSITIZATION OF ANIMALS WITH SIMPLE CHEMICAL COMPOUNDS : III. ANAPHYLAXIS INDUCED BY ARSPHENAMINE. *J Exp Med*. 1936;64(5):717-21.
70. Lepoittevin JP. Metabolism versus chemical transformation or pro- versus prehapten? *Contact Dermatitis*. 2006;54(2):73-4.
71. Kissenpfennig A, Henri S, Dubois B, Laplace-Builhé C, Perrin P, Romani N, et al. Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity*. 2005;22(5):643-54.
72. Haniffa M, Gunawan M, Jardine L. Human skin dendritic cells in health and disease. *J Dermatol Sci*. 2015;77(2):85-92.
73. Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(3):151-61.
74. Hoeffel G, Wang Y, Greter M, See P, Teo P, Malleret B, et al. Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J Exp Med*. 2012;209(6):1167-81.
75. Wang XN, McGovern N, Gunawan M, Richardson C, Windebank M, Siah TW, et al. A three-dimensional atlas of human dermal leukocytes, lymphatics, and blood vessels. *J Invest Dermatol*. 2014;134(4):965-74.
76. Nestle FO, Zheng XG, Thompson CB, Turka LA, Nickoloff BJ. Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets. *J Immunol*. 1993;151(11):6535-45.

77. Haniffa M, Shin A, Bigley V, McGovern N, Teo P, See P, et al. Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells. *Immunity*. 2012;37(1):60-73.
78. Enk AH, Angeloni VL, Udey MC, Katz SI. An essential role for Langerhans cell-derived IL-1 beta in the initiation of primary immune responses in skin. *J Immunol*. 1993;150(9):3698-704.
79. Honda T, Kabashima K. Novel concept of iSALT (inducible skin-associated lymphoid tissue) in the elicitation of allergic contact dermatitis. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2016;92(1):20-8.
80. Dittmar D, Schuttelaar ML. Immunology and genetics of tumour necrosis factor in allergic contact dermatitis. *Contact Dermatitis*. 2017;76(5):257-71.
81. Honda T, Egawa G, Grabbe S, Kabashima K. Update of immune events in the murine contact hypersensitivity model: toward the understanding of allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2013;133(2):303-15.
82. Vukmanović S, Sadrieh N. Skin sensitizers in cosmetics and beyond: potential multiple mechanisms of action and importance of T-cell assays for in vitro screening. *Crit Rev Toxicol*. 2017;47(5):415-32.
83. Vocanson M, Hennino A, Cluzel-Tailhardat M, Saint-Mezard P, Benetiere J, Chavagnac C, et al. CD8+ T cells are effector cells of contact dermatitis to common skin allergens in mice. *J Invest Dermatol*. 2006;126(4):815-20.
84. He D, Wu L, Kim HK, Li H, Elmets CA, Xu H. IL-17 and IFN-gamma mediate the elicitation of contact hypersensitivity responses by different mechanisms and both are required for optimal responses. *J Immunol*. 2009;183(2):1463-70.
85. Wang L, Bursch LS, Kissenpfennig A, Malissen B, Jameson SC, Hogquist KA. Langerin expressing cells promote skin immune responses under defined conditions. *J Immunol*. 2008;180(7):4722-7.
86. Braun A, Dewert N, Brunnert F, Schnabel V, Hardenberg JH, Richter B, et al. Integrin α E(CD103) Is Involved in Regulatory T-Cell Function in Allergic Contact Hypersensitivity. *J Invest Dermatol*. 2015;135(12):2982-91.
87. Edelson BT, KC W, Juang R, Kohyama M, Benoit LA, Klekotka PA, et al. Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8alpha+ conventional dendritic cells. *J Exp Med*. 2010;207(4):823-36.
88. Bald T, Quast T, Landsberg J, Rogava M, Glodde N, Lopez-Ramos D, et al. Ultraviolet-radiation-induced inflammation promotes angiogenesis and metastasis in melanoma. *Nature*. 2014;507(7490):109-13.
89. Vajjhala PR, Ve T, Benthall A, Stacey KJ, Kobe B. The molecular mechanisms of signaling by cooperative assembly formation in innate immunity pathways. *Mol Immunol*. 2017;86:23-37.
90. Wang Y, Ning X, Gao P, Wu S, Sha M, Lv M, et al. Inflammasome Activation Triggers Caspase-1-Mediated Cleavage of cGAS to Regulate Responses to DNA Virus Infection. *Immunity*. 2017;46(3):393-404.
91. Schmidt M, Goebeler M, Martin SF. Methods to Investigate the Role of Toll-Like Receptors in Allergic Contact Dermatitis. *Methods Mol Biol*. 2016;1390:319-40.
92. Koppes SA, Ljubojević Hadžavdić S, Jakasa I, Franceschi N, Riethmüller C, Jurakić Tončić R, et al. Effect of allergens and irritants on levels of natural moisturizing factor and corneocyte morphology. *Contact Dermatitis*. 2017;76(5):287-95.
93. Scheman A, Hipolito R, Severson D, Youkhanis N. Contact Allergy Cross-reactions: Retrospective Clinical Data and Review of the Literature. *Dermatitis*. 2017;28(2):128-40.
94. Nikitovic D, Berdiaki A, Galbiati V, Kavasi RM, Papale A, Tsatsakis A, et al. Hyaluronan regulates chemical allergen-induced IL-18 production in human keratinocytes. *Toxicol Lett*. 2015;232(1):89-97.
95. Raghavan B, Martin SF, Esser PR, Goebeler M, Schmidt M. Metal allergens nickel and cobalt facilitate TLR4 homodimerization independently of MD2. *EMBO Rep*. 2012;13(12):1109-15.

96. Oakes T, Popple AL, Williams J, Best K, Heather JM, Ismail M, et al. The T Cell Response to the Contact Sensitizer Paraphenylenediamine Is Characterized by a Polyclonal Diverse Repertoire of Antigen-Specific Receptors. *Front Immunol.* 2017;8:162.
97. Corsini E, Galbiati V, Mitjans M, Galli CL, Marinovich M. NCTC 2544 and IL-18 production: a tool for the identification of contact allergens. *Toxicol In Vitro.* 2013;27(3):1127-34.
98. Ratner D, Orning MP, Lien E. Bacterial secretion systems and regulation of inflammasome activation. *J Leukoc Biol.* 2017;101(1):165-81.
99. Vennegaard MT, Dyring-Andersen B, Skov L, Nielsen MM, Schmidt JD, Bzorek M, et al. Epicutaneous exposure to nickel induces nickel allergy in mice via a MyD88-dependent and interleukin-1-dependent pathway. *Contact Dermatitis.* 2014;71(4):224-32.
100. Kaplan DH, Igyártó BZ, Gaspari AA. Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(2):114-24.
101. Muto J, Morioka Y, Yamasaki K, Kim M, Garcia A, Carlin AF, et al. Hyaluronan digestion controls DC migration from the skin. *J Clin Invest.* 2014;124(3):1309-19.
102. Hacini-Rachinel F, Gomez de Agüero M, Kanjarawi R, Moro-Sibilot L, Le Luduec JB, Macari C, et al. Intestinal dendritic cell licensing through Toll-like receptor 4 is required for oral tolerance in allergic contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141(1):163-70.
103. Li X, Zhong F. Nickel induces interleukin-1 β secretion via the NLRP3-ASC-caspase-1 pathway. *Inflammation.* 2014;37(2):457-66.
104. Schmidt M, Raghavan B, Müller V, Vogl T, Fejer G, Tchaptchet S, et al. Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. *Nat Immunol.* 2010;11(9):814-9.
105. Vaure C, Liu Y. A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Front Immunol.* 2014;5:316.
106. Yamaguchi H, Kabashima-Kubo R, Bito T, Sakabe J, Shimauchi T, Ito T, et al. High frequencies of positive nickel/cobalt patch tests and high sweat nickel concentration in patients with intrinsic atopic dermatitis. *J Dermatol Sci.* 2013;72(3):240-5.
107. Rachmawati D, Bontkes HJ, Verstege MI, Muris J, von Blomberg BM, Scheper RJ, et al. Transition metal sensing by Toll-like receptor-4: next to nickel, cobalt and palladium are potent human dendritic cell stimulators. *Contact Dermatitis.* 2013;68(6):331-8.
108. Buters J, Biedermann T. Chromium(VI) Contact Dermatitis: Getting Closer to Understanding the Underlying Mechanisms of Toxicity and Sensitization! *J Invest Dermatol.* 2017;137(2):274-7.
109. Park EJ, Kim S, Chang J. Methylisothiazolinone may induce cell death and inflammatory response through DNA damage in human liver epithelium cells. *Environ Toxicol.* 2018;33(2):156-66.
110. Popple A, Williams J, Maxwell G, Gellatly N, Dearman RJ, Kimber I. T lymphocyte dynamics in methylisothiazolinone-allergic patients. *Contact Dermatitis.* 2016;75(1):1-13.
111. Masjedi K, Ahlborg N, Gruvberger B, Bruze M, Karlberg AT. Methylisothiazolinones elicit increased production of both T helper (Th)1- and Th2-like cytokines by peripheral blood mononuclear cells from contact allergic individuals. *Br J Dermatol.* 2003;149(6):1172-82.
112. Marusić-Galesić S, Longo DL, Kruisbeek AM. Preferential differentiation of T cell receptor specificities based on the MHC glycoproteins encountered during development. Evidence for positive selection. *J Exp Med.* 1989;169(5):1619-30.
113. Schwartz RH. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science.* 1990;248(4961):1349-56.
114. Kaiko GE, Horvat JC, Beagley KW, Hansbro PM. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology.* 2008;123(3):326-38.

115. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(4):227-42.
116. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol*. 2011;12(6):492-9.
117. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol*. 2010;28:445-89.
118. Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:821-52.
119. Uronen-Hansson H, Allen J, Osman M, Squires G, Klein N, Callard RE. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 are present inside human dendritic cells, associated with microtubules and the Golgi apparatus but are not detectable on the cell surface: integrity of microtubules is required for interleukin-12 production in response to internalized bacteria. *Immunology*. 2004;111(2):173-8.
120. Balmert SC, Donahue C, Vu JR, Erdos G, Falo LD, Little SR. In vivo induction of regulatory T cells promotes allergen tolerance and suppresses allergic contact dermatitis. *J Control Release*. 2017;261:223-33.
121. Cavani A. Immune regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis and contact sensitization. *Chem Immunol Allergy*. 2008;94:93-100.
122. Mahnke K, Qian Y, Knop J, Enk AH. Induction of CD4⁺/CD25⁺ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells. *Blood*. 2003;101(12):4862-9.
123. Angkasekwinai P. Th9 Cells in Allergic Disease. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2019;19(5):29.
124. Roncarolo MG, Gregori S, Bacchetta R, Battaglia M. Tr1 cells and the counter-regulation of immunity: natural mechanisms and therapeutic applications. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2014;380:39-68.
125. Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmby H, Westendorf A, Buer J, et al. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol*. 2008;9(12):1341-6.
126. Jabeen R, Kaplan MH. The symphony of the ninth: the development and function of Th9 cells. *Curr Opin Immunol*. 2012;24(3):303-7.
127. Mittrücker HW, Visekruna A, Huber M. Heterogeneity in the differentiation and function of CD8⁺ T cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2014;62(6):449-58.
128. Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(4):251-62.
129. Westermann J, Ehlers EM, Exton MS, Kaiser M, Bode U. Migration of naive, effector and memory T cells: implications for the regulation of immune responses. *Immunol Rev*. 2001;184:20-37.
130. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:745-63.
131. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999;401(6754):708-12.
132. Watanabe H, Gaide O, Pétrilli V, Martinon F, Contassot E, Roques S, et al. Activation of the IL-1 β -processing inflammasome is involved in contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol*. 2007;127(8):1956-63.
133. Goebeler M, Trautmann A, Voss A, Bröcker EV, Toksoy A, Gillitzer R. Differential and sequential expression of multiple chemokines during elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Am J Pathol*. 2001;158(2):431-40.
134. Natsuaki Y, Egawa G, Nakamizo S, Ono S, Hanakawa S, Okada T, et al. Perivascular leukocyte clusters are essential for efficient activation of effector T cells in the skin. *Nat Immunol*. 2014;15(11):1064-9.
135. Delamarre L, Holcombe H, Mellman I. Presentation of exogenous antigens on major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II molecules is differentially regulated during dendritic cell maturation. *J Exp Med*. 2003;198(1):111-22.

136. Schwarz T. 25 years of UV-induced immunosuppression mediated by T cells-from disregarded T suppressor cells to highly respected regulatory T cells. *Photochem Photobiol.* 2008;84(1):10-8.
137. Dubois B, Goubier A, Joubert G, Kaiserlian D. Oral tolerance and regulation of mucosal immunity. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62(12):1322-32.
138. Tang A, Udey MC. Doses of ultraviolet radiation that modulate accessory cell activity and ICAM-1 expression are ultimately cytotoxic for murine epidermal Langerhans cells. *J Invest Dermatol.* 1992;99(5):71S-3S.
139. Schwarz A, Grabbe S, Riemann H, Aragane Y, Simon M, Manon S, et al. In vivo effects of interleukin-10 on contact hypersensitivity and delayed-type hypersensitivity reactions. *J Invest Dermatol.* 1994;103(2):211-6.
140. Schwarz A, Beissert S, Grosse-Heitmeyer K, Gunzer M, Bluestone JA, Grabbe S, et al. Evidence for functional relevance of CTLA-4 in ultraviolet-radiation-induced tolerance. *J Immunol.* 2000;165(4):1824-31.
141. Schwarz A, Maeda A, Schwarz T. Alteration of the migratory behavior of UV-induced regulatory T cells by tissue-specific dendritic cells. *J Immunol.* 2007;178(2):877-86.
142. Hirahara K, Liu L, Clark RA, Yamanaka K, Fuhlbrigge RC, Kupper TS. The majority of human peripheral blood CD4+CD25highFoxp3+ regulatory T cells bear functional skin-homing receptors. *J Immunol.* 2006;177(7):4488-94.
143. Alard P, Kurimoto I, Niizeki H, Doherty JM, Streilein JW. Hapten-specific tolerance induced by acute, low-dose ultraviolet B radiation of skin requires mast cell degranulation. *Eur J Immunol.* 2001;31(6):1736-46.
144. Ghoreishi M, Dutz JP. Tolerance induction by transcutaneous immunization through ultraviolet-irradiated skin is transferable through CD4+CD25+ T regulatory cells and is dependent on host-derived IL-10. *J Immunol.* 2006;176(4):2635-44.
145. Zhang H, Kong H, Zeng X, Guo L, Sun X, He S. Subsets of regulatory T cells and their roles in allergy. *J Transl Med.* 2014;12:125.
146. Le Bras S, Geha RS. IPEX and the role of Foxp3 in the development and function of human Tregs. *J Clin Invest.* 2006;116(6):1473-5.
147. Cavani A, Nasorri F, Prezzi C, Sebastiani S, Albanesi C, Girolomoni G. Human CD4+ T lymphocytes with remarkable regulatory functions on dendritic cells and nickel-specific Th1 immune responses. *J Invest Dermatol.* 2000;114(2):295-302.
148. Cavani A, Nasorri F, Ottaviani C, Sebastiani S, De Pità O, Girolomoni G. Human CD25+ regulatory T cells maintain immune tolerance to nickel in healthy, nonallergic individuals. *J Immunol.* 2003;171(11):5760-8.
149. O'Garra A, Vieira P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(6):425-8.
150. Lazzarini R, Duarte I, Ferreira AL. Patch tests. *An Bras Dermatol.* 2013;88(6):879-88.
151. Wilkinson DS, Fregert S, Magnusson B, Bandmann HJ, Calnan CD, Cronin E, et al. Terminology of contact dermatitis. *Acta Derm Venereol.* 1970;50(4):287-92.
152. Hanifin JM, Rajka G. Diagnostic Features of Atopic Dermatitis. *Acta Derm Venereol.* 1980;60(92):44-7.
153. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
154. Dickinson SE, Wondrak GT. TLR4 in skin cancer: From molecular mechanisms to clinical interventions. *Mol Carcinog.* 2019;58(7):1086-93.
155. Iotzova-Weiss G, Freiburger SN, Johansen P, Kamarachev J, Guenova E, Dziunycz PJ, et al. TLR4 as a negative regulator of keratinocyte proliferation. *PLoS One.* 2017;12(10):e0185668.
156. Panzer R, Blobel C, Fölster-Holst R, Proksch E. TLR2 and TLR4 expression in atopic dermatitis, contact dermatitis and psoriasis. *Exp Dermatol.* 2014;23(5):364-6.

157. Koppes SA, Ljubojevic Hadzavdic S, Jakasa I, Franceschi N, Jurakić Tončić R, Marinović B, et al. Stratum corneum profiles of inflammatory mediators in patch test reactions to common contact allergens and sodium lauryl sulfate. *Br J Dermatol*. 2017;176(6):1533-40.
158. Pichowski JS, Cumberbatch M, Dearman RJ, Basketter DA, Kimber I. Allergen-induced changes in interleukin 1 beta (IL-1 beta) mRNA expression by human blood-derived dendritic cells: inter-individual differences and relevance for sensitization testing. *J Appl Toxicol*. 2001;21(2):115-21.
159. Enk AH. Allergic contact dermatitis: understanding the immune response and potential for targeted therapy using cytokines. *Mol Med Today*. 1997;3(10):423-8.
160. Henri S, Vremec D, Kamath A, Waithman J, Williams S, Benoist C, et al. The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. *J Immunol*. 2001;167(2):741-8.
161. Viazovaia EA, Gileva IP, Toporkova LB, Shchelkunov SN, Orlovskaya IA. Anti-inflammatory Effects of Variola Virus TNF Decoy Receptor in an Experimental Model of Contact Dermatitis. *Curr Pharm Biotechnol*. 2018;19(11):910-6.
162. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*. 2008;13:453-61.
163. Ayaub EA, Dubey A, Imani J, Botelho F, Kolb MRJ, Richards CD, et al. Overexpression of OSM and IL-6 impacts the polarization of pro-fibrotic macrophages and the development of bleomycin-induced lung fibrosis. *Sci Rep*. 2017;7(1):13281.
164. Wang LX, Zhang SX, Wu HJ, Rong XL, Guo J. M2b macrophage polarization and its roles in diseases. *J Leukoc Biol*. 2019;106(2):345-58.
165. Lee EG, Mickle-Kawar BM, Gallucci RM. IL-6 deficiency exacerbates skin inflammation in a murine model of irritant dermatitis. *J Immunotoxicol*. 2013;10(2):192-200.
166. Enk CD, Sredni D, Blauvelt A, Katz SI. Induction of IL-10 gene expression in human keratinocytes by UVB exposure in vivo and in vitro. *J Immunol*. 1995;154(9):4851-6.
167. Hirai T, Zenke Y, Yang Y, Bartholin L, Beura LK, Masopust D, et al. Keratinocyte-Mediated Activation of the Cytokine TGF- β Maintains Skin Recirculating Memory CD8. *Immunity*. 2019;50(5):1249-61.e5.