Tiago de Oliveira Titz

**Avaliação fenotípica e funcional dos eosinófilos da dermatite atópica
do adulto**

São Paulo

2014

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Departamento de Dermatologia
Programa de Pós Graduação em Ciências: Dermatologia

Tiago de Oliveira Titz

**Avaliação fenotípica e funcional dos eosinófilos da dermatite atópica
do adulto**

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

Programa de Dermatologia

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Valéria Aoki

São Paulo

2014

Tiago de Oliveira Titz

Avaliação fenotípica e funcional dos eosinófilos da Dermatite Atópica do adulto

Aprovada em:

Banca Examinadora:

Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

São Paulo

2014

AGRADECIMENTOS

Embora o foco deste trabalho seja dado aos autores, diversas pessoas e entidades contribuíram profundamente para o seu desenvolvimento. Meus sinceros agradecimentos:

- A Prof^ª. Dr^ª. Valéria Aoki pela orientação e pelos ensinamentos durante o desenvolvimento desse trabalho;
- A Prof^ª. Dr^ª. Maria Notomi Sato pela orientação, amizade e todos os ensinamentos durante o desenvolvimento desse trabalho;
- Ao grupo Dermatite atópica, Dr^ª. Raquel Leão Orfali pela ajuda e amizade e Vanessa Gonçalves dos Santos;
- Aos meus pais Silvia Maria de Oliveira Titz e José Renato Fernandes Titz, por serem o alicerce para a minha vida;
- À minha avó Silda Fernandes Titz e ao meu avô Luiz José de Oliveira pelo constante aprendizado;
- À minha namorada Vanessa Domingues pela sempre presente ajuda e paciência;
- Aos amigos e amigas da experimental do LIM-56: Gabriel (sácolé), Nilson (Mussarella/incomp), Jeff (Palmito), Luanda, Camila, Rosana, Luana, Kelly, Marília e Anna;
- Ao Prof^º Dr^º. Alberto José da Silva Duarte, pela infraestrutura do LIM-56;
- Aos funcionários da secretaria do LIM-56; E aos funcionários técnicos do LIM-56: Noêmia, Patrícia e Rosângela (setor citometria);
- À Faculdade de Medicina da USP em especial ao Departamento de Dermatologia;
- Aos pacientes que gentilmente aceitaram participar desse estudo;
- À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) por financiar minha bolsa de estudo;
- A FAPESP e FUNADERSP, por fomentar esse projeto científico.

EPÍGRAFE

“O mais competente não discute,
domina a sua ciência e cala-se.”

François Marie Arouet - Voltaire

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de quadros

Lista de anexos

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Dermatite atópica	16
1.2 Resposta imune na dermatite atópica	17
1.2.1 Barreira cutânea, imunidade inata e dermatite atópica	17
1.2.2 Imunidade adaptativa	17
1.3 Os Eosinófilos	19
1.4 Metaloproteinases e a dermatite atópica	22
1.5 Papel do <i>Staphylococcus aureus</i> na dermatite atópica	23
1.6 Os Receptores <i>Toll Like</i> (TLRs)	24
2. OBJETIVOS	26
2.1 Geral.....	26
2.2 Específicos	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Casuística	27
3.2 Obtenção dos soros	27
3.3 Dosagem sérica de IgE	27
3.4 Obtenção e marcação de eosinófilos do sangue periférico	28
3.5 Obtenção e purificação dos eosinófilos do sangue periférico.....	28
3.6 Cultura de eosinófilos e obtenção de sobrenadantes.....	29
3.7 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para dosagem de MMPs e TIMPs	29
3.8 CBA (Cytometric Bead Array)	30
3.9 Análise Estatística.....	30
4. RESULTADOS	31
4.1 Aumento da IgE sérica e da frequência de eosinófilos em indivíduos com Dermatite atópica.	31

4.2 Diminuição da expressão de CD23 e CD62L em eosinófilos de indivíduos com dermatite atópica.	33
4.3 Correlação entre CD62L (L-selectina) e moléculas de ativação CD23 e CD69... ..	34
4.4 Avaliação sérica de metaloproteinases e de inibidores teciduais de metaloproteinases de indivíduos controles e com dermatite atópica.	35
4.5 Alteração de inibidores teciduais e RANTES em eosinófilos de indivíduos com Dermatite atópica.	37
5. DISCUSSÃO	39
6. CONCLUSÕES.....	44
7. ANEXOS	45
7.1 Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq).	45
7.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	46
7.3 Tabelas Demográficas.....	49
7.4 Índice de gravidade e área de eczema (EASI)	51
7.5 Critérios diagnósticos da dermatite atópica (Hanifin & Rajka).....	52
8. REFERÊNCIAS	53

LISTA DE ABREVIATURAS

APC: *Allophycocyanin*

APCs: Células apresentadoras de antígenos

BC: Barreira cutânea

BSA: *Bovine serum albumin*

CAPPesq: Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

CBA: *Cytometric Bead Array*

CCR3: *C-C chemokine receptor type 3*

CD: *Cluster differentiation*

Células NK: Célula *natural killer*

CLA: Antígeno linfocitário cutâneo

DA: Dermatite atópica

DCs: Células dendríticas

DNA: *Deoxyribonucleic acid*

dsRNA: RNA dupla fita

EC: Estrato córneo

ECM: Matriz extracelular

ECP: Proteína catiônica do eosinófilo

EDN: Neurotoxina derivada de eosinófilo

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*

EPO: Peroxidase do eosinófilo

EROs: Espécies reativas de oxigênio

FACS: *Fluorescence-activated cell sorting*

FDCs: Células dendríticas foliculares

FITC: *Fluorescein Isothiocyanate*

FSC: *Foward scatter*

FSL-1: *Synthetic diacylated lipoprotein*

FMO: *Fluorescence Minus One*

GATA-3: *GATA-binding protein-3*

HBD-2: β defensina 2

HBD-3: β defensina 3

IDECs: Células dendríticas inflamatórias epidérmicas

IFN- γ : Interferon gama

IgE: Imunoglobulina da classe E

IL: Interleucina

IRF: *Interferon regulatory factor*

ITIMs: *Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*

LIN 1: *lineage cocktail 1*

LL-37: peptídeo antimicrobiano LL-37

MAL: *MyD88 adaptor-like*

MBP: Proteína básica principal

MCP2: *Monocyte Chemotactic Protein 2*

MCP3: *Monocyte Chemotactic Protein 3*

MCP5: *Monocyte Chemotactic Protein 5*

mDCs: Células dendríticas mielóides

MHC: Complexo principal de histocompatibilidade

MMPs: Metaloproteinases

mRNA: RNA mensageiro

MyD88: *Myeloid differentiation primary response gene 88*

NF- κ B: Fator nuclear kappa B

PAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos

PB: Penfigóide bolhoso

PBS: Tampão fosfato-salino

PE: *Phycoerythrin*

PerCP: *Peridinin chlorophyll protein*

pH: Potencial hidrogeniônico

PMNs: Células polimorfonucleares

PRRs: Receptores de reconhecimento de padrão

RNA: *Ribonucleic acid*

ROR γ t: *Retinoid-related orphan receptor gamma t*

RPM: Rotações por minuto

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

SARM: *Sterile a and HEAT armadillo motif-containing protein*

sCD23: CD23 solúvel

SEA: Enterotoxina de *S. aureus* A

SEB: Enterotoxina de *S. aureus* B

Siglec-8: *Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 8*

Siglec-F: *Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin F*

SSC: *Side scatter*

ssRNA: RNA simples fita

T.A: Temperatura ambiente

T-bet: *T box expressed in T cells*

TEWL: *transepidermal water loss*

TGF- β : Fator de crescimento transformante beta

TGI: Trato gastrointestinal

Th1: *T helper 1*

Th2: *T helper 2*

TIMPs: Inibidores teciduais de metaloproteinases

TLRs: *Toll-like receptors*

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

TRAM: *TRIF related adaptor molecule*

TRIF: *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*

TSST-1: Toxina da síndrome do choque tóxico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração esquemática da fase aguda e progressão para fase crônica da dermatite atópica.....	18
Figura 2 - Ilustração esquemática de um eosinófilo.....	20
Figura 3 - Estratégia de <i>gating</i> para seleção de eosinófilos a partir de células polimorfonucleares em sangue periférico de indivíduos controles e com dermatite atópica.....	31
Figura 4 - Quantificação de eosinófilos e IgE sérica em indivíduos com dermatite atópica.....	32
Figura 5 - Estratégia de <i>gating</i> , a partir de um paciente, para avaliação dos marcadores de ativação na população de eosinófilos (LIN 1 ⁻ CCR3 ⁺) em sangue periférico de controles e pacientes com dermatite atópica.....	33
Figura 6 - Perfil de ativação de eosinófilos de indivíduos controles e com dermatite atópica.....	34
Figura 7 - Correlação entre CD62L e moléculas de ativação (CD69 e CD23).....	35
Figura 8 - Avaliação sérica e correlação entre metaloproteinases e inibidores teciduais de metaloproteinases.....	36
Figura 9 - Avaliação de metaloproteinases, inibidores teciduais de metaloproteinases e RANTES.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados demográficos dos indivíduos com dermatite atópica.....49

Tabela 2 - Dados demográficos dos indivíduos controles.....50

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Painel para marcação <i>ex-vivo</i> de eosinófilos do sangue periférico.....	28
--	----

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 - Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa.....	45
Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	46
Anexo 3 - Tabelas demográficas.....	49
Anexo 4 - Índice de gravidade e área de eczema (EASI).....	51
Anexo 5 - Critérios diagnósticos da dermatite atópica (Hanifin & Rajka).....	52

RESUMO

TITZ TO. *Avaliação fenotípica e funcional dos eosinófilos da dermatite atópica do adulto* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Introdução: A dermatite atópica (DA) é uma doença cutânea inflamatória de caráter crônico, recidivante, em que o prurido intenso e a xerose cutânea são frequentes. A etiopatogenia da DA é multifatorial, envolvendo fatores genéticos, ambientais e imunológicos. Eosinófilos são leucócitos polimorfonucleares multifuncionais que estão implicados na patogênese de diversos processos inflamatórios, incluindo a DA. Além da produção e secreção de diversas proteínas presentes nos grânulos citoplasmáticos, os eosinófilos também apresentam potencial para secretar metaloproteinases, enzimas proteolíticas que degradam vários componentes da matriz extracelular, e estão presentes em diversos processos fisiológicos e patológicos. **Objetivo:** Avaliar: 1) o perfil fenotípico dos eosinófilos na dermatite atópica do adulto, através da expressão das moléculas CCR3, CD23, CD38, CD69 e CD62L; 2) o perfil funcional, a partir da secreção de metaloproteinases, inibidores teciduais de metaloproteinases e RANTES por eosinófilos purificados. **Métodos:** Foram incluídos 41 adultos diagnosticados com DA, de acordo com os critérios de Hanifin & Rajka e 45 controles adultos saudáveis. A gravidade da doença foi mensurada através do escore de gravidade EASI (*Eczema Area and Severity Index*). Eosinófilos (LIN¹ CCR3⁺) do sangue periférico foram analisados para os marcadores CCR3, CD38, CD69, CD23 e CD62L através da citometria de fluxo (LSRFortessa, BD Biosciences) a análise foi realizada com o *FlowJo 7.5.6 software*. Eosinófilos purificados de indivíduos com DA e indivíduos controles foram estimulados com enterotoxina de *Staphylococcus aureus* B (SEB) e FSL-1 (agonista de receptores *Toll-like 2* e 6), e os sobrenadantes foram coletados para dosagem de metaloproteinases (MMPs), inibidores teciduais de metaloproteinases 1 e 2 (TIMP-1 e TIMP-2) e RANTES por ELISA e por *Cytometric bead array*. **Resultados:** Indivíduos com DA apresentaram maior frequência de eosinófilos (LIN¹ CCR3⁺), relacionada à gravidade da doença. Observou-se também, que a frequência de CD62L (L-selectina) e de CD23 (receptor de baixa afinidade para IgE) em eosinófilos (LIN¹ CCR3⁺) diminuiu em pacientes com DA. Os receptores de ativação precoce (CD69) e tardio (CD38) não mostraram diferença estatística entre os grupos analisados. Os níveis séricos de MMPs e de TIMPs foram similares entre os controles e pacientes. Ao analisarmos a secreção de MMPs e de (TIMPs), a partir de eosinófilos purificados de pacientes com dermatite atópica, observamos diminuição dos níveis basais de TIMP-1 e TIMP-2 e de RANTES. **Conclusões:** Na DA do adulto, o perfil fenotípico e funcional dos eosinófilos mostrou: perfil de ativação da fase aguda, com expressão aumentada de CCR3; potencial de migração elevado, em decorrência da diminuição da expressão de CD62L; falhas no processo de ativação dos eosinófilos via CD23, bem como, no remodelamento tecidual mediado por TIMP-1 e TIMP-2 e na quimotaxia mediada por RANTES.

Descritores: Dermatite atópica, Eosinófilos, Inibidor tecidual de metaloproteinase-1, Inibidor tecidual de metaloproteinase-2, Metaloproteinases, Receptores CCR3.

ABSTRACT

TITZ TO. *Phenotypic and functional evaluation of eosinophils in atopic dermatitis of adults* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2014

Introduction: Atopic dermatitis (AD) is an inflammatory, chronic and recurrent skin disease characterized by intense pruritus and xerosis. AD has a complex etiopathogenesis, which involves the influence of genetics, environment, and immunological disorders, among others. Eosinophils are multifunctional polymorphonuclear leukocytes that contribute to the pathogenesis of several inflammatory processes, such as AD. In addition to the production and secretion of diverse proteins of the cytoplasmic granules, eosinophils have also the potential to secrete metalloproteinases (MMPs), proteolytic enzymes with a primary role for degrading several extracellular matrix components, present in distinct physiological and pathological processes. **Objective:** To evaluate: 1) the phenotypic profile of eosinophils in adults with atopic dermatitis through the expression of CCR3, CD23, CD38, CD69 and CD62L molecules; 2) the functional profile through secretion of MMPs, tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 (TIMP-1 and TIMP-2) and RANTES by purified eosinophils. **Methods:** This work enrolled 41 patients with AD, diagnosed according to Hanifin & Rajka's criteria) and 45 healthy controls. Severity of the disease was established utilizing EASI (Eczema Area and Severity Index). Eosinophils (Lineage cocktail 1^- CCR3 $^+$) from peripheral blood were analyzed for CCR3, CD38, CD69, CD23 and CD62L by flow cytometry (LSRFortessa, BD Biosciences), and analysis was performed using the FlowJo 7.5.6 software. Purified eosinophils were stimulated with *Staphylococcus aureus* enterotoxin B (SEB) FSL-1 (Toll-like receptor 2/6 agonist), and supernatants were collected for MMPs, TIMPs and RANTES secretion, evaluated by ELISA and cytometric bead array (CBA). **Results:** Patients with AD have a higher frequency of eosinophils (LIN1 $^-$ CCR3 $^+$), related to disease severity. Moreover, the frequency of CD62L (L-selectin) and CD23 (low-affinity receptor for IgE) in (LIN1 $^-$ CCR3 $^+$) eosinophils was reduced in individuals with AD. CD69 and CD38 (early and late activation receptors) did not show significant difference in the studied groups. Serum levels of MMPs and of TIMP-1 and TIMP-2 were similar in healthy controls and AD patients. When analyzing secretion of MMPs and TIMPs by purified eosinophils from AD individuals, we detected a decrease in baseline levels of TIMP-1, TIMP-2, and reduced RANTES-mediated chemotaxis. **Conclusions:** Eosinophils in AD exhibit an activation profile of acute phase, with enhanced CCR3 expression, high potential for migration due to reduced expression of CD62, defective activation mechanisms via CD23, altered tissue remodeling process mediated by TIMP-1 and TIMP-2 and reduced RANTES-mediated chemotaxis.

Descriptors: Atopic dermatitis, Eosinophils, Tissue inhibitors of metalloproteinases-1, Tissue inhibitors of metalloproteinases-2, Metalloproteinase, CCR3 receptors.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Dermatite atópica

Dermatite atópica (DA) é uma enfermidade cutânea inflamatória de caráter crônico e recidivante, na qual o prurido e a xerose cutânea são frequentes; é uma dermatose que geralmente se inicia na infância, e pode surgir em doentes com história familiar de asma, rinite alérgica e/ou dermatite atópica ¹.

A principal característica da DA é o prurido intenso, associado à hiper-reatividade cutânea para vários estímulos ambientais que incluem: a exposição a alimentos e alérgenos inalantes, mudança ambiental (poluição, umidade, entre outros fatores), infecções microbianas e o estresse ². Existe uma complexa interação de fatores ambientais, susceptibilidade genética, alterações de função da barreira cutânea e do sistema imune, além de infecções, principalmente por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Indivíduos com DA frequentemente apresentam outras doenças alérgicas tais como alergias alimentares, asma e rinite alérgica, que podem surgir ao longo da vida (marcha atópica) ³.

A DA inicia-se em geral durante a infância, mas pode persistir até a vida adulta em até 40% dos doentes. A sua prevalência é de aproximadamente 15 a 30% em crianças, e de 1 a 3% em adultos. Estes dados aumentaram duas a três vezes nas últimas três décadas em países industrializados, mas a DA continua sendo menos prevalente em zonas rurais e agrícolas ⁴.

Níveis elevados de imunoglobulinas da classe E (IgE) surgem em 55 a 90% dos indivíduos com DA e representam a forma extrínseca ou alérgica da doença, onde a hiper-reatividade em testes cutâneos contra antígenos pode ser detectada. Nesta forma ocorre o aumento citocinas do padrão T *helper* 2 (Th2), como interleucina (IL-) 4, IL-5 e IL-13, assim como de eosinófilos e da proteína catiônica do eosinófilo (ECP) no soro ⁵. Em contrapartida, na forma não alérgica e não associada ao aumento de IgE sérica denominada forma intrínseca ou não atópica (10 a 45% dos doentes), os doentes apresentam IgE ou células T autorreativas para antígenos microbianos não rotineiramente avaliados ².

1.2 Resposta imune na dermatite atópica

1.2.1 Barreira cutânea, imunidade inata e dermatite atópica

A barreira cutânea (BC) representa o primeiro obstáculo contra as agressões do meio externo, e é representada pelo estrato córneo (EC). O EC consiste não apenas em barreira física, como também representa uma estrutura metabolicamente ativa, interagindo com as camadas subjacentes da epiderme. Na DA, as alterações na BC se traduzem por perda de água transepidermica (*transepidermal water loss* ou TEWL), defeitos no metabolismo da pró-filagrina, uma das proteínas essenciais do EC, redução de ceramidas (ceramida 1), menor expressão de claudina 1 (localizada nas *tight junctions*) e consequente predisposição à infecções e inflamação ⁶.

Com relação à imunidade inata, sabe-se que os queratinócitos e as células apresentadoras de antígenos (APCs) na pele expressam receptores de reconhecimento de padrão molecular associados a patógenos, os *toll-like receptors* (TLRs). Quando estimulados por microrganismos ou injúrias teciduais, estes receptores induzem a liberação de peptídeos antimicrobianos, citocinas e quimiocinas. Destacamos três peptídeos antimicrobianos humanos: α -defensinas 2 e 3 (HBD-2 e HBD-3) e catelicidina (LL-37). A HBD-2 é efetiva no combate a microrganismos gram-negativos como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e leveduras. A HBD-3 e a LL-37 apresentam atividade mais potente e de amplo-espectro, sendo eficazes contra microrganismos gram-negativos e positivos ⁷.

A liberação dos peptídeos antimicrobianos aumenta a força das *tight junctions* e reforça a defesa contra a penetração dos microrganismos. Indivíduos com DA apresentam redução da função dos TLRs; falha neste processo de proteção, bem como nos peptídeos antimicrobianos promove maior predisposição às infecções cutâneas, principalmente as causadas pelo *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ⁶.

1.2.2 Imunidade adaptativa

A imunidade adaptativa na DA é bifásica, dividindo-se em aguda e crônica. Durante a fase aguda, ocorre aumento da produção de citocinas do padrão Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) e citocinas do padrão Th22, principalmente IL-22. Estas citocinas reduzem a diferenciação de células da epiderme, e podem contribuir para a redução de filagrina, e

de peptídeos antimicrobianos ⁸. Na fase crônica da doença, ocorre uma inversão do padrão Th2 para Th1, o que resulta em um intenso infiltrado de células dendríticas inflamatórias epidérmicas (IDECs), macrófagos e eosinófilos, assim como na produção de IL-12 por esses tipos celulares, gerando um aumento da produção de interferon- γ (IFN- γ), o qual é capaz de induzir a apoptose de queratinócitos (Figura 1) ².

Figura 1: Ilustração esquemática da fase aguda e progressão para fase crônica da Dermatite Atópica. Extraído de Gittler *et al.* (2012)⁹.

A subpopulação de células T $CD4^+$ secretoras de IL-17 (Th17) está presente tanto na fase aguda, quanto na fase crônica da doença. Estas células são caracterizadas por não expressar os fatores de transcrição T-bet e GATA-3, mas necessitam do fator de transcrição ROR γ t para sua diferenciação. Estas células estão envolvidas na proteção contra patógenos bacterianos, e podem ser cruciais na patogênese de várias doenças cutâneas inflamatórias crônicas ¹⁰.

Verificou-se que a IL-22, um membro da família da IL-10, além de ser produzida pelas células Th17, é capaz de produzir células T $CD4^+$, denominadas de células Th22, que, por sua vez, produzem altos níveis de IL-22, mas não expressam IL-

17 ou IFN- γ . Em contrapartida, podem produzir altos níveis de IL-13 e TNF- α . A função da IL-22 ainda é difícil de definir, aparentemente está relacionada com a resposta imune inata epitelial e com a fisiopatologia de pele em doenças inflamatórias. Pode mediar a proliferação de queratinócitos cutâneos e hiperplasia epidérmica¹⁰.

1.3 Os Eosinófilos

Os eosinófilos, primeiramente descritos por Paul Ehrlich em 1879, possuem alta afinidade por corantes ácidos. São leucócitos polimorfonucleares multifuncionais (PMNs), implicados na patogênese de numerosos processos inflamatórios, incluindo infecções parasitárias, virais e bacterianas, como também em injúria tecidual, imunidade tumoral e doenças alérgicas¹¹. Estas células migram para o sangue periférico no estágio maduro, e são ativadas e recrutadas para tecidos-alvo através de estímulos específicos. Após 18 horas, migram para o timo ou trato gastrointestinal (TGI), onde residem em condições de homeostasia¹².

Encontrados em baixa quantidade no sangue periférico de indivíduos saudáveis (até 500 células/mm³), os eosinófilos são morfologicamente distintos dos neutrófilos por apresentarem núcleo bilobulado e grandes grânulos citoplasmáticos. Apresentam quatro diferentes proteínas nos grânulos citoplasmáticos: proteína básica maior (MBP), proteína catiônica do eosinófilo (ECP), peroxidase do eosinófilo (EPO) e neurotoxina derivada de eosinófilo (EDN). Seus grânulos também armazenam citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e fatores de crescimento¹³.

Os eosinófilos expressam receptores de superfície para ligantes de fatores de crescimento, moléculas de adesão e fatores quimiotáticos. Entre os principais receptores que definem a biologia única destas células estão: a subunidade α do receptor da IL-5R α , o receptor de quimiocina CC tipo 3 (CCR3), a lectina tipo 8 semelhante à imunoglobulina, que se liga a ácido siálico (Siglec-8) e o CD23 (Fc ϵ RII) (Figura 2)¹³.

Figura 2: Ilustração esquemática de um eosinófilo. Adaptado de Rosenberg *et al.* 2012 ¹³.

O IL-5Rα é o principal receptor de citocinas expresso em eosinófilos, e sua expressão também foi descrita em basófilos humanos e murinos. A sinalização do receptor de IL-5 promove o desenvolvimento, ativação e sobrevivência dos eosinófilos no sangue periférico e tecidos ¹³. A importância deste receptor foi demonstrada por estudos em camundongos deficientes de IL-5 (IL-5^{-/-}), os quais não apresentam eosinofilia sanguínea e eosinófilos teciduais, quando infectados pelo helminto *Mesocostoides cort*, como se observa em animais *wild type* ¹⁴.

O CCR3 (CD193) é o principal receptor envolvido no processo de quimiotaxia dos eosinófilos para tecidos em processos inflamatórios, e apresenta como principais ligantes as eotaxinas CCL11, CCL24 e CCL26 e outras quimiocinas como CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP3), CCL8 (MCP2) e CCL12 (MCP5) ¹⁵. Embora o CCR3 seja descrito em células de músculo liso, a expressão de CCR3 é predominantemente encontrada em eosinófilos. Estudos em camundongos relatam que a deleção dos genes produtores de CCL11 e CCL14 resulta na diminuição do recrutamento dos eosinófilos para os pulmões e para o TGI ^{16, 17}.

Outro importante fator quimiotático também relacionado com eosinófilos é o CCL5, uma quimiocina secretada principalmente por células T *helper*, e que apresenta papel fundamental em várias doenças alérgicas, e promove a sobrevivência destas células ¹⁸.

Siglec-8 é uma lectina de superfície semelhante às imunoglobulinas, expressa por eosinófilos humanos e murinos (Siglec-F) ¹⁹. Apresenta dois motivos inibidores de imunorreceptores baseados em tirosina (ITIMs), acoplados a sua cauda citoplasmática, resultando na inibição da proliferação, secreção de fatores que promovem a sobrevivência e morte celular ²⁰.

O CD23 é um receptor de baixa afinidade para IgE, possui peso molecular de 45 kDa, e é composto por 321 aminoácidos. Este receptor não é restrito a eosinófilos, sendo expresso em células B, monócitos, macrófagos, plaquetas, células de Langerhans, células dendríticas foliculares (FDCs) e queratinócitos. Dois subtipos de CD23 são descritos, o CD23a (FcεRIIa) e o CD23b (FcεRIIb) ²¹. Uma vez ativado via CD23, os eosinófilos apresentam mudanças funcionais, secretam vários mediadores pró-inflamatórios, que ampliam a resposta inflamatória pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), aumento da secreção de fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), e levam ao aumento da expressão de moléculas de adesão, resultando no aumento da migração destas células ²².

O recrutamento de leucócitos em processos inflamatórios agudos ou crônicos é mediado por moléculas de adesão e por processos de ativação celular. As moléculas de adesão apresentam importância fundamental neste processo: as selectinas são responsáveis pelo processo de rolamento dos leucócitos pelo endotélio, devido à ligação de baixa afinidade entre as selectinas e seus respectivos ligantes; selectinas E e P estão presentes nas células endoteliais, e as selectinas L (CD62L), nos leucócitos, incluindo os eosinófilos ²³.

A eosinofilia, estado caracterizado por um número superior a 500 eosinófilos por microlitro cúbico de sangue periférico, está presente na maioria dos indivíduos com DA, e pode ter relação com a gravidade da doença e aos níveis séricos de IgE ²⁴. Pode ser utilizada como parâmetro para o diagnóstico diferencial da dermatite atópica extrínseca e intrínseca ¹⁸. Em crianças com histórico familiar de atopia, a eosinofilia pode estar associada com doenças alérgicas nos seis primeiros anos de vida ²⁵.

A degranulação e a deposição dérmica de proteínas dos grânulos citoplasmáticos dos eosinófilos já foram demonstradas na DA. Ainda, proteínas granulares já foram encontradas no sangue periférico e na urina de indivíduos com DA e podem se

relacionar com a gravidade da doença. MBP, ECP e EDN estão em geral elevadas no sangue periférico dos indivíduos com DA e podem ter relação com a gravidade da doença ²⁶.

Demonstrou-se, ainda, que os eosinófilos apresentam distintos padrões de secreções de citocinas em diferentes tipos de lesões, sejam estas por reações alérgicas, infecções, tumores ou doenças autoimunes. Em tumores de pele, nota-se eminente expressão de TGF- β , IL-6 e CCL24; em doenças autoimunes, os eosinófilos contribuem para a produção de metaloproteinases-9 (MMP-9), e a expressão de IL-5 é proeminente em alergias ou doenças infecciosas ²⁷.

1.4 Metaloproteinases e a dermatite atópica

A inflamação pode induzir destruição tecidual, e é seguida pelo remodelamento para a manutenção da homeostasia do tecido afetado. As metaloproteinases (MMPs) são enzimas proteolíticas cuja principal função é degradar vários componentes da matriz extracelular (ECM). Desde sua primeira descrição por Gross e Lampière (1962), foram evidenciadas aproximadamente 30 MMPs. Em humanos, foram descritos 24 genes que codificam 23 MMPs. As MMPs estão envolvidas em vários processos patológicos e fisiológicos, tais como desenvolvimento embrionário, ovulação, reprodução, dilatação cervical, cicatrização, remodelamento ósseo e tecidual, artrite, cânceres, entre outros processos ²⁸.

Em 1985, *Gasson* e colaboradores ²⁹, clonaram e caracterizaram o gene humano que codifica um fator que potencializa a atividade eritróide (EPA). No mesmo ano, *Docherty* ³⁰ e colaboradores sequenciaram o cDNA do gene inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), que se mostrou idêntico ao EPA. Depois de identificado, esse eixo apresentou duas principais funções: degradação da ECM e a hematopoese. A atividade das MMPs é regulada por inibidores endógenos, os TIMPs, que possuem de 184 a 194 aminoácidos, e se encontram na fase fluida do plasma. Quatro isoformas são conhecidas em vertebrados (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4), sendo que cada TIMP apresenta afinidade distinta para cada MMPs ³¹.

Assim como as MMPs, a expressão dos TIMPs também é regulada para manter o equilíbrio entre a proteólise e a inibição da proteólise, o que permite a estabilidade da matriz extracelular. A não regulação das MMPs e dos TIMPs leva a uma intensa degradação da matriz extracelular, culminando em fibrose tecidual ³².

Os queratinócitos também podem produzir e secretar MMPs, especialmente MMP-1, 9 e 10; seu papel como fonte produtora de MMPs foi enfatizado com o aumento da expressão de mRNA para MMP-1, MMP-9 e MMP-10 na pele de indivíduos com DA³³. Além disto, elevados níveis de MMPs foram reportados em sangue periférico de indivíduos com DA, sugerindo um papel importante na patogênese da DA³⁴.

1.5 Papel do *Staphylococcus aureus* na dermatite atópica

O *S. aureus* é uma bactéria gram-positiva presente em um terço da população e pode ser responsável por diversas doenças. Estas incluem intoxicação alimentar, e síndrome do choque tóxico, ambas causadas por suas enterotoxinas⁷.

Uma condição que merece destaque nos indivíduos com DA, é a colonização da pele pelo *S. aureus* em 80 a 100% dos indivíduos com DA, o que geralmente é relacionado com o grau de inflamação da pele.²⁴ O mecanismo pelo qual o *S. aureus* causa exacerbação no quadro de DA é controverso. Admite-se que haja aumento da colonização da pele por injúria direta (prurido, variação do pH da pele), ou pela liberação de enterotoxinas que funcionam como superantígenos, induzindo a ativação policlonal de células T^{35,36}.

A susceptibilidade da pele do atópico à colonização pelo estafilococo parece estar relacionada a diversos fatores, entre os quais a aderência bacteriana. Adesinas, que consistem em receptores para laminina e fibronectina, estão localizadas nas paredes bacterianas do *S. aureus*; na DA, os receptores para fibronectina parecem estar descobertos, facilitando, assim, a aderência do estafilococo. Ainda, defeitos na membrana lipídica da pele do atópico facilitam a penetração bacteriana, permeando os espaços intercelulares. A observação de que o *S. aureus* permeia os espaços intercelulares da epiderme sugere que os lipídeos da superfície da pele estejam danificados nos pacientes com DA^{37,38}.

O *S. aureus* pode secretar várias enterotoxinas (A - U) (SEA-SEU), e a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) que podem atuar como superantígenos, estimulando de forma policlonal linfócitos T e macrófagos, sem a interferência do sistema complexo principal de histocompatibilidade (MHC)³⁹⁻⁴¹. O superantígeno interage diretamente com porções constantes da cadeia V β do receptor de linfócitos T. Outro mecanismo possível seria a geração de anticorpos IgE específicos contra as

exotoxinas, ou seja, os superantígenos poderiam atuar como alérgenos, uma vez que 57% dos indivíduos com DA apresentam IgE dirigida contra SEA, SEB e TSST-1. Estudos mostram que existe correlação entre gravidade da DA e a presença de anticorpos IgE contra estes superantígenos, o que pode significar que os superantígenos têm um importante papel na patogênese da DA, ou que são também processados como antígenos ⁴².

A toxicidade dos superantígenos bacterianos é mediada por uma intensa atividade da célula T estimuladora, que gera altos níveis de citocinas, tais como: TNF- α (fator de necrose tumoral α), interleucinas (IL-1, IL-2, IL-6) e IFN- γ . Os superantígenos podem induzir anergia, inflamação, citotoxicidade, deleção de células T e autoimunidade. ⁴³

Outros mecanismos do *S. aureus* envolvidos na resposta inflamatória da DA incluem: influência sobre as APCs e eosinófilos, modulando a resposta de antígenos de superfície celulares; liberação de toxinas (α -toxinas), que levam ao dano citotóxico em queratinócitos, e estimulam a liberação de TNF- α ; aumento da síntese de IgE e expressão de CD23 in vitro ocasionados por componentes da parede bacteriana, como o ácido teicóico ou peptidoglicanas. ^{37, 44, 45}.

A enterotoxina tipo B do *S. aureus* (SEB) é capaz de induzir a maturação das células dendríticas mielóides (mDCs). Além da interação direta do patógeno com as DCs, as toxinas produzidas por bactérias podem constituir um fator desencadeante no processo inflamatório de doenças como a DA, devido à sua capacidade de atravessar as barreiras fisiológicas da pele ⁴⁶.

1.6 Os Receptores *Toll Like* (TLRs)

Um conjunto de moléculas com importante papel na imunidade inata são identificados como receptores de reconhecimento de padrão (PRR), capazes de detectar padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), ou seja, estruturas conservadas presentes nos diversos microorganismos ⁴⁷. Dentre os PRRs, destaca-se a família dos receptores TLRs.

Até o momento foram identificados 10 TLRs em humanos. Estes receptores podem responder a produtos bacterianos, tais como as lipoproteínas bacterianas, lipomananas e ácido lipoteicóico de bactérias gram-positivas (TLR2), lipopolissacáride (TLR4), e flagelina bacteriana (TLR5), localizados na membrana plasmática e

reconhecem componentes extracelulares^{48 49}. Por outro lado, os intracelulares, como TLR3 reconhecem ácidos nucleicos como a dsRNA; o TLR7 e TLR8 reconhecem a simples fita de RNA (ssRNA), e o TLR9, os motivos CpG de DNA⁵⁰.

Os TLRs são expressos em diversas células do sistema imune (queratinócitos, células de *Langerhans*, monócitos, macrófagos, DCs, linfócitos T e B, granulócitos, mastócitos, células endoteliais do micro vasculatura da pele, fibroblastos, e adipócitos). Estão envolvidos na patogênese de diversas doenças de pele, como a psoríase, o líquen plano, dermatite atópica, dermatite de contato, sífilis, hanseníase, micoses e cânceres de pele⁵¹.

As vias de sinalização dos TLRs são reguladas por moléculas adaptadoras intracelulares, tais como MyD88, MAL, TRIF, TRAM e SARM⁵². A maioria dos TLRs (exceto TLR3), iniciam a sinalização de uma série de quinases e outras proteínas via MyD88, culminando na ativação do NF- κ B. Outros adaptadores como os membros da família de fatores de transcrição IRF (fator regulador de IFN), tais como IRF 1, 3, 5 e 7, são ativados pela MyD88 ou TRIF, e são cruciais para produção de IFN tipo I.

Os TLRs mais associados à DA são TLR2 e TLR9; por outro lado, os TLRs associados ao reconhecimento da bactéria *S. aureus*, presente na maioria dos indivíduos com DA, são os TLR2 e TLR6, que por sua vez, estão associados ao reconhecimento de lipopeptídeos e ácidos lipoteicoicó bacterianos. Estudos com camundongos deficientes de TLR2 demonstraram que estes animais são mais susceptíveis a infecções por *S.aureus*, o que comprova a importância do TLR2 na defesa contra infecções por *S.aureus* na pele⁵³.

Dada a complexa da imunopatogênese da DA, faz-se necessário um melhor entendimento das características fenotípicas, relacionadas a marcadores de ativação, e das características funcionais relacionadas ao remodelamento tecidual dos eosinófilos.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

A proposta deste projeto é avaliar o perfil fenotípico e funcional dos eosinófilos na dermatite atópica em adultos.

2.2 Específicos

Os objetivos secundários a serem avaliados nos pacientes com dermatite atópica do adulto foram:

- Quantificar e avaliar o fenótipo de eosinófilos em sangue periférico através da expressão das moléculas CCR3, CD23, CD62L, CD38 e CD69
- Avaliar os níveis séricos de metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9) e inibidores teciduais de metaloproteinases 1 e 2 (TIMP-1 e TIMP-2)
- Avaliar a resposta *in vitro* dos eosinófilos purificados frente ao estímulo com enterotoxina B de *Staphylococcus aureus* (SEB) e FSL-1 (agonista de TLR-2 e 6) quanto à expressão de MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 e RANTES

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

Foram incluídos 41 pacientes de DA (segundo os critérios maiores e menores de Hanifin e Rajka)¹ com idade acima de 18 anos e de ambos os sexos, com quadro leve, moderado ou grave. Para avaliar a gravidade da doença, foi utilizado o EASI (Índice de gravidade e área de eczema)⁵⁴. Foi analisado também um grupo controle, constituído por 45 indivíduos provenientes do Laboratório de Dermatologia e Imunodeficiências (LIM-56) com idade acima de 18 anos, sem história pessoal de atopia (asma, rinite alérgica e/ou dermatite atópica). Todos os sujeitos tiveram acesso ao termo de consentimento livre esclarecido, e foram incluídos no estudo após leitura e concordância com o mesmo.

Critérios de exclusão: 1) Indivíduos com DA com idade inferior a 18 anos; 2) Uso de corticosteroides ou imunossupressores sistêmicos por no mínimo quatro semanas; 3) Gestantes.

3.2 Obtenção dos soros

As amostras de sangue periférico dos indivíduos foram coletadas em tubo seco estéril, sem aditivo. O sangue foi centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm a 10° C e o soro coletado e armazenado a -80° C, para posterior dosagem de MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2.

3.3 Dosagem sérica de IgE

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

3.4 Obtenção e marcação de eosinófilos do sangue periférico

O tubo contendo EDTA foi homogeneizado por 5 minutos; em seguida as marcações foram realizadas com 70µL de sangue. Para marcação dos eosinófilos, foram utilizados os anticorpos anti-LIN1 (marca as moléculas de superfície CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 e CD56), anti-CCR3, anti-CD23, anti-CD38, anti-CD69 e anti-CD62L (Quadro 1). Após a adição dos anticorpos, as células foram incubadas por 20 minutos e protegidas da luz em temperatura ambiente (T.A). Em seguida, as células foram incubadas por 15 minutos a T.A. em 450 µL de uma solução de ruptura de hemácias (BD FACS™ *Lysing* , BD *Pharmingen*, San Jose, EUA) até a ruptura completa; em seguida foram lavadas com 1 mL de solução isotônica (*Hemoton SPEC*, Bragança Paulista, SP, Brasil).

Ao final, foram adquiridos 200.000 eventos em LSR Fortessa com auxílio do *software Diva* (BD *Pharmingen*, San Jose, CA, EUA). As compensações e análises da frequência das células e dos marcadores de ativação foram realizadas com auxílio do *software Flow Jo* versão 7.6.5 (*Tree Star* - Ashland, OR, EUA). Dentro da população de eosinófilos (LIN 1⁻ CCR3⁺), analisou-se a frequência de expressão dos receptores de ativação. O controle FMO (*Fluorescence Minus One*) foi utilizado para o painel de anticorpos para avaliar a compensação adequada e identificar a porção positiva.

No Quadro 1 verificam-se as especificações dos anticorpos utilizados nestas marcações.

Quadro 1. Painel para marcação *ex-vivo* de eosinófilos do sangue periférico

Anticorpo	Fluorescência	Volume em µL	Fabricante/Local
anti-LIN1	FITC	1	BD <i>Pharmingen</i> ™/San Jose, CA,EUA
anti-CCR3	PE	1	BD <i>Pharmingen</i> ™/San Jose, CA,EUA
anti-CD62L	PE-CY5	1	BD <i>Pharmingen</i> ™/San Jose, CA,EUA
anti-CD23	PE-CY7	1	BD <i>Pharmingen</i> ™/San Jose, CA,EUA
anti-CD38	Alexa 700	1	BD <i>Pharmingen</i> ™/San Jose, CA,EUA
anti-CD69	APC-CY7	1	BD <i>Pharmingen</i> ™/San Jose, CA,EUA

3.5 Obtenção e purificação dos eosinófilos do sangue periférico

Foram coletados aproximadamente 40mL de sangue periférico em tubos heparinizados. O sangue periférico foi diluído em solução salina estéril na proporção 1:1; em seguida, a suspensão das hemácias com os granulócitos foi obtida após centrifugação por 20 minutos a 2.200 rpm através de gradiente de *Ficoll-Hypaque*

(Amersham Pharmacia Biotech, NJ, EUA). As hemácias foram lisadas com tampão a base de cloreto de amônia (*Pharm Lyse (BD biosciences, San Jose, EUA)*). Os granulócitos foram quantificados na suspensão celular com o uso da câmara de Neubauer e a concentração foi ajustada para 2×10^7 . Em seguida, os eosinófilos foram purificados através de seleção negativa, de acordo com o as instruções do *Eosinophil Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanha)*. A viabilidade celular foi de 95% e foi observada com auxílio do corante Azul de *Tripan*.

3.6 Cultura de eosinófilos e obtenção de sobrenadantes

As concentrações das suspensões de eosinófilos foram ajustadas para 2×10^5 células/mL em meio de cultura RPMI enriquecido com 10% de pool de soro AB (*Sigma, St. Louis, MO, EUA*). 200 μ L da suspensão de células foram distribuídos em microplacas com 96 poços, e incubados com enterotoxina de *Staphylococcus aureus* B (SEB 1 μ g/mL) e FSL-1 (agonista de TLR 2 e 6) (10 ng/mL) (*Sigma, St. Louis, MO, EUA*) à 37° C e 5% de CO₂. Após incubação de 6 horas, os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados, centrifugados a 4000 rpm por 5 minutos à 10° C, aliqüotados e congelados a -80°C para dosagem de MMPs e TIMPs.

3.7 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para dosagem de MMPs e TIMPs

A determinação das MMP-2 e MMP-9 e TIMP-1 e TIMP-2 nos soros foi realizada por ELISA, seguindo as especificações do fabricante (*R&D System Minneapolis, MN, EUA*). Microplacas com 96 poços (A-2, *Costar, Corning, NY, EUA*) foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais anti-MMPs e anti-TIMPs, diluídos em PBS e incubadas por 18 horas a temperatura ambiente. As placas foram bloqueadas com PBS/BSA 1% (*Sigma, St. Louis, MO, EUA*) e incubadas por uma hora a temperatura ambiente. Em seguida, após um ciclo de três lavagens com tampão PBS/0,05% Tween-20, foram adicionadas as amostras e as diluições seriadas da curva padrão. As placas foram incubadas por duas horas a temperatura ambiente e, após o término deste período, os respectivos anticorpos anti-MMPs e anti-TIMPs biotinilados foram adicionados às placas e incubados por 2 horas a temperatura ambiente. A seguir, após um ciclo de três lavagens, foi adicionada estrepto avidina peroxidase (*Sigma, St. Louis, MO, EUA*) seguida de uma incubação de 20 minutos a temperatura ambiente. Após novas lavagens,

foi adicionado o substrato 3, 3', 5, 5'tetrametilbenzidina (TMB, *Calbiochem*, EUA) por 20 minutos. A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 1 M e a leitura realizada em leitor de microplacas de Elisa (*Molecular Devices*, CA, EUA) a 450 nm.

3.8 CBA (Cytometric Bead Array)

A determinação da quimiocina RANTES (*Human RANTES Flex Set*) nos sobrenadantes de cultura foi realizada por citometria de fluxo, utilizando o *Kit Cytometric Bead Array*, CBA, (BD *Bioscience*, San Diego, CA, EUA). RANTES foi dosado de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de sobrenadantes e os padrões do kit foram incubadas com as microesferas de captura recobertas com anticorpos específicos para as respectivas citocinas. Logo após, as amostras foram incubadas com anticorpos de detecção marcados com ficoeritrina (PE). A aquisição das amostras foi realizada no citômetro de fluxo, (LSRFortessa - BD *Biosciences*, San Jose, EUA) e os resultados foram gerados em formato gráfico e tabular utilizando o BD CBA *Analysis Software*.

3.9 Análise Estatística

Para realização da análise estatística dos dados e construção dos respectivos gráficos, foi utilizado o software *GraphPad Prism* versão 5.00. Os testes não-paramétricos de *Mann-Whitney* e *Kruskal-Wallis* foram utilizados respectivamente para comparar dois ou três grupos de dados. A correlação entre os dados foi estabelecida utilizando-se o teste de correlação não-paramétrico de *Spearman*. A diferença entre os grupos analisados foi considerada estatisticamente significativa, quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05.

4. RESULTADOS

4.1 Aumento da IgE sérica e da frequência de eosinófilos em indivíduos com Dermatite atópica.

Inicialmente, analisamos os níveis séricos de IgE em indivíduos com DA. Os pacientes apresentaram secreção média de IgE de 22.100 UI/mL e os níveis séricos aumentaram, de acordo com a gravidade da doença. (Figura 4A).

Para seleção de eosinófilos, através da citometria de fluxo, foram adquiridos 200.000 eventos, nos quais foram selecionadas todas as células polimorfonucleares (PMNs) pela relação tamanho FSC (*forward scatter*) por granulosidade SSC (*side scatter*), e que não expressam as moléculas de superfície CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56 contidas no LIN 1 (*lineage cocktail 1*), mas que expressam CCR3 (CD193) (Figura 3).

Figura 3. Estratégia de *gating* para seleção de eosinófilos a partir de células polimorfonucleares em sangue periférico de indivíduos controles e com dermatite atópica.

Para avaliar a frequência de eosinófilos no sangue periférico de indivíduos controles e indivíduos com DA, analisamos a frequência média de eosinófilos (LIN 1⁻ CCR3⁺) em: indivíduos controles, de 5,02(%), e em indivíduos com DA, de 17,38(%). Observamos uma maior frequência de eosinófilos (LIN 1⁻ CCR3⁺), nos indivíduos com DA em relação aos controles (Figura 4B), sem influência na média de intensidade de expressão (MFI) do receptor CCR3. A frequência de eosinófilos mostrou-se elevada, de acordo com a gravidade da doença (Figura 4C). Detectou-se também uma correlação positiva entre os níveis séricos de IgE e a frequência de eosinófilos (LIN 1⁻ CCR3⁺) (Figura 4D).

Figura 4. Quantificação de eosinófilos e IgE sérica em indivíduos com dermatite atópica.

A. Níveis séricos de IgE em indivíduos com DA. **B e C.** Frequência de eosinófilos e escala de gravidade em sangue periférico de indivíduos controles e com DA. **D.** Correlação entre níveis séricos de IgE e eosinófilos em sangue periférico de indivíduos com DA. Controles (n=25), DA (n=22). Os pontos representam valores individuais e os traços representam a média $\pm$ erro padrão. * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,0001$.

4.2 Diminuição da expressão de CD23 e CD62L em eosinófilos de indivíduos com dermatite atópica.

Com intuito de analisar a ativação dos eosinófilos, avaliou-se, em sangue periférico, os eosinófilos que expressaram CD23, CD62L, CD69 e CD38; foram selecionados os eosinófilos ($\text{LIN}^{-1} \text{CCR3}^{+}$), e a seguir analisamos cada marcador separadamente (Figura 5).

Figura 5. Estratégia de *gating*, a partir de um paciente, para avaliação dos marcadores de ativação na população de eosinófilos ($\text{LIN}^{-1} \text{CCR3}^{+}$) em sangue periférico de controles e pacientes com dermatite atópica.

Foi observada uma diminuição na frequência de CD23 e CD62L em eosinófilos de indivíduos com DA (Figura 6A e B). CD38 e CD69 não mostraram diferença estatística entre os grupos de estudo (Figura 6C e D). Nenhum resultado obtido apresentou relação com a gravidade da doença.

Figura 6. Perfil de ativação de eosinófilos de indivíduos controles e com dermatite atópica.

A, B, C e D. Frequência de expressão de CD23, CD62L, CD69 e CD38 em eosinófilos do sangue periférico. Os pontos representam valores individuais e os traços representam a média $\pm$ erro padrão. Controles (n=24), DA (n=26). * $p \leq 0,05$.

4.3 Correlação entre CD62L (L-selectina) e moléculas de ativação CD23 e CD69

Após a análise individual de cada marcador, analisamos as correlações negativas ou positivas, presentes entre os marcadores de ativação CD62L, CD23 e CD69.

Correlação negativa entre CD62L e CD69 foi observada em controles, quando comparados com indivíduos com DA. Houve correlação positiva em indivíduos controles entre CD62L e CD23, ambas moléculas expressas em eosinófilos (Figura 7A e C).

Figura 7. Correlação entre CD62L e moléculas de ativação (CD69 e CD23). A e B. Correlação entre CD62L e CD69 em indivíduos controles e com DA. **C e D.** Correlação entre CD62L e CD23 em indivíduos controles e com DA. Os pontos representam valores individuais. Controles (n=24), DA (n=26).

4.4 Avaliação sérica de metaloproteinases e de inibidores teciduais de metaloproteinases de indivíduos controles e com dermatite atópica.

Para avaliação sérica de metaloproteinases e inibidores teciduais de metaloproteinases, utilizamos a dosagem através do método de ELISA. Não observamos diferença estatística dos níveis séricos de MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 entre indivíduos com DA e controles (Figura 8A, B, C e D), bem como não foi observada relação com a gravidade da doença.

Encontramos correlação positiva entre os níveis séricos de MMP-2 e TIMP-1 em indivíduos controles, o que não foi observado em indivíduos com DA (Figura 8E e F).

Analizamos também correlações entre MMP-9 e TIMP-2, mas não houve diferença estatística entre os grupos de estudo.

Figura 8. Avaliação sérica e correlação entre metaloproteinases e inibidores teciduais de metaloproteinases. A, B, C e D. Avaliação sérica da secreção de metaloproteinases e inibidores teciduais de metaloproteinases, comparando-se grupo controle e indivíduos com DA. E e F. Correlação entre TIMP-1 e MMP-2 entre indivíduos controles e com DA. Os pontos representam valores individuais. Controles (n=28), DA (n=33).

4.5 Alteração de inibidores teciduais e RANTES em eosinófilos de indivíduos com Dermatite atópica.

Posteriormente, analisamos aspectos funcionais dos eosinófilos relacionados ao remodelamento tecidual e quimiotaxia, através da secreção *in vitro* por eosinófilos purificados de MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 e RANTES estimulados com SEB e FSL-1. Para dosagem de MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2, utilizamos o método de ELISA; para a dosagem de RANTES utilizamos o método de CBA.

Observamos que, em eosinófilos purificados a partir do sangue periférico em condições basais, os níveis de TIMP-1, TIMP-2 e RANTES apresentavam-se diminuídos em indivíduos com DA, quando comparados com indivíduos controles. Em relação aos níveis de MMP-2 e MMP-9, não houve diferença estatística em condições basais (Figura 9A). Ao estimularmos os eosinófilos purificados com SEB e FSL-1 por 6 horas, não houve diferença estatística. Todos os resultados estimulados com SEB e FSL-1 foram subtraídos dos valores basais (Figura 9B e C).

Figura 9. Avaliação de metaloproteinasas, inibidores teciduais de metaloproteinasas e RANTES. **A.** Níveis basais de secreção de MMPs, TIMPs e RANTES. **B.** Níveis de secreção de MMPs, TIMPs e RANTES após estímulo com SEB. **C.** Níveis de secreção de MMPs, TIMPs e RANTES após estímulo com FSL-1. Os pontos representam valores individuais e os traços representam a média ± erro padrão. Controles (n=10), DA (n=10). *p≤0,05.

5. DISCUSSÃO

A dermatite atópica é uma doença inflamatória crônica de alta prevalência e etiopatogenia multifatorial, onde coexistem alterações da barreira cutânea aspectos genéticos e disfunção imune. Os eosinófilos, presentes nas doenças inflamatórias e alérgicas, exercem papel de relevância na patogênese da DA. Pouco frequentes no sangue periférico e em tecidos, são basicamente restritos ao TGI. Em condições inflamatórias e de infecções bacterianas, como na DA, são mais frequentes no sangue periférico, e estão presentes na derme ².

Os eosinófilos possuem papel imunomodulador; ao serem ativados, degranulam, e seus grânulos citoplasmáticos (MPB, ECP, EDN e EPO) promovem a sobrevivência de mastócitos, geram aumento da produção de histamina, estimulam a maturação das DC, e agem sobre neutrófilos, levando à produção de IL-8 e superóxidos. Os eosinófilos também apresentam moléculas coestimuladoras, as quais promovem a proliferação e produção de citocinas pelos linfócitos T CD4⁺ ¹³.

Simon *et al.* ⁵⁵ descrevem que o aumento do número de eosinófilos teciduais e sanguíneos está presente na maioria dos indivíduos com DA, e que está fortemente relacionado com a gravidade da doença, a alergias respiratórias, e com a forma extrínseca da DA.

A avaliação dos níveis séricos de IgE consiste em um dos critérios diagnósticos da DA ¹. Estudos relatam que em 55% a 90% dos indivíduos com DA apresentam IgE sérica elevada, que, à semelhança a eosinofilia, se relaciona com a gravidade da doença e com manifestações respiratórias ⁵.

Em nosso estudo, todos os indivíduos com DA analisados apresentaram níveis de IgE elevados e eosinofilia, sendo que a elevação de IgE apresentou correlação com a gravidade da doença. Demonstramos que ocorreu correlação positiva entre os níveis de IgE e a frequência de eosinófilos, corroborando os dados de literatura ²⁴.

O CCR3 é o receptor de quimiocinas mais importante para eosinófilos. Estudos evidenciam que indivíduos com DA apresentam níveis de eotaxinas (CCL11, CCL24 e CCL26) elevados no sangue periférico ⁵⁶ e em lesões de pele ⁵⁷. Ainda, em outras doenças de caráter alérgico, como a asma, o CCR3 está positivamente relacionado com a gravidade da doença ⁵⁸.

Os resultados obtidos na presente análise mostraram um aumento na frequência dos eosinófilos CCR3⁺ em pacientes com DA e correlação positiva com a gravidade da

doença. Considerando-se que a molécula CCR3 é um receptor para quimiocinas, (incluindo as eotaxinas CCL11, CCL24 e CCL26), e que a interação entre este receptor e seus ligantes acarreta na infiltração e quimiotaxia do eosinófilo através do tecido, é provável que os eosinófilos CCR3⁺ possuam um maior potencial para migrar a partir do sangue periférico, em resposta à produção tecidual de quimiocinas. Um fato que corrobora os dados anteriores é a evidência de que o tratamento tópico com o imunomodulador *tacrolimus* diminui os níveis séricos de IL-5 e a expressão de CCR3, IL-5 e RANTES em amostras de pele de paciente com DA, com redução do infiltrado de eosinófilos para tecidos lesionados ⁵⁹.

Quanto ao processo de remodelamento, Gaspar K. *et al.* ⁶⁰ evidenciam um aumento da expressão de CCR3 em fibroblastos em estudos *in vitro* e *in vivo*; entre os ligantes para CCR3, foi observado um aumento de CCL26 (eotaxina-3) em indivíduos com DA, quando comparados com indivíduos com psoríase. O aumento de CCL26 leva à formação de um microambiente pro-fibrogênico induzido por queratinócitos, eosinófilos e citocinas Th2; as citocinas Th2, por sua vez, levam ao aumento de ligantes de CCR3 como CCL26 e CCL11, responsáveis pela propagação dos eosinófilos, pela produção de TGF- β e remodelamento tecidual.

É descrito que a IgE sérica de indivíduos se liga ao receptor de baixa afinidade CD23, presente nos eosinófilos e em outras células do sistema imune, promovendo a ativação dessas células através da liberação do conteúdo presente nos grânulos citoplasmáticos, aumentando a expressão de moléculas de adesão e a migração dos eosinófilos para os sítios inflamatórios ⁶¹. Estudos apontam que a expressão de CD23 em células B e CD23 solúvel (sCD23) de indivíduos com penfigóide bolhoso (PB) está aumentada em relação a controles, com correlação positiva entre os níveis séricos de IgE e a frequência de CD23 nestas células. Nos eosinófilos de indivíduos com PB, no entanto, não ocorre correlação entre IgE e a frequência de CD23 ou sCD23 ⁶².

Em nossa análise, observamos uma diminuição na expressão de CD23 em eosinófilos (LIN¹ CCR3⁺). Sugere-se, portanto, uma deficiência na expressão de CD23 pelos eosinófilos de indivíduos com DA, o que acarreta uma deficiência na ativação dessas células via CD23 e uma menor secreção de citocinas pro-inflamatórias como TNF- α .

Alguns autores relatam alta expressão de CD62L em células T *naive*. A secreção de citocinas IFN- γ e IL-12 por células Th1 ou IL-4 por células Th2 induzem a

redução da intensidade de CD62L. Consequentemente, essas células T podem adquirir função efetora, o que leva à diminuição da expressão de CD62L, ou as células T adquirem função de memória mantendo alta a expressão de CD62L²³. A regulação e função da expressão da molécula CD62L em eosinófilos é, até o momento, pouco descrita.

Nossos resultados mostraram uma menor frequência de eosinófilos que expressam CD62L nos indivíduos com DA, quando comparados aos controles. Isto pode indicar um maior grau de ativação dos eosinófilos nos pacientes com DA, o que pode acarretar na perda da expressão de CD62L, favorecendo sua migração para tecidos inflamados.

Ainda com relação ao CD62L, Seneviratne *et al.*⁶³ mostraram que, células T CLA⁺ (antígeno linfocitário cutâneo) de indivíduos com DA extrínseca expressam CD62L em baixa intensidade, sugerindo que essas células são capazes de migrar para os linfonodos ou para a pele afetada pelo *S. aureus*. Em nossa avaliação fenotípica por citometria de fluxo, a expressão de CLA não foi detectável em eosinófilos.

Avaliamos ainda a expressão dos marcadores de ativação precoce CD69 e tardio CD38. CD69 é expresso em células T, células B, células *natural killer* (NK), macrófagos, neutrófilos e eosinófilos⁶⁴. O aumento da intensidade de expressão de CD69 em eosinófilos já foi descrita em crianças com DA, em comparação a indivíduos controle, e há relação positiva com a gravidade da doença⁶⁵; este aumento também já foi descrito em infecções helmínticas⁶⁶. Nossos resultados não evidenciaram alteração estatisticamente significativa na frequência de CD69 expresso nos eosinófilos.

O aumento da expressão do marcador de ativação CD38 já foi descrito em linfócitos T CLA⁺ de indivíduos com DA extrínseca, e indica um maior grau de ativação devido à migração para a pele (*skin-homing*)⁶³. A avaliação da expressão do CD38 em eosinófilos não mostrou diferença entre os grupos do nosso estudo, mas seu papel quanto à migração e grau de ativação destas células ainda é pouco elucidado, e provavelmente difere do seu papel descrito em linfócitos.

Avaliamos ainda, a correlação entre as moléculas de ativação CD62L e CD69 em eosinófilos; foi observada correlação negativa entre CD62L e CD69 em indivíduos controles, ou seja, os eosinófilos de indivíduos controles são menos ativados, diferentemente do observado no indivíduo com DA. É possível que essa maior demanda de eosinófilos com características de ativação seja decorrente de fatores estimuladores na circulação.

As metaloproteinases podem exercer função relevante nos processos inflamatórios. Níveis séricos elevados de TIMPs são descritos em indivíduos com desordens associadas a fibrose, como esclerose sistêmica, asma e fibrose do fígado ⁶⁷. Na DA, o aumento da produção de TIMPs e diminuição de MMPs podem levar à liquenificação e ao prurido.

Katoh *et al.* ⁶⁸ evidenciam aumento nos níveis séricos de TIMP-1, MMP-3, eosinófilos e IgE sérica, ao contrário da psoríase. Outros autores relatam elevação de MMP-9 sérico em indivíduos com DA em relação a controles, mas sem relação com a gravidade da doença. ⁶⁹. Os níveis de MMP-9 estão elevados no plasma de indivíduos com urticária crônica, e estão relacionados com a gravidade da doença. Estes autores sugerem que mastócitos, eosinófilos e linfócitos T ativados seriam potenciais fontes de MMP-9 ⁷⁰.

Embora nossa avaliação fenotípica tenha sugerido que os indivíduos com DA apresentem maior potencial de migração dos eosinófilos, a avaliação dos níveis séricos de MMP-2, MMP-9, TIMP 1, TIMP-2 não revelaram diferenças entre os grupos de estudo ou em relação à gravidade da doença. Observamos também correlação positiva entre os níveis séricos de MMP-2 e TIMP-1 em indivíduos controles, fato este não observado em indivíduos com DA, inferindo, assim, possível falha no balanço de metaloproteinases e inibidores teciduais de metaloproteinases, e consequente alteração no remodelamento tecidual.

Em nossos pacientes de DA, observamos diminuição na secreção por eosinófilos purificados dos níveis basais de TIMP-1, TIMP-2 e RANTES. Entretanto, mediante estímulos com SEB e FSL-1, não houve diferença significativa nos níveis de MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 e RANTES.

Assim, na DA, além da potencial falha no processo de remodelamento tecidual mediado por eosinófilos, podemos salientar alterações no processo de recrutamento, já que RANTES é considerado uma das principais quimiocinas responsáveis por este mecanismo. No entanto, a quimiotaxia tecidual dos eosinófilos na DA pode ser explicada pela existência de outras células produtoras de RANTES, como os linfócitos T CD4⁺ ⁷¹.

Avaliamos também a secreção, por eosinófilos purificados, de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IFN- γ e TNF- α), citocinas no perfil Th2 (IL-4 e IL-5), citocina regulatória (IL-10) e citocina relacionada a proliferação de células T (IL-2), mas não foi

possível detectar os níveis de secreção, tanto basais quanto estimulados por SEB e FSL-1.

De acordo com nossos resultados obtidos, seria de interesse futura análise da expressão de moléculas anti-apoptóticas e pro-apoptóticas (Caspase-3, Bcl-2 e Bax) para evidenciar um possível processo de apoptose, conseqüente à baixa secreção de citocinas, quimiocinas, metaloproteinases e inibidores teciduais de metaloproteinases em eosinófilos purificados de adultos com DA.

O perfeito entendimento dos mecanismos imunopatogenéticos da DA é imprescindível para o desenvolvimento de terapias específicas, com menores efeitos adversos para o paciente.

6. CONCLUSÕES

Na dermatite atópica, a eosinofilia é uma característica marcante. A avaliação fenotípica e funcional dos eosinófilos no sangue periférico e purificados revela que:

- 1) Há expressão aumentada de CCR3, indicando perfil de ativação de fase aguda aumentada, e expressão reduzida de CD23 e CD62L.
- 2) Níveis basais de secreção de TIMP-1, TIMP-2 e RANTES estão reduzidos em eosinófilos purificados em condições basais, mas não frente a estímulos como enterotoxina B de *Staphylococcus aureus* (SEB) e FSL-1 (agonista de TLR-2 e 6).
- 3) Eosinófilos ativados exibem um potencial de migração elevado, com falha no processo de ativação via CD23, bem como no processo de remodelamento tecidual mediado por TIMP-1 e TIMP-2 e na quimotaxia mediada por RANTES.

7. ANEXOS

7.1 Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq).

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ENTEROTOXINA TIPO B DO STAPHYLOCOCCUS AUREUS NA SECREÇÃO DE METALOPROTEINASES E FATORES PRO-INFLAMATÓRIOS POR EOSINÓFILOS NA DERMATITE ATÓPICA DO ADULTO

Pesquisador Responsável: Dra. Valéria Aoki

Versão: 2

Pesquisador Executante: Tiago de Oliveira Titz

CAAE: 01547812.4.0000.0068

Co-autores: Dra. Maria Notomi Sato, Dra. Raquel Leão Orfali, Vanessa Gonçalves dos Santos

Finalidade Acadêmica: Mestrado

Instituição: HCFMUSP

Departamento: DERMATOLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 9084

Número do Parecer: 42444

Data da Relatoria: 04/07/2012

Apresentação do Projeto: Trata-se de investigação clínica prospectiva, que será apresentada para conclusão de Mestrado.

Objetivo da Pesquisa: A metodologia estará centrada na avaliação in vitro de eosinófilos de sangue periférico de 30 doentes e 25 controles com o objetivo de, em linhas gerais, verificar o fenótipo e frequência destas células; verificar o grau de ativação dos eosinófilos frente à estimulação com enterotoxina estafilocócica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: O risco é mínimo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Nenhum

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: A linguagem está clara e acessível e, na introdução do texto, menciona-se a existência de controles. Assim, isto irá possibilitar que seja explicado ao voluntário em qual das condições o mesmo será incluído.

Recomendações: Nenhum

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Nenhuma. O estudo está bem desenhado.

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Aprovado

São Paulo, 12 de Junho de 2012

PROF. DR. ALFREDO JOSÉ MANSUR

Vice - Coordenador

Comissão de Ética para Análise de Projetos de
Pesquisa - CAPPesq

7.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐

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

ENDEREÇO: Nº: APTO:

BAIRRO: CIDADE:

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

2. RESPONSÁVEL LEGAL:

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

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐

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

ENDEREÇO: Nº: APTO:

BAIRRO: CIDADE:

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

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **“AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ENTEROTOXINA TIPO B DO *Staphylococcus aureus* NA SECREÇÃO DE METALOPROTEINASES E FATORES PR-INFLAMATÓRIOS POR EOSINÓFILOS NA DERMATITE ATÓPICA DO ADULTO”.**

PESQUISADOR: Dra. Valéria Aoki

CARGO/FUNÇÃO: Professor Doutor

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 60080

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Dermatologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 2 anos.

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

1 – Desenho do estudo e objetivo(s): O estudo tem como objetivo entender melhor a doença de pele chamada dermatite atópica, que é uma doença inflamatória crônica da pele. Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa analisar as células brancas do sangue periférico quanto à capacidade produção de fatores inflamatórios em pacientes com dermatite atópica e indivíduos não portadores da doença.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados: serão realizados exames laboratoriais para estudar os fatores de defesa do organismo mediados pelas células brancas do sangue. Os exames serão feitos no próprio Hospital das Clínicas sem nenhum custo para os participantes do estudo, que podem aproveitar o dia das consultas para realizar a coleta de das amostras de sangue. Os pacientes continuarão a ser acompanhados como sempre no ambulatório da dermatologia. Se houver a necessidade de mais algum exame, você poderá ser ainda convocado via telefone ou carta para vir a uma consulta, mesmo antes do seu retorno e terá todos os esclarecimentos e assistência que precisar. Todos os participantes do estudo terão acesso aos resultados de seus exames no momento em que quiserem e com as explicações necessárias para seu entendimento.

Os pacientes pode em qualquer momento não concordar em fazer os exames que serão pedidos.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados: será realizada coleta 50 mL (dez colheres de sopa) de sangue, por punção periférica da veia do antebraço.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3:

A picada da agulha pode levar a um leve desconforto que passará em poucos minutos. Um dia após pode se sentir em torno da picada uma mancha roxa que desaparece em poucos dias sem maiores problemas.

5 – Benefícios para o participante: Não há benefício direto para o participante, pois se trata de estudo que visa analisar as células brancas do sangue periférico quanto à capacidade secreção de fatores inflamatórios em pacientes com dermatite atópica e não portadores.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: Você não é obrigado a realizar estes procedimentos específicos se não quiser, o que não implica que sofrerá alguma penalidade. Mesmo que não concorde em participar do estudo, terá todos os benefícios de atendimento e de informações sobre novas descobertas com relação à doença.

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Valéria Aoki

que pode ser encontrada no endereço: Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, 5º. Andar, PAMB-Dermatologia CEP: 05403-000 Telefone (11) 2661-6398. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel.: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20. FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

9 – Direito de confidencialidade: As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa;

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa;

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Avaliação do efeito da enterotoxina tipo B do *staphylococcus aureus* na secreção de metaloproteinases e fatores pro-inflamatórios por eosinófilos na dermatite atópica do adulto”.

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

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____/____/____

Assinatura da testemunha

Data ____/____/____

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

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____

7.3 Tabelas Demográficas

Tabela 1: Dados demográficos dos indivíduos com Dermatite atópica

DA	Idade	Sexo	EASI	% Eosinófilos	% Linfócitos	% Neutrófilos	IgE UI/mL
1	37	Masculino	47,4	16,4	16,6	61	59900
2	20	Feminino	34,8	14	23,4	52,5	57400
3	24	Masculino	47,9	6,9	27,6	60,1	9500
4	21	Masculino	47,7	9,6	16,2	65,1	42900
5	48	Feminino	8,7	1,1	18	74	343
6	20	Masculino	11,2	7,6	22,7	61,9	4910
7	41	Feminino	8,6	8,5	13,5	72,2	4090
8	25	Feminino	31,2	9,2	23,4	61,8	13400
9	59	Masculino	35	21,1	23	41,6	11300
10	25	Masculino	55,7	8,4	20	61,2	nr
11	40	Masculino	38,2	9,2	33	47,6	7690
12	20	Masculino	31,5	15,8	20,1	52,2	5420
13	21	Masculino	34,4	4	10	76	29800
14	43	Masculino	18,1	6,8	26,7	57,4	2740
15	21	Masculino	24,7	36,1	32,8	21,9	26900
16	28	Masculino	34,4	6,6	18,6	60,4	5260
17	29	Masculino	40,2	8,7	31,8	53,1	16700
18	30	Masculino	48	6,6	35,2	44,9	18300
19	62	Feminino	45	26,1	13,6	53,7	53500
20	29	Feminino	45	19,4	18,4	51,3	59500
21	43	Feminino	33,5	5,7	22,5	62,7	2680
22	21	Feminino	2,2	3,2	12,9	79,1	3660
23	32	Feminino	15,5	2,7	25,3	67,3	nr
24	21	Masculino	38,5	5,1	29,2	52,4	8280
25	20	Masculino	22	5,9	22,7	63,4	4140
26	31	Masculino	11,2	14,2	28,9	47,2	4070
27	49	Masculino	48	15	11,7	59,7	130000
28	20	Masculino	25,9	4,1	18,4	51,3	nr
29	21	Masculino	22,1	24,2	24,4	44,2	58400
30	22	Feminino	25	6,6	17,1	75	14000
31	22	Feminino	10,3	7,8	27	57	26200
32	36	Feminino	10,1	6,4	30,8	56,6	8880
33	19	Masculino	24	11,2	9,8	69,7	6050
34	37	Masculino	21,9	nr	nr	nr	nr
35	39	Feminino	21,6	nr	nr	nr	nr
36	31	Feminino	12	6,9	30,9	60,1	9500
37	24	Feminino	50	nr	nr	nr	nr
38	21	Feminino	nr	13,1	12,8	67,2	1780
39	20	Masculino	nr	5,3	45,5	38,9	nr
40	20	Masculino	31,9	nr	nr	nr	nr
41	21	Masculino	nr	34,3	15,2	46,6	nr
30,57±1,87		25 M/16 F	29,30±2,33	11,18±1,36	22,42±1,31	57,52±1,91	22100±4899

EASI = *Eczema area and severity index*; % = Frequência; IgE = Imunoglobulina da classe E; nr = não realizado.

Tabela 2: Dados demográficos dos indivíduos controles

Controles	Idade	Sexo
1	32	Feminino
2	27	Feminino
3	25	Feminino
4	37	Feminino
5	46	Feminino
6	22	Feminino
7	30	Masculino
8	27	Masculino
9	24	Masculino
10	47	Masculino
11	53	Masculino
12	25	Feminino
13	26	Masculino
14	27	Masculino
15	28	Feminino
16	40	Feminino
17	36	Feminino
18	43	Feminino
19	22	Feminino
20	58	Feminino
21	56	Feminino
22	26	Feminino
23	24	Feminino
24	26	Feminino
25	25	Feminino
26	22	Feminino
27	30	Feminino
28	52	Feminino
29	51	Feminino
30	43	Feminino
31	20	Feminino
32	28	Feminino
33	19	Feminino
34	21	Feminino
35	29	Masculino
36	30	Masculino
37	31	Masculino
38	31	Masculino
39	33	Masculino
40	24	Masculino
41	29	Masculino
42	43	Masculino
43	24	Masculino
44	30	Masculino
45	29	Masculino
32,24±1,54		18M/27F

7.4 Índice de gravidade e área de eczema (EASI)

Nome: _____ RG: _____

EASI

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

Adultos:

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

Porcentagem de área envolvida par cada uma das 4 regiões:

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

Sinais:

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

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

Total:

Soma dos scores de gravidade x score da área x constante de cada região

7.5 Critérios diagnósticos da dermatite atópica (Hanifin & Rajka)

Nome: _____ RG: _____

Deve ter 3 ou mais características básicas:

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

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

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

8. REFERÊNCIAS

1. Hanifin JM, Rajka G. Diagnostic Features of Atopic-Dermatitis. *Acta Dermato-Venereologica*. 1980;44-7.
2. Leung DYM. New Insights into Atopic Dermatitis: Role of Skin Barrier and Immune Dysregulation. *Allergology International*. 2013;62(2):151-61.
3. Bieber T. Atopic dermatitis. *Ann Dermatol*. 2010;22(2):125-37.
4. Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA. New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest*. 2004;113(5):651-7.
5. Pugliarello S, Cozzi A, Gisondi P, Girolomoni G. Phenotypes of atopic dermatitis. *Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 2011;9(1):12-20.
6. Batista DI, Perez L, Orfali RL, Zaniboni MC, Samorano LP, Pereira NV, et al. Profile of skin barrier proteins (filaggrin, claudins 1 and 4) and Th1/Th2/Th17 cytokines in adults with atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014.
7. Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. Staphylococcal enterotoxins. *Toxins (Basel)*. 2010;2(8):2177-97.
8. Niebuhr M, Scharonow H, Gathmann M, Mamerow D, Werfel T. Staphylococcal exotoxins are strong inducers of IL-22: A potential role in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2010.
9. Gittler JK, Shemer A, Suarez-Farinas M, Fuentes-Duculan J, Gulewicz KJ, Wang CQ, et al. Progressive activation of T(H)2/T(H)22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(6):1344-54.
10. Nograles KE, Zaba LC, Shemer A, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Kikuchi T, et al. IL-22-producing "T22" T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing T(H)17 T cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2009;123(6):1244-52.
11. Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annual Review of Immunology*. 2006;24:147-74.
12. Lamouse-Smith ES, Furuta GT. Eosinophils in the gastrointestinal tract. *Curr Gastroenterol Rep*. 2006;8(5):390-5.
13. Rosenberg HF, Dyer KD, Foster PS. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13(1):9-22.
14. Kopf M, Brombacher F, Hodgkin PD, Ramsay AJ, Milbourne EA, Dai WJ, et al. IL-5-deficient mice have a developmental defect in CD5+ B-1 cells and lack eosinophilia but have normal antibody and cytotoxic T cell responses. *Immunity*. 1996;4(1):15-24.
15. Lloyd CM, Rankin SM. Chemokines in allergic airway disease. *Curr Opin Pharmacol*. 2003;3(4):443-8.
16. Rothenberg ME, MacLean JA, Pearlman E, Luster AD, Leder P. Targeted disruption of the chemokine eotaxin partially reduces antigen-induced tissue eosinophilia. *J Exp Med*. 1997;185(4):785-90.
17. Pope SM, Fulkerson PC, Blanchard C, Akei HS, Nikolaidis NM, Zimmermann N, et al. Identification of a cooperative mechanism involving interleukin-13 and eotaxin-2 in experimental allergic lung inflammation. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(14):13952-61.
18. Liu FT, Goodarzi H, Chen HY. IgE, Mast Cells, and Eosinophils in Atopic Dermatitis. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. 2011;41(3):298-310.

19. Bochner BS. Siglec-8 on human eosinophils and mast cells, and Siglec-F on murine eosinophils, are functionally related inhibitory receptors. *Clinical and Experimental Allergy*. 2009;39(3):317-24.
20. Crocker PR, Paulson JC, Varki A. Siglecs and their roles in the immune system. *Nature Reviews Immunology*. 2007;7(4):255-66.
21. Rosenwasser LJ, Meng JF. Anti-CD23. *Clin Rev Allerg Immu*. 2005;29(1):61-72.
22. Lantero S, Alessandri G, Spallarossa D, Scarso L, Rossi GA. Stimulation of eosinophil IgE low-affinity receptor leads to increased adhesion molecule expression and cell migration. *Eur Respir J*. 2000;16(5):940-6.
23. Ley K, Kansas GS. Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(5):325-35.
24. Orfali RL, Shimizu MM, Takaoka R, Zaniboni MC, Ishizaki AS, Costa AA, et al. Atopic dermatitis in adults: clinical and epidemiological considerations. *Rev Assoc Med Bras*. 2013;59(3):270-5.
25. Borres MP, Bjorksten B. Peripheral blood eosinophils and IL-4 in infancy in relation to the appearance of allergic disease during the first 6 years of life. *Pediatr Allergy Immu*. 2004;15(3):216-20.
26. Leiferman KM. A role for eosinophils in atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*. 2001;45(1 Suppl):S21-4.
27. Roth N, Städler S, Lemann M, Hösli S, Simon HU, Simon D. Distinct eosinophil cytokine expression patterns in skin diseases - the possible existence of functionally different eosinophil subpopulations. *Allergy*. 2011;66(11):1477-86.
28. Gueders MM, Foidart JM, Noel A, Cataldo DD. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the respiratory tract: Potential implications in asthma and other lung diseases. *Eur J Pharmacol*. 2006;533(1-3):133-44.
29. Gasson JC, Golde DW, Kaufman SE, Westbrook CA, Hewick RM, Kaufman RJ, et al. Molecular characterization and expression of the gene encoding human erythroid-potentiating activity. *Nature*. 1985;315(6022):768-71.
30. Docherty AJ, Lyons A, Smith BJ, Wright EM, Stephens PE, Harris TJ, et al. Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature*. 1985;318(6041):66-9.
31. Khokha R, Murthy A, Weiss A. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13(9):649-65.
32. Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Bba-Protein Struct M*. 2000;1477(1-2):267-83.
33. Bachmeier BE, Nerlich AG, Boukamp P, Lichtinghagen R, Tschesche H, Fritz H, et al. Human keratinocyte cell lines differ in the expression of the collagenolytic matrix metalloproteinases-1,-8, and -13 and of TIMP-1. *Biol Chem*. 2000;381(5-6):509-16.
34. Lu ZR, Park D, Lee KA, Ryu JW, Bhak J, Shi L, et al. Profiling the dysregulated genes of keratinocytes in atopic dermatitis patients: cDNA microarray and interactomic analyses. *J Dermatol Sci*. 2009;54(2):126-9.
35. Leung DY. Infection in atopic dermatitis. *Curr Opin Pediatr*. 2003;15(4):399-404.
36. Ong PY, Leung DY. The infectious aspects of atopic dermatitis. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2010;30(3):309-21.
37. Leung DY. Atopic dermatitis and the immune system: the role of superantigens and bacteria. *J Am Acad Dermatol*. 2001;45(1 Suppl):S13-6.

38. Boguniewicz M, Leung DY. Recent insights into atopic dermatitis and implications for management of infectious complications. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(1):4-13; quiz 4-5.
39. Lin YT, Shau WY, Wang LF, Yang YH, Hwang YW, Tsai MJ, et al. Comparison of serum specific IgE antibodies to staphylococcal enterotoxins between atopic children with and without atopic dermatitis. *Allergy*. 2000;55(7):641-6.
40. Macias ES, Pereira FA, Rietkerk W, Safai B. Superantigens in dermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2011;64(3):455-72.
41. Krakauer T. Update on staphylococcal superantigen-induced signaling pathways and therapeutic interventions. *Toxins (Basel)*. 2013;5(9):1629-54.
42. Zollner TM, Wichelhaus TA, Hartung A, Von Mallinckrodt C, Wagner TO, Brade V, et al. Colonization with superantigen-producing *Staphylococcus aureus* is associated with increased severity of atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy*. 2000;30(7):994-1000.
43. Campbell DE, Kemp AS. Proliferation and production of interferon-gamma (IFN-gamma) and IL-4 in response to *Staphylococcus aureus* and staphylococcal superantigen in childhood atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol*. 1997;107(2):392-7.
44. Wehner J, Neuber K. *Staphylococcus aureus* enterotoxins induce histamine and leukotriene release in patients with atopic eczema. *Br J Dermatol*. 2001;145(2):302-5.
45. Ganem MB, De Marzi MC, Fernandez-Lynch MJ, Jancic C, Vermeulen M, Geffner J, et al. Uptake and intracellular trafficking of superantigens in dendritic cells. *PLoS One*. 2013;8(6):e66244.
46. Mandron M, Aries MF, Brehm RD, Tranter HS, Acharya KR, Charveron M, et al. Human dendritic cells conditioned with *Staphylococcus aureus* enterotoxin B promote TH2 cell polarization. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(5):1141-7.
47. Uematsu S, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *J Mol Med (Berl)*. 2006;84(9):712-25.
48. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*. 2001;410(6832):1099-103.
49. Browne EP. Regulation of B-cell responses by Toll-like receptors. *Immunology*. 2012;136(4):370-9.
50. Kim YM, Brinkmann MM, Paquet ME, Ploegh HL. UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature*. 2008;452(7184):234-8.
51. Ermertcan AT, Ozturk F, Gunduz K. Toll-like receptors and skin. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2011;25(9):997-1006.
52. O'Neill LA. TAMpering with toll-like receptor signaling. *Cell*. 2007;131(6):1039-41.
53. Miller LS. Toll-like receptors in skin. *Adv Dermatol*. 2008;24:71-87.
54. Hanifin JM, Thurston M, Omoto M, Cherill R, Tofte SJ, Graeber M. The eczema area and severity index (EASI): assessment of reliability in atopic dermatitis. EASI Evaluator Group. *Exp Dermatol*. 2001;10(1):11-8.
55. Simon D, Braathen LR, Simon HU. Eosinophils and atopic dermatitis. *Allergy*. 2004;59(6):561-70.
56. Hossny E, Aboul-Magd M, Bakr S. Increased plasma eotaxin in atopic dermatitis and acute urticaria in infants and children. *Allergy*. 2001;56(10):996-1002.
57. Yawalkar N, Ugucioni M, Scharer J, Braunwalder J, Karlen S, Dewald B, et al. Enhanced expression of eotaxin and CCR3 in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*. 1999;113(1):43-8.

58. Wegmann M. Targeting Eosinophil Biology in Asthma Therapy. *Am J Resp Cell Mol.* 2011;45(4):667-74.
59. Park CW, Lee BH, Han HJ, Lee CH, Ahn HK. Tacrolimus decreases the expression of eotaxin, CCR3, RANTES and interleukin-5 in atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 2005;152(6):1173-81.
60. Gaspar K, Kukova G, Bunemann E, Buhren BA, Sonkoly E, Szollosi AG, et al. The chemokine receptor CCR3 participates in tissue remodeling during atopic skin inflammation. *J Dermatol Sci.* 2013;71(1):12-21.
61. Puccetti A, Bason C, Simeoni S, Millo E, Tinazzi E, Beri R, et al. In chronic idiopathic urticaria autoantibodies against Fc epsilonR2/CD23 induce histamine release via eosinophil activation. *Clin Exp Allergy.* 2005;35(12):1599-607.
62. Inaoki M, Sato S, Takehara K. Elevated expression of CD23 on peripheral blood B lymphocytes from patients with bullous pemphigoid: correlation with increased serum IgE. *J Dermatol Sci.* 2004;35(1):53-9.
63. Seneviratne SL, Black AP, Jones L, Bailey AS, Ogg GS. The role of skin-homing T cells in extrinsic atopic dermatitis. *QJM.* 2007;100(1):19-27.
64. Llera AS, Viedma F, Sanchez-Madrid F, Tormo J. Crystal structure of the C-type lectin-like domain from the human hematopoietic cell receptor CD69. *J Biol Chem.* 2001;276(10):7312-9.
65. Toma T, Mizuno K, Okamoto H, Kanegane C, Ohta K, Ikawa Y, et al. Expansion of activated eosinophils in infants with severe atopic dermatitis. *Pediatr Int.* 2005;47(1):32-8.
66. Bochner BS. Systemic activation of basophils and eosinophils: markers and consequences. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106(5 Suppl):S292-302.
67. Yazawa N, Kikuchi K, Ihn H, Fujimoto M, Kubo M, Tamaki T, et al. Serum levels of tissue inhibitor of metalloproteinases 2 in patients with systemic sclerosis. *J Am Acad Dermatol.* 2000;42(1 Pt 1):70-5.
68. Katoh N, Hirano S, Suehiro M, Ikenaga K, Yasuno H. Increased levels of serum tissue inhibitor of metalloproteinase-1 but not metalloproteinase-3 in atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol.* 2002;127(2):283-8.
69. Devillers AC, van Toorenbergen AW, Klein Heerenbrink GJ, Muldert PG, Oranje AP. Elevated levels of plasma matrix metalloproteinase-9 in patients with atopic dermatitis: a pilot study. *Clin Exp Dermatol.* 2007;32(3):311-3.
70. Kessel A, Bishara R, Amital A, Bamberger E, Sabo E, Grushko G, et al. Increased plasma levels of matrix metalloproteinase-9 are associated with the severity of chronic urticaria. *Clinical and Experimental Allergy.* 2005;35(2):221-5.
71. Oyamada H, Kamada Y, Saito N, Tsuda A, Urayama O, Yamada H, et al. RANTES production from mononuclear cells in response to the specific allergen in asthma patients. *Allergol Int.* 2006;55(3):253-9.