

Vanessa Gonçalves dos Santos

**Avaliação fenotípica e funcional de células dendríticas
inflamatórias na dermatite atópica do adulto**

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

Programa de Dermatologia

Orientadora: Prof. Dra. Valéria Aoki

São Paulo

2015

Vanessa Gonçalves dos Santos

**Avaliação fenotípica e funcional de células dendríticas
inflamatórias na dermatite atópica do adulto**

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

Programa de Dermatologia

Orientadora: Prof. Dra. Valéria Aoki

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Santos, Vanessa Gonçalves dos

Avaliação fenotípica e funcional de células dendríticas inflamatórias na
dermatite atópica do adulto / Vanessa Gonçalves dos Santos. -- São Paulo, 2015.

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

Orientador: Valéria Aoki.

Descritores: 1.Dermatite atópica 2.Células dendríticas 3.Receptores toll-like
4.Dermatopatias 5.Fenótipo 6.Citometria de fluxo

USP/FM/DBD-475/15

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Valéria Aoki pela orientação e pelos ensinamentos durante todo o desenvolvimento desse trabalho;

À Prof^a. Dr^a. Maria Notomi Sato pela coorientação, pelo espaço cedido e ensinamentos durante todo o desenvolvimento do projeto;

Ao grupo Dermatite Atópica, Dr^a Raquel Leão Orfali e Tiago de Oliveira Titz (kiwi) pela amizade e ajuda e aos residentes de Dermatologia pela ajuda em coleta e facilitando o dia a dia no ambulatório;

Aos meus pais Marilene Pires Gonçalves e Antonio Carlos Evangelho dos Santos por serem a base e a razão para tudo, sempre acreditando, incentivando e educando com todo amor e carinho por toda minha vida;

À minha irmã Fernanda Gonçalves dos Santos pela amizade acima de todas as coisas, palavras de carinho e companherismo em todos os momentos;

Às minhas avós Alice Pereira Gomes e Alzira Evangelho dos Santos e aos meus avós Leonardo Pires Gonçalves Junior e Affonso Martins dos Santos (em memória) pelo carinho, dedicação e constantes ensinamentos;

Ao Ralph e ao Lucky, pela eterna e verdadeira amizade, proporcionando os melhores momentos da minha vida;

Aos amigos e amigas da experimental que tornavam os dias mais prazerosos: Camila (Low), Luanda (Mara maravilha), Rosana (Ruby), Cesar (Cezinha), Kelly (Kelly Cris), Gabrielle (Japonega), Juliana (Bezenga), Josenilson (News), Jefferson (Jeff), Gabriel (Cocó), Luana (Lu), Anna (Aninha), Marília (Má), Cyro, Natalli (Nat), Marina;

Às amigas de uma vida, Leticia (Lele), Mariana (Mari), Marina (Má), Natália Mathis (Matão) e Natália Sayão (Sayão), pelas conversas, risadas e cajú;

Ao Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte, pela infraestrutura do LIM-56;

Aos funcionários da secretaria e da limpeza do LIM-56; Aos funcionários do setor de citometria: Noemia, Rosangela e Patrícia;

À Faculdade de Medicina da USP em especial o Departamento de Dermatologia;

Aos pacientes que gentilmente aceitaram participar desse estudo;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento;

À FAPESP, por fomentar esse projeto científico.

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

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

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

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

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

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

EPÍGRAFE

“A ciência é uma disposição de aceitar os fatos mesmo quando eles são opostos aos desejos”. (Burrhus Frederic Skinner)

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas
Lista de símbolos
Lista de Figuras
Lista de Quadros
Lista de Anexos
Resumo
Abstract

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Dermatite atópica	1
1.2 Resposta imune na DA	2
1.2.1 Barreira Cutânea, Imunidade Inata e DA	2
1.2.2 Imunidade Adaptativa	3
1.2.3 Células dendríticas e DA	6
1.3 Papel do <i>Staphylococcus aureus</i> na DA	10
2. OBJETIVOS	15
2.1 GERAL:	15
2.2 ESPECÍFICOS:	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Seleção dos sujeitos da pesquisa	17
3.1.1 Critérios de inclusão de pacientes com DA	17
3.1.2 Critérios de exclusão de pacientes com DA	18
3.2 Obtenção de PBMC do sangue periférico	18
3.3 Caracterização fenotípica e funcional das mDC por citometria de fluxo multiparamétrica	18
3.4 Análise estatística	20
4. RESULTADOS	23
4.1 Avaliação funcional das mDC através da produção de citocinas por citometria de fluxo	23
4.2 Avaliação da expressão de mDC IFN- γ^+ IL-10 $^+$ e IFN- γ^+ TNF $^+$ em PBMC por citometria de fluxo	25

4.3 Avaliação da expressão de CD36, FcεRI e mDC CD36 ⁺ FcεRI ⁺ em PBMC por citometria de fluxo	27
4.4 Avaliação funcional das mDC CD36 ⁺ FcεRI ⁺ em PBMC (IDEC- <i>like</i>) através da produção de citocinas por citometria de fluxo	29
5. DISCUSSÃO	34
6. CONCLUSÃO	40
7. ANEXOS	42
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

APC – Células apresentadoras de antígenos (*Antigen-presenting cells*)

BC – Barreira cutânea

LC – Células de Langerhans (*Langerhans Cell*)

PBMC – Células mononucleares do sangue periférico (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*)

DA – Dermatite atópica

DC – Células dendríticas (*Dendritic cell*)

EC – Estrato córneo

ECP – Proteína catiônica do eosinófilo (*Eosinophil Cationic Protein*)

FcεRI – Receptor de alta afinidade por IgE (*High-affinity IgE Receptor*)

IDEC – Células dendríticas inflamatórias (*Inflammatory Dendritic Epidermal Cell*)

IFN-γ – Interferon gama

IgE – Imunoglobulina E

mDC – Células dendríticas mieloides (*Myeloid Dendritic Cell*)

MHC – *Major histocompatibility complex*

MoDC – Células dendríticas derivadas de monócito (*Monocyte-derived Dendritic Cell*)

PAMPs – Padrões moleculares associados à patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns*)

PBS – *Phosphate buffered saline*

pDC – Células dendríticas plasmacitoide (*Plasmacytoid Dendritic Cell*)

pH – Potencial hidrogeniônico

SEB – Enterotoxina estafilocócica tipo B (*Staphylococcal enterotoxin B*)

Th1 – *T helper 1*

Th2 – *T helper 2*

TLR – *Toll like receptor*

TSST-1 – Toxina da síndrome do choque tóxico (*Toxic shock syndrome toxin*)

TNF – Fator de necrose tumoral (*Tumor Necrosis Factor*)

LT – Linfócito T (*T lymphocytes*)

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
↓	Diminuição
↑	Aumento
μg	Micrograma
μL	Microlitro
=	Igual a
≤	Menor ou igual
°C	Graus Celsius
mL	Mililitro
n	Tamanho da amostra
+	Positivo
g	Unidade gravitacional

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração esquemática da fase inicial e progressão para fase crônica da dermatite atópica_____32

Figura 2 – Distribuição das principais células dendríticas humanas no sangue, tecidos epiteliais e linfonodos_____35

Figura 3 – Frequência de IFN- γ , IL-10 e TNF nas mDC em PBMC_____52

Figura 4 – Frequência da expressão de mDC IFN- γ^+ IL-10 $^+$ e IFN- γ^+ TNF $^+$ em PBMC_____54

Figura 5 – Frequência da expressão de CD83, CD36, Fc ϵ RI e mDC CD36 $^+$ Fc ϵ RI $^+$ em PBMC_____56

Figura 6 – Frequência de IFN- γ , IL-10 e TNF em mDC CD36 $^+$, Fc ϵ RI $^+$ e IDEC-*like*_____58

LISTA DE QUADROS

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Estímulos utilizados na caracterização fenotípica e funcional das mDC por citometria de fluxo _____ 49

Quadro 2 – Achados referentes à produção de citocinas em mDC _____ 53

Quadro 3 – Achados referentes à produção de citocinas em mDC IFN- γ ⁺IL-10⁺ e IFN- γ ⁺TNF⁺ (PBMC) _____ 55

Quadro 4 – Expressão de mDC CD83⁺, CD36⁺ e Fc ϵ RI⁺ e de IDEC-*like* _____ 57

Quadro 5 – Achados referentes à produção de citocinas em mDC CD36⁺, Fc ϵ RI⁺ e IDEC-*like* _____ 60

LISTA DE ANEXOS

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 – Aprovação da comissão de ética e para análise de projetos de pesquisa (CAPPesq)	70
Anexo 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido	71
Anexo 3 – Quadro demográfico dos indivíduos participantes do estudo	74
Anexo 4 – Critérios diagnósticos da dermatite atópica	75
Anexo 5 – Escore de gravidade – EASI	76

RESUMO

RESUMO

SANTOS VG. *Avaliação fenotípica e funcional de células dendríticas inflamatórias na dermatite atópica do adulto* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015. 80p.

Introdução: A dermatite atópica (DA) é uma enfermidade cutânea inflamatória de caráter crônico, na qual o prurido é constante, e com marcada xerose. Dermatose que geralmente se inicia na infância, e pode surgir em indivíduos com história pessoal ou familiar de asma, rinite alérgica e/ou DA. A pele com DA apresenta colonização por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) em 80-100% dos casos, sendo responsável pela produção enterotoxinas, capazes de exacerbar a resposta inflamatória na DA. Nesta enfermidade, existem distintos subtipos de células apresentadoras de antígeno ou dendríticas (DC), tanto na pele quanto circulantes. As DC exercem papel relevante na inflamação da DA, em especial um subgrupo de células dendríticas mieloides (mDC), as chamadas células dendríticas inflamatórias epidérmicas (IDEC). **Objetivo:** Avaliar o fenótipo e a função das mDC (IDEC-like) em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) na DA do adulto. **Métodos:** Foram selecionados 21 pacientes com DA (idades entre 18 e 65 anos, sendo 13 homens e oito mulheres) e 21 controles (idades entre 21 e 41 anos, sendo oito homens e 13 mulheres), nos quais foram realizadas as avaliações fenotípica e funcional das mDC (IDEC-like) em PBMC. Para tal, foram analisadas as expressões de: FcεRI, TNF, IFN-γ, IL-10, CD36 e CD83 nas mDC, estimuladas com enterotoxina estafilocócica B (SEB), agonistas de TLR2 (Pam3CSK4), TLR4 (LPS) e de TLR7/8 (CL097) através da citometria de fluxo. **Resultados:** Os principais achados nos pacientes com DA foram: aumento da frequência de células IDEC-like frente ao estímulo com agonista de TLR2 (Pam3CSK4); aumento da frequência de IFN-γ em condição não estimulada, e de IL-10 frente a estímulo com agonista de TLR7/8 (CL097) nesta população de células dendríticas. **Conclusão:** A caracterização das mDC circulantes na DA evidencia perfil pró-inflamatório em condição não estimulada, impactando na resposta imune adaptativa. O aumento significativo na frequência de células IDEC-like nos pacientes com DA sugere sua participação na perpetuação do processo inflamatório da DA.

Descritores: Dermatite atópica; células dendríticas; receptores *Toll-like*; dermatopatias; fenótipo; citometria de fluxo.

ABSTRACT

ABSTRACT

SANTOS VG. *Phenotypical and functional evaluation of inflammatory dendritic cells in atopic dermatitis of adults* [Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

Introduction: Atopic dermatitis (AD) is an inflammatory skin disease with a chronic course, with constant pruritus and marked xerosis. It usually starts during childhood, and a personal or familial history of skin and/or respiratory allergy may be present. Around 80-100% of the patients show a cutaneous colonization of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), which produces enterotoxins that may exacerbate the inflammatory response in AD. In this disease, there are distinct subtypes of antigen-presenting cells or dendritic cells (DC), either circulating or present in the affected tissue. DC exert a relevant role in AD inflammation, especially a subgroup of myeloid cells (mDC), known as epidermal inflammatory dendritic cells (IDEC). **Objective:** To evaluate the phenotype and function of mDC (IDEC-like) in mononuclear cells of the peripheral blood (PBMC) of adults with AD. **Methods:** Twenty-one adults with AD (age 18/65; male/female: 13/8) and 21 healthy controls (age 21/41; male/female: 8/13) were selected for the current study. Phenotypical and functional analysis of mDC (IDEC-like) of PBMC were performed, through the expression of FcεRI, TNF, IFN-γ, IL-10, CD36 and CD83 in mDC, stimulated with enterotoxin B (SEB) and with agonists of TLR2 (Pam3CSK4), TLR4 (LPS) and TLR7/8 (CL097) by flow cytometry. **Results:** Main findings of AD patients included: elevation of IDEC-like cell frequency with TLR2 (Pam3CSK4) agonist, augmented unstimulated frequency of IFN-γ, and of IL-10 with TLR7/8 (CL097) agonist of this population of dendritic cells. **Conclusion:** Characterization of circulating mDC on AD shows proinflammatory profile in unstimulated conditions, therefore causing impact on the adaptive immune response. The significant increase in the frequency of IDEC-like cells in AD patients suggest a role in the maintenance of inflammation in AD.

Keywords: Atopic dermatitis, Dendritic cells, toll-like receptors; skin diseases; phenotype; flow cytometry.

1 INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Dermatite atópica

Dermatite atópica (DA) é uma enfermidade cutânea inflamatória de caráter crônico, recidivante, na qual o prurido e a xerose 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) e o estresse (2). Existem também alterações da função da barreira cutânea e do sistema imune, além de infecções, principalmente por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (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 (4).

Elevados níveis séricos de imunoglobulinas da classe E (IgE) surgem em 55 a 90% dos indivíduos com DA e representam a forma extrínseca ou alérgica da doença, e nestes casos, a hiper-reatividade em testes cutâneos contra antígenos pode ser detectada. Nesta forma, ocorre ainda o aumento citocinas do padrão Th2, como interleucina (IL)-4, IL-5 e IL-13, de eosinófilos e da proteína catiônica

do eosinófilo (ECP) no soro (5). Em contrapartida, a forma não alérgica e não associada ao aumento de IgE sérica é denominada forma intrínseca ou não atópica (10 a 45% dos doentes); é possível que nesta forma, os doentes apresentem IgE ou células T autorreativas para antígenos microbianos não rotineiramente avaliados (2).

1.2 Resposta imune na DA

1.2.1 Barreira Cutânea, Imunidade Inata e DA

A barreira cutânea (BC) representa o primeiro obstáculo contra as agressões do meio externo, e é representada pelo estrato córneo (EC). O EC consiste não apenas em barreira física, como também representa estrutura metabolicamente ativa, interagindo com as camadas subjacentes da epiderme. Na DA, as alterações na BC se traduzem por: perda de água transepidérmica (*transepidermal water loss* ou TEWL), defeitos no metabolismo da pró-filagrina, uma das proteínas essenciais do EC, redução de ceramidas (1 e 3), menor expressão de claudina 1 (localizada nas *tight junctions*) e consequente predisposição às infecções e inflamação (6).

Com relação à imunidade inata, sabe-se que os queratinócitos e as células apresentadoras de antígenos (APC) na pele expressam receptores de reconhecimento de padrão molecular associados a patógenos, os *toll-like*

receptors (TLR). Quando estimulados por microrganismos ou injúrias teciduais, estes receptores induzem a liberação de peptídeos antimicrobianos, citocinas e quimiocinas. Dentre eles, destacamos três peptídeos antimicrobianos humanos: β -defensinas 2 e 3 e catelicidina (LL-37). A β -defensina 2 é efetiva no combate a microrganismos gram-negativos como *Escherichia coli*, *Pseudomas aeruginosa* e leveduras. A β -defensina 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 TLR e falha nesse processo de proteção, bem como nos peptídeos antimicrobianos, promovendo uma predisposição maior às infecções cutâneas, principalmente pela bactéria *S. aureus* (8).

1.2.2 Imunidade Adaptativa

Na imunidade adaptativa, durante a fase aguda da DA, ocorre um aumento da produção de citocinas do padrão Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) e citocinas do padrão Th22, principalmente IL-22. Estas citocinas reduzem a diferenciação de células da epiderme e podem contribuir para a redução de filagrina, como também de peptídeos antimicrobianos (9).

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 (IDEC), macrófagos e eosinófilos, como também, a produção de IL-12 por esses tipos celulares, gerando um aumento da produção de interferon-gama (IFN- γ), o qual é capaz de induzir a apoptose em queratinócitos (Figura 1) (2).

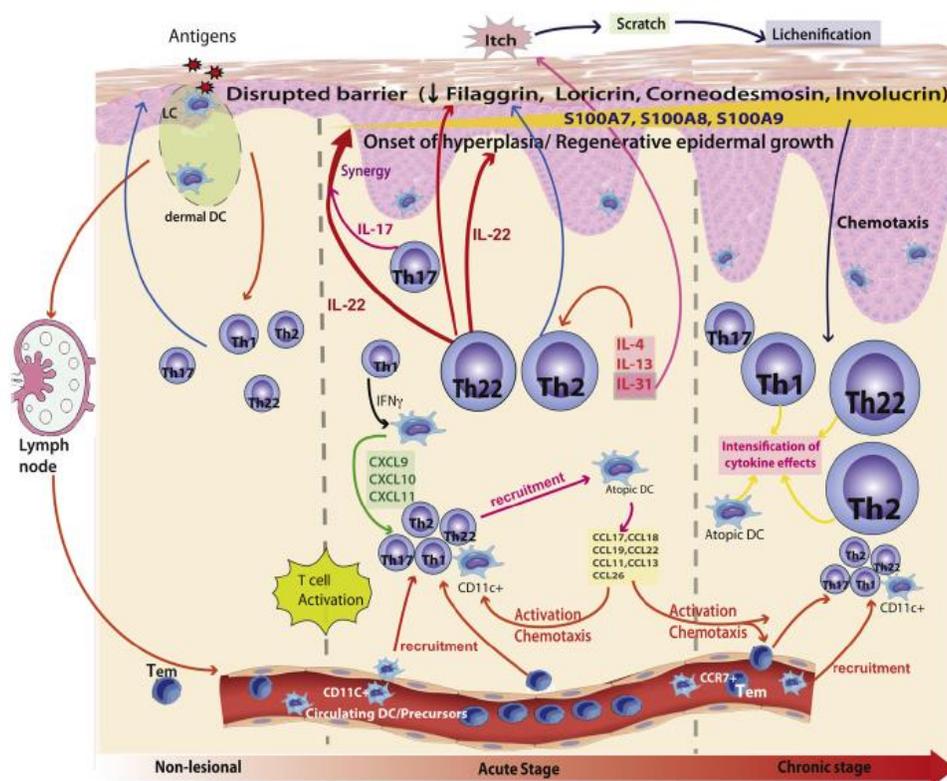


Figura 1: Ilustração esquemática da fase inicial e progressão para fase crônica da DA. Extraído de Gittler *et al.* (2012) (10). As lesões de pele de pacientes com DA apresentam importante infiltrado inflamatório, que se soma à barreira epidérmica defeituosa. Defeitos de barreira levam à entrada de antígenos, processados por células de Langerhans (epiderme) e por células dendríticas (derme), induzindo à ativação imune e recrutamento de células inflamatórias. Na fase aguda da DA, ocorre ativação importante do perfil Th2 e Th22, com menor participação do eixo Th1 e Th17. A produção de citocinas IL-4 e IL-13, e quimiocinas (CCL17,18, e 19, e CXCL9, 10 e 11) por LT e DC induzem à ativação e recrutamento de células imunes adicionais. Ressalta-se, ainda na fase aguda a produção elevada de IL31, mediador importante do prurido na DA. A ativação progressiva da resposta inflamatória de perfil Th1, e progressão da ativação do

eixo Th2 e Th22 é característica da fase crônica da DA. A produção de citocinas, especialmente de IL22, impacta nas proteínas de diferenciação terminal.

A subpopulação de células T CD4⁺ secretoras de IL-17 (Th17) também está presente tanto na fase aguda, quanto na fase crônica da doença. Estas células estão envolvidas na proteção contra patógenos bacterianos, como também podem ser cruciais na patogênese de várias doenças cutâneas inflamatórias crônicas (11).

A DA é uma dermatose inflamatórias com perfil de resposta celular de padrão Th1 /Th2. Recentemente, foram descritos novos subtipos celulares, como o Th17, produtores de IL-17 e IL-22 (12).

A IL-22 por sua vez, está envolvida na modulação da resposta cutânea inflamatória, induzindo a proliferação de queratinócitos e hiperplasia epidérmica. É capaz ainda de inibir a diferenciação terminal de queratinócitos e promover a produção de proteínas antimicrobianas. É também citada a produção de IL-22 pelas células Th22, de forma independente de IL-17 e IFN- γ ; e possuem papel relevante na homeostase da pele e patogênese de dermatoses inflamatórias (13). Estas células expressam concomitantemente CCR6 e receptores de *homing* para pele CCR4 e CCR10, produzindo níveis elevados de IL-22 (14).

1.2.3 Células dendríticas e DA

As células dendríticas (DC) fazem parte do grupo das APC, e, juntamente com os macrófagos e as células B, são capazes de ativar ambas as respostas imunológicas contra patógenos: a inata e a adaptativa. As DC são responsáveis pela fagocitose, processamento e apresentação de antígenos às células T (15, 16).

As DC, além de captar e processar os antígenos, e apresentá-los às células T, produzem e secretam citocinas, que por sua vez, levam à ativação e proliferação das células T *naive*, cuja resposta é dependente do microambiente. Além de induzir a ativação e proliferação de células T *naive*, elas são capazes de regular as respostas imunes, induzindo a diferenciação de células T e sua polarização (17).

As DC sinalizam as células T, que, dependendo do seu estado de diferenciação ou maturação, podem levar à supressão da resposta das células T reguladoras. As DC regulam, assim, a imunidade, e estão posicionadas como sentinelas na periferia, onde frequentemente entram em contato com antígenos, migrando rapidamente para os órgãos linfoides secundários, especialmente para os gânglios linfáticos, onde ocorre o encontro deste antígeno com as células T de memória efetora e/ou central (17).

Existem dois subtipos de DC, classificadas de acordo com suas características fenotípicas: as células dendríticas mieloides (mDC) e as células

dendríticas plasmacitoides (pDC). As mDC são de origem mieloide, possuem o fenótipo $CD11c^+/CD123^-$, secretam, além de IL-12, variedade de citocinas e quimiocinas em resposta aos patógenos associados padrões moleculares (PAMP); as pDC, por sua vez, são de origem linfóide, e possuem o fenótipo $CD123^+/CD11c^-$ (Figura 2) (18-20).

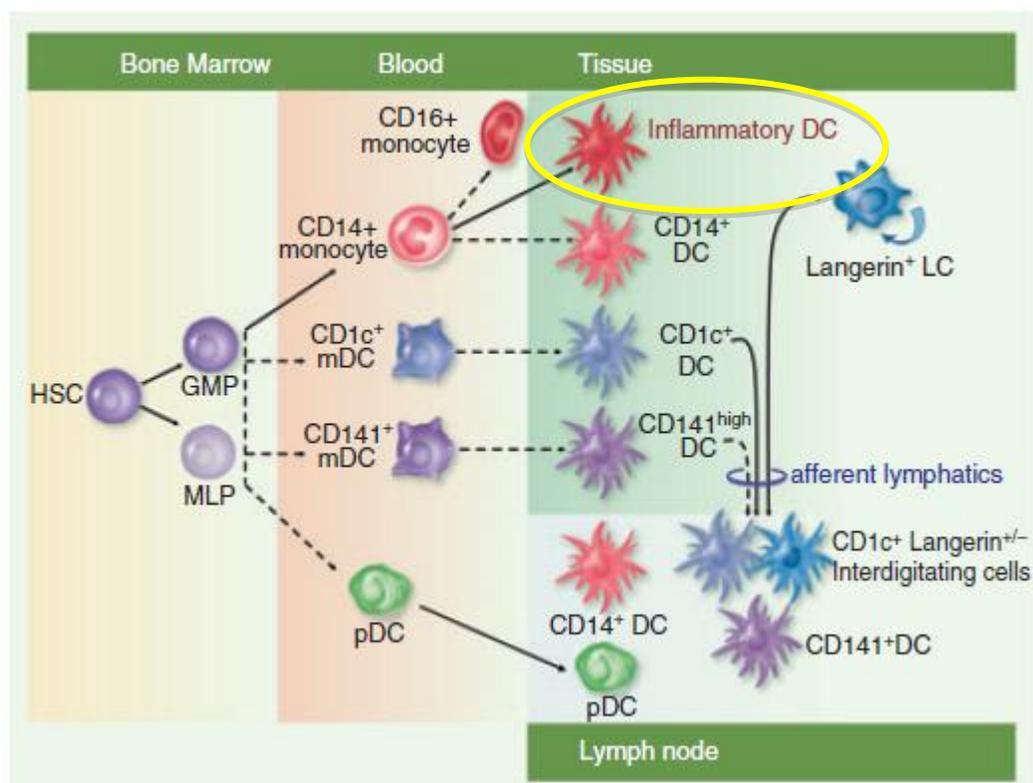


Figura 2: Distribuição das principais células dendríticas humanas (DC) no sangue, tecidos epiteliais e linfonodos. Adaptado de Collin *et al.* (2013) (20).

As mDC têm o papel de iniciar e modular a resposta imunológica (21) no estado imaturo, captar e apresentar antígenos próprios, promovendo, assim, tolerância periférica (22). Há dois subtipos funcionais de mDC: as que apresentam o potencial de secretar citocinas do perfil Th1 e as que o fazem com relação ao

perfil Th2. As mDC Th1 (DC1) podem ser geradas por culturas de monócitos, em presença de fator estimulador de crescimento de colônia de macrófago-granulócito (GM-CSF) e IL-4, e recebem o nome de células dendríticas derivadas de monócito (MoDC); as mDC Th2 (DC2), por sua vez, podem ser geradas por cultivo na presença de IL-3 e IL-4 (22, 23).

As mDC imaturas são recrutadas para o sangue circulante a partir dos órgãos linfoides periféricos, e apresentam função de processamento antigênico (21). Nesta fase, as mDC possuem baixa expressão de moléculas coestimuladoras como CD40, CD80, CD83 e HLA. Entretanto, ao entrarem em contato com o antígeno, sofrem modificações morfológicas, fenotípicas e funcionais, tais como um aumento na expressão de HLA (responsável por apresentar o peptídeo) no microambiente inflamatório. Estas modificações podem ser desencadeadas através das vias de sinalização de TLR ou via MHC e moléculas coestimuladoras. Ocorre, então, migração destas células em direção aos órgãos linfoides secundários, onde apresentam o antígeno para as células T *naive*, gerando células T efetoras que iniciam a resposta adaptativa (23, 24).

A função mais importante dos TLR é a indução da inflamação, maturação de células dendríticas e desenvolvimento de defesa pela ativação de células Th1 ou Th17. Já foi demonstrado que o defeito nos sinais de TLR2 (Pam3CSK4) e TLR4 (LPS) pode induzir resposta de perfil Th2, levando ao desencadeamento da DA (25). Ainda, estudos recentes evidenciam que a função das mDC pode ser

amplificada através da ativação de indução de TLR7/8 (CL097) das DC imaturas (21, 26).

Na pele inflamada com DA existem dois tipos de DC: as LC características, que apresentam grânulos de *Birbeck*, e as células dendríticas inflamatórias epidérmicas (IDEC), que se caracterizam por serem CD1a⁺, receptor de manose (MMR) / CD206⁺, CD11c⁺, HLA-DR⁺, CD36⁺, FcεRI^{high+}, IgE⁺, CD1b/c⁺⁺, CD11b⁺, CD209 / DC-SIGN⁺ e LIN⁻ (22, 27, 28).

As IDEC definidas com esta gama de marcadores encontram-se na derme em lesões da DA, e são denominadas DCs mieloides inflamatórias. Como expressam FcεRI, podem responder a alérgenos específicos (28).

A pele lesionada de pacientes com DA, eczema de contato alérgico ou psoríase, possuem níveis elevados de DC, particularmente DC expressando CD11c⁺ e CD1a⁺. As pDC, ao contrário da psoríase, parecem não ter papel importante na patogénia da DA, uma vez que estão ausentes tanto na pele lesionada, quanto sem lesão aparente desta doença (29). Na DA, tanto as LC quanto as IDEC (mDC que expressam o receptor de alta afinidade para IgE (FcεRI) e CD36), parecem ter papel bastante relevante na patogénia da doença, levando a uma resposta mediada por IgE (27).

Durante a fase aguda da DA, as LC capturam antígenos, ativam o receptor de IgE FcεRI, que se torna ativado, levando à secreção de CCL2/MCP-1, IL-6 e CXCL8. Este processo induz ainda atração para monócitos, eosinófilos, e células

T. Além disso, as CL resultam em uma polarização para o eixo celular tipo Th2 e produção de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13. Já na fase subaguda e crônica, onde ocorre polarização para o eixo Th1, ocorre infiltração na pele pelas IDEC que parecem ser responsáveis pela manutenção da cronicidade da DA (20, 29).

As IDEC têm sido mostradas com a capacidade de se infiltrar na epiderme em pacientes com DA e com psoríase. Em pacientes com DA, o FcεRI é expresso na superfície das CL e das IDEC, aumentando a eficiência de absorção de antígeno através de captura de antígeno dependente de IgE, levando aos sintomas exacerbados em pacientes com DA (30).

In vitro, as células estimuladas IDEC-like, em ligação cruzada com IgE, produzem CCL3, IL-1, IL-8, MIP-1 α , IL -16, e citocinas pró-inflamatórias IL-12p70 e IL-18. Além disso, em contraste com CLs que induzem uma resposta Th2 *in vitro*, as células IDEC-like promovem a polarização Th1 e produção de IFN- γ . Assim, o estímulo de DC por estes alérgenos via FcεRI pode ser responsável pela fase de manutenção crônica da DA, em que existe um perfil de citocinas Th1 mais pronunciado. As IDEC promovem a endocitose dos antígenos na presença de manose, e conseqüente aumento na expressão de FcεRI (22, 27-29).

1.3 Papel do Staphylococcus aureus na DA

Uma condição que merece destaque nos indivíduos com DA, é a colonização na pele pelo *S. aureus* em 80 a 100% dos doentes, o que geralmente é correlacionado com o grau de inflamação da pele, em contraste com indivíduos

normais que apresentam índices de colonização pela bactéria de 5 a 30%, principalmente em áreas intertriginosas (31).

O mecanismo pelo qual essa bactéria causa exacerbação no quadro de DA é controverso. Admite-se que ele pode aumentar a sua colonização por injúria direta na pele (prurido, variação do pH da pele), ou pela liberação de enterotoxinas que funcionam como superantígenos, induzindo a ativação policlonal de células T (32, 33). O modo pelo qual essa bactéria interfere com a produção de certas citocinas inflamatórias continua incerto.

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 localizados 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* penetra por entre os espaços intercelulares da epiderme, sugerem que os lipídios da superfície da pele estão deteriorados nos pacientes com DA (34, 35).

O *S. aureus* é uma bactéria Gram-positiva presente em um terço da população e podem estar associadas a diversas doenças, que incluem a intoxicação alimentar e a síndrome do choque tóxico, ambas causadas por suas enterotoxinas (7). O *S. aureus* secreta várias enterotoxinas (A, B, C, dentre

outras), e a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) que podem atuar como superantígenos, estimulando de forma policlonal linfócitos T e macrófagos, sem a interferência do sistema MHC (complexo principal de histocompatibilidade) (36, 37). O superantígeno interage diretamente com porções constantes da cadeia $V\beta$ do receptor de linfócitos T.

Outro mecanismo de ação do *S. aureus* seria a geração de anticorpos IgE específicos contra as exotoxinas, ou seja, os superantígenos poderiam atuar como alérgenos, uma vez que 57% dos doentes de DA apresentam IgE dirigida contra SEA, SEB e TSST-1. Estudos mostram que existe correlação entre gravidade da DA e a presença de anticorpos IgE contra estes superantígenos, o que pode significar: 1) que os superantígenos têm um importante papel na patogênese da DA; 2) que eles são também processados como antígenos (38).

A toxicidade dos superantígenos bacterianos é mediada por potente atividade estimuladora da célula T, gerando altos níveis de citocinas, tais como: TNF (fator de necrose tumoral), IL-1, IL-2, IL-6 e IFN- γ . Estas citocinas podem induzir anergia, inflamação, citotoxicidade, deleção de células T e autoimunidade (39).

Outros mecanismos do *S. aureus* envolvidos na resposta inflamatória da DA incluem: influência sobre as APC e eosinófilos, modulando a resposta de antígenos de superfície celulares; liberação de toxinas (α -toxinas), que levam ao dano citotóxico em queratinócitos, e estimulam a liberação de TNF- α ; aumento da síntese de IgE e expressão de CD23 *in vitro*, ocasionados por componentes da

parede bacteriana, como o ácido teicóico ou peptidoglicanas (34, 40, 41). Na literatura encontramos relatos onde a enterotoxina tipo B do *S. aureus* (SEB) é capaz de induzir a maturação das mDC (26). Além da interação direta do patógeno com as DC, as toxinas produzidas por bactérias podem constituir um fator desencadeante no processo inflamatório, devido à sua capacidade de atravessar as barreiras fisiológicas da pele (16).

2 OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL:

Avaliar o fenótipo e a função das células dendríticas inflamatórias no sangue periférico de pacientes adultos com dermatite atópica.

2.2 ESPECÍFICOS:

- Analisar *in vitro* a ativação das células dendríticas mieloides (mDC), estimuladas com toxina estafilocócica B (SEB) e agonistas de TLR2 (Pam3CSK4), TLR4 (LPS), TLR7/8 (CL097), quanto à expressão de marcadores de ativação celular e à secreção de citocinas (TNF, IFN- γ e IL-10);
- Analisar as IDEC-*like* em sangue periférico, caracterizando seu perfil fenotípico, através da expressão de CD36 e Fc ϵ RI, e funcional, através da produção de citocinas (TNF, IFN- γ e IL-10).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Seleção dos sujeitos da pesquisa

Foram selecionados 21 pacientes, com DA, do ambulatório especializado de dermatite atópica do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), com idade entre 18 e 61 anos (média de idade = 32,33), sendo 8 mulheres e 13 homens (Os dados demográficos dos sujeitos da pesquisa estão sumarizados no Anexo 3). Todos os indivíduos participantes da pesquisa, após lerem e concordarem com o termo de consentimento livre esclarecido, foram incluídos no estudo (TCLE CAAE: 08166412.7.0000.0068 e CAPPesq número *online*: 9902 - Anexos 1 e 2).

Foram incluídos 21 controles saudáveis, não atópicos, entre 21 e 41 anos (média de idade = 28,42), dentre eles 13 mulheres e 8 homens (Anexo 3). Foram excluídos os indivíduos que não preencheram os critérios de inclusão, ou e aqueles que, a qualquer momento, solicitaram sua exclusão do estudo.

3.1.1 Critérios de inclusão de pacientes com DA

- Pacientes que preencheram os critérios diagnósticos de Hanifin e Rajka (42);
- Pacientes com quadro leve, moderado ou grave, com início desde a infância ou de aparecimento tardio, segundo o escore de gravidade EASI (*Eczema area severity index* – Anexo 4) (43);
- Maiores de 18 anos de idade, de ambos os sexos.

3.1.2 Critérios de exclusão de pacientes com DA

- Antecedentes pessoais de imunodeficiência congênita / adquirida;
- Uso de corticoide sistêmico;
- Uso de imunossupressor sistêmico;
- Uso de antibiótico oral nas últimas 2 semanas;
- Gestantes.

3.2 Obtenção de PBMC do sangue periférico

As amostras de sangue foram coletadas em tubo heparinizado estéril. O sangue foi diluído em solução fisiológica estéril, volume a volume, em tubo plástico, e centrifugado em gradiente de concentração Ficoll-Hypaque (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, EUA) por 20 minutos a 950g para obtenção da suspensão de PBMC. Após duas lavagens em meio de cultura RPMI-1640 (Gibco, Invitrogen, EUA) suplementado com gentamicina (10µg/mL, Novafarma, SP, Brasil) por 10 minutos a 250g, as células obtidas foram quantificadas em contador automático (CellDyn 1400, Abbot).

3.3 Caracterização fenotípica e funcional das mDC por citometria de fluxo multiparamétrica

As mDC foram analisadas fenotipicamente através da expressão das moléculas de superfície CD11c, HLA-DR, moléculas coestimuladoras CD83, FcεRI e receptor *scavenger* CD36, sendo os dois últimos utilizados como marcadores

IDEC. A exclusão de outras populações foi feita com o anticorpo *lineage* 1 (CD3, CD14, CD16, CD19, CD56).

Durante o período de cultivo foram incubadas 3×10^6 de células por poço que receberam estímulo de SEB (1,0µg/mL), TLR2 (Pam3CSK4 - 2,5µg/mL), TLR4 (LPS - 2,5µg/mL) e TLR7/8 (CL097 - 5,0µg/mL), (Sigma, St. Louis, MO, EUA). Após 4 horas do início do cultivo, foi adicionada (10µg/mL – Sigma) de Brefeldina A (Inibidora da secreção de proteína e da função do complexo de Golgi), e a placa mantida na estufa a 37° a 5% CO₂ durante 20 horas (Quadro 1).

Ao final do período de cultivo, as células foram coletadas, lavadas duas vezes com PBS à 4°C, e o bloqueio da fração Fc foi feito com imunoglobulina G humana (10µL/mL - Baxter, Glenview, IL, USA). Em seguida, as células foram marcadas de acordo com o marcador de viabilidade celular LIVE/DEAD PE-Texas Red (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), por 30 minutos, à temperatura ambiente. As células foram então tratadas conforme as instruções do kit Cytotfix / Cytoperm (BD Bioscience – San Jose, CA, USA) e as marcações extracelulares foram realizadas com anticorpos monoclonais para mDC conjugados com fluorocromos: anti-*lineage*-1 (FITC), CD11c (Alexa 700), anti-HLA-DR (Horizon V500), anti-CD83 (PE Cy-5.5) (BD Bioscience), anti-FcεRI (PE), anti-CD36 (APC Cy7) (Biolegend – San Diego, CA, USA). As marcações intracelulares foram realizadas com anticorpos monoclonais para mDC conjugados com fluorocromos anti-IL-10 (APC), anti-IFN-γ (Horizon V450) e anti-TNF (PE Cy7) (BD Bioscience). O controle da fluorescência (FMO – *Fluorescence Minus One*) foi realizado para todos os anticorpos do painel, para avaliar a compensação e definir os eventos positivos. As células foram

fixadas com paraformaldeído 1% e foram adquiridos 300.000 eventos no citômetro de fluxo LSR Fortessa (BD Biosciences). A análise dos dados obtidos foi realizada utilizando o programa FlowJo v10 (Tree Star, Ashland, OR, USA).

Quadro 1: Estímulos utilizados na caracterização fenotípica e funcional das mDC por citometria de fluxo.

ESTÍMULOS	CARACTERÍSTICA	RECEPTOR	JUSTIFICATIVA
SEB	Superantígeno Bacteriano	TCR MHC	Colonização de bactérias devido a defeito na barreira cutânea
Pam3CSK4	Bactérias Gram +	TLR2	Colonização de bactérias devido a defeito na barreira cutânea
LPS	Bactéria Gram -	TLR4	Colonização de bactérias devido a defeito na barreira cutânea
CL097	Fita simples de RNA	TLR7/8	Presença de infecções virais, como herpes e outras

3.4 Análise estatística

Para realização da análise estatística dos dados e construção dos respectivos gráficos, foi utilizado o programa Graph Pad Prism 5 (Graph Pad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Os testes não paramétricos de Mann-Whitney foram utilizados para comparar dois grupos de dados. 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. RESULTADOS

4.1 Avaliação funcional das mDC através da produção de citocinas por citometria de fluxo

A estratégia de análise utilizada para se avaliar a população de mDC, bem como a produção de citocinas por estas células, está demonstrada na Figura 3A. Em situação estimulada, encontramos uma diminuição da frequência de TNF nas mDC em PBMC dos pacientes após estímulo com TLR 7/8 (CL097) nos pacientes com DA. Observamos, ainda, uma diminuição na frequência da expressão de IFN- γ após estímulo com TLR2 (Pam3CSK4) (Figura 3B), e aumento da frequência de IL-10 após estímulo com TLR4 (LPS) nas mDC em PBMC nos pacientes com DA.

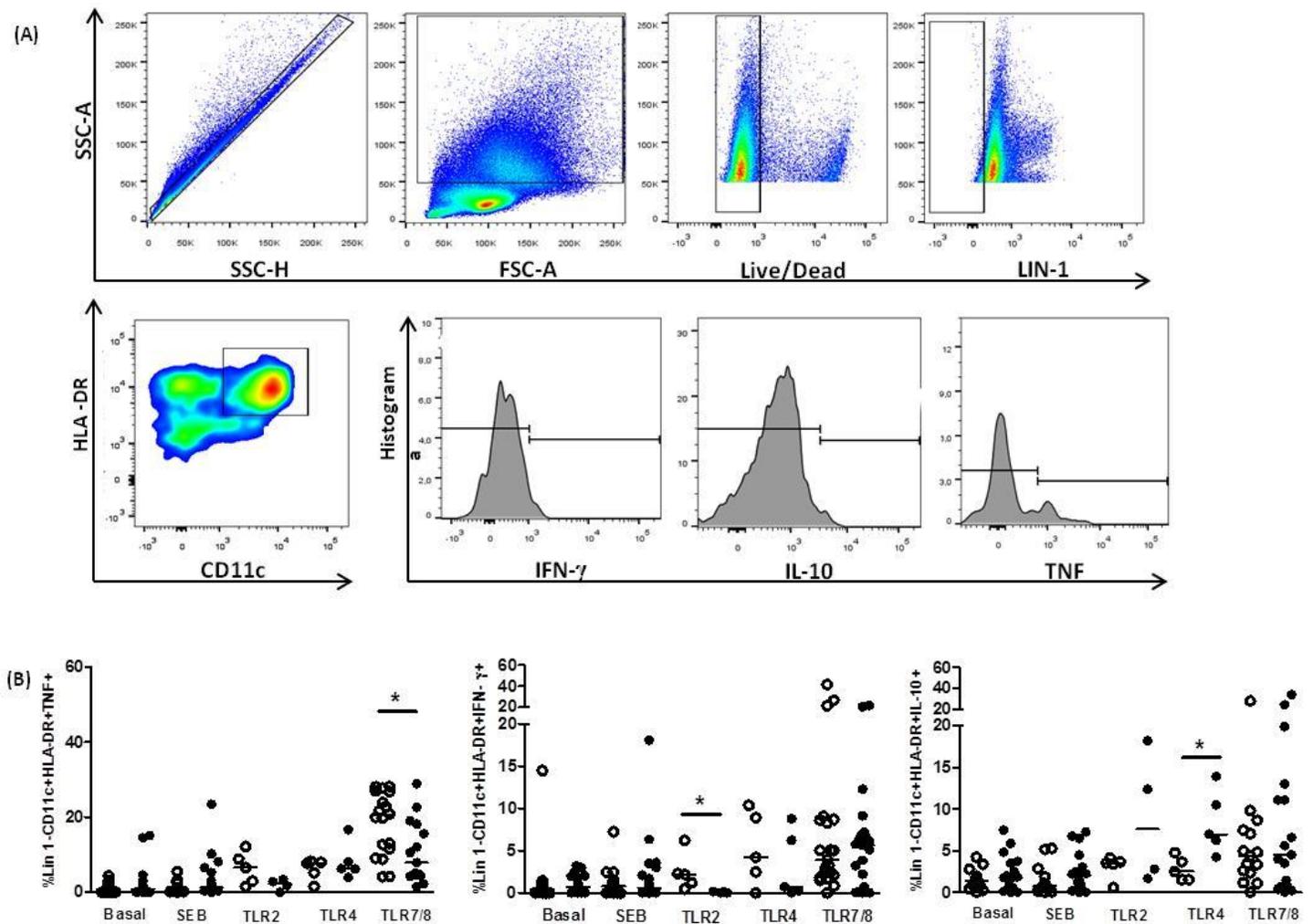


Figura 3. Frequência de TNF, IFN- γ e IL-10 nas mDC em PBMC. (A) Estratégia de análise para marcação de células dendríticas mieloides e expressão de citocinas. (B) Níveis de TNF, IFN- γ e IL-10 nas mDC em PBMC em situação estimulada (SEB, TLR2, TLR4 e TLR7/8) pacientes com DA (\bullet n = 21) comparado aos controles (\circ n = 21). Os traços representam a mediana dos níveis de citocinas expressos em %. * $p \leq 0,05$.

Quadro 2: Achados referentes à produção de citocinas em mDC.

Estímulo	Resultado
TLR2 (Pam3CSK4)	↓ IFN- γ
TLR4 (LPS)	↑ IL-10
TLR 7/8 (CL097)	↓ TNF

4.2 Avaliação da expressão de mDC IFN- γ ⁺IL-10⁺ e IFN- γ ⁺TNF⁺ em PBMC por citometria de fluxo

A seguir, avaliamos a dupla expressão das citocinas analisadas por citometria de fluxo (estratégia de análise - Figura 4A). Observamos aumento significativo da frequência de mDC IFN- γ ⁺IL-10⁺ (PBMC) e de mDC IFN- γ ⁺TNF⁺ nos adultos com DA em condição basal (Figura 4B).

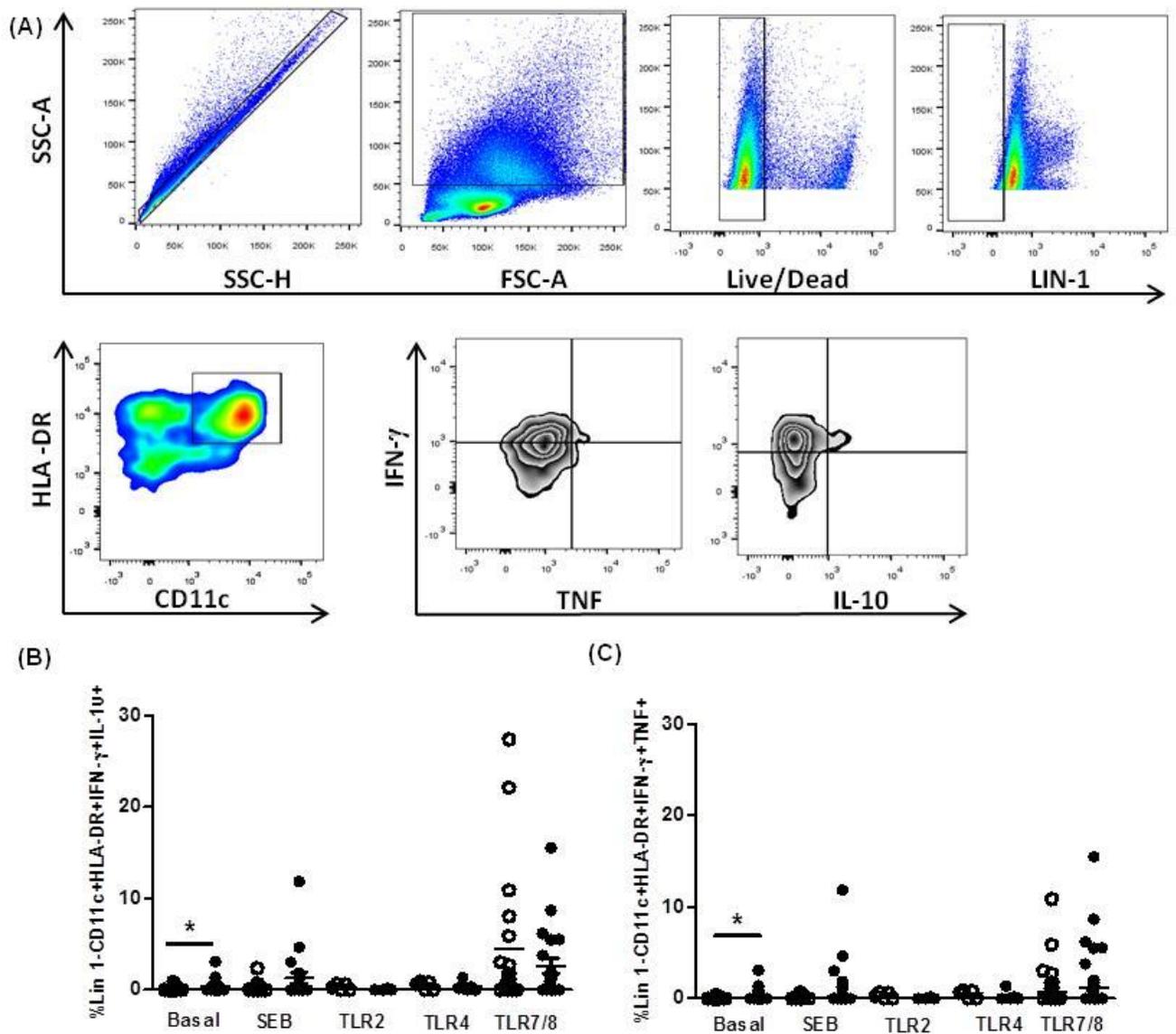


Figura 4: Frequência da expressão de mDC IFN- γ ⁺IL-10⁺ e IFN- γ ⁺TNF⁺ em PBMC. (A) Estratégia de análise para marcação de células dendríticas mieloides com dupla expressão de citocinas intracelulares. **(B)** Avaliação da frequência de mDC IFN- γ ⁺IL-10⁺ e IFN- γ ⁺TNF⁺ em condição basal e após estímulos (SEB, TLR2, TLR4 e TLR7/8) nos pacientes com DA (n = 21) comparado aos controles (n = 21). Os traços representam a mediana dos níveis de citocinas expressos em %. * $p \leq 0,05$.

Quadro 3: Achados referentes à produção de citocinas em mDC IFN- γ ⁺IL-10⁺ e IFN- γ ⁺TNF⁺ (PBMC)

Estímulo	Resultado
Basal	↑ IFN- γ ⁺ IL-10 ⁺
	↑ IFN- γ ⁺ TNF ⁺

4.3 Avaliação da expressão de CD36, Fc ϵ RI e mDC CD36⁺Fc ϵ RI⁺ em PBMC por citometria de fluxo

Com o intuito de se avaliar o perfil fenotípico das mDC em PBMC nos pacientes com DA, utilizamos os marcadores CD83 (marcador de maturação de DC), CD36 (*scavenger*) e Fc ϵ RI (marcador de alta afinidade para IgE). A estratégia de análise fenotípica da população de mDC está demonstrada na Figura 5A. Observamos aumento significativo da frequência na expressão de Fc ϵ RI frente ao estímulo com TLR4 (LPS), e tendência de aumento da frequência da expressão de Fc ϵ RI na condição basal e estimulada nas mDC nos atópicos (Figura 5B).

Na pele de pacientes com DA, existe aumento da expressão de mDC CD36⁺Fc ϵ RI⁺ (IDEC) (22, 27). Sendo assim, analisamos a expressão destes marcadores em mDC (PBMC), e observamos aumento significativo da frequência de mDC CD36⁺Fc ϵ RI⁺ (IDEC-*like*) em pacientes com DA, principalmente após estímulo de TLR2 (Pam3CSK4) (Figura 5C).

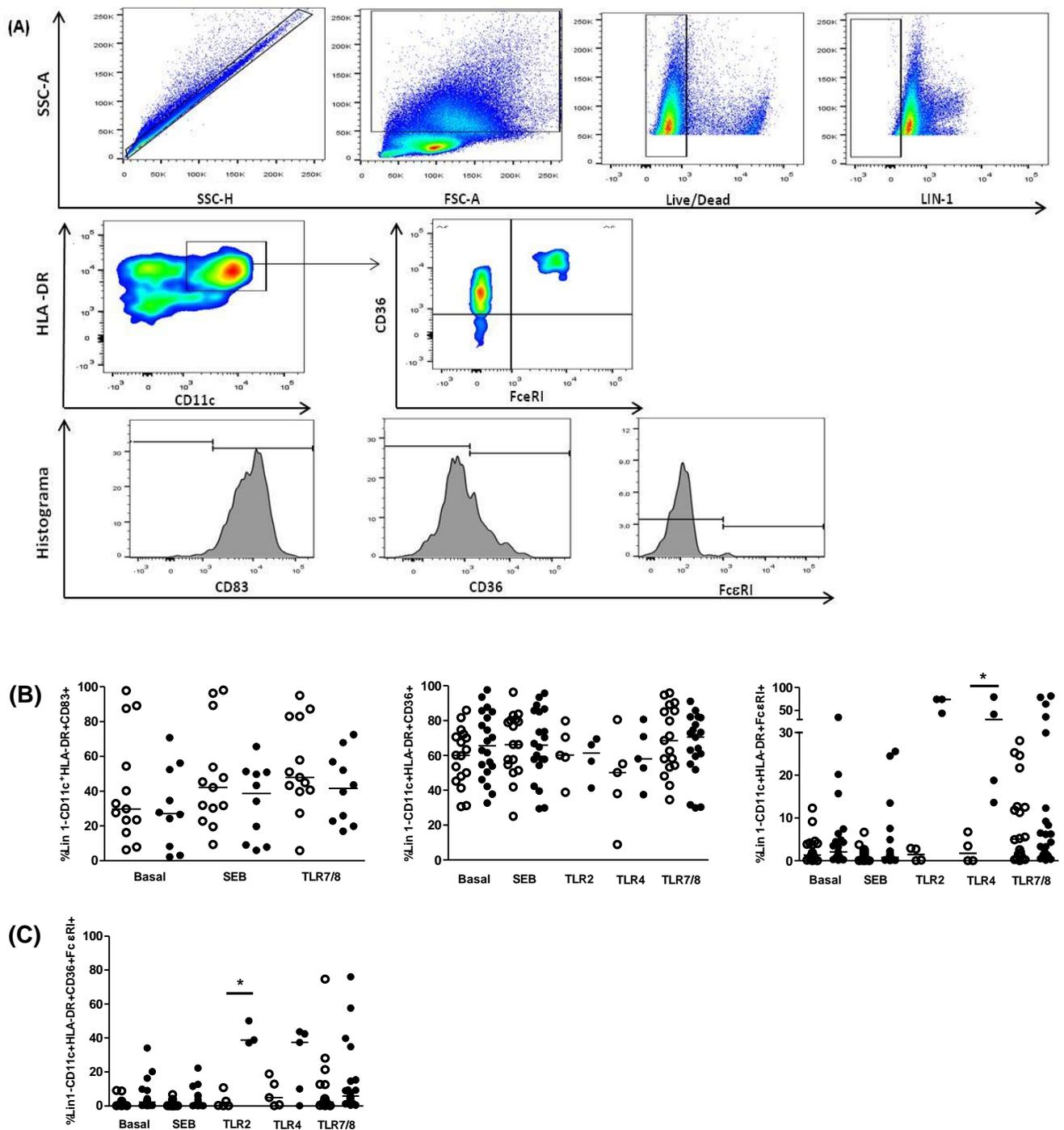


Figura 5: Frequência da expressão de CD83, CD36 e Fc ϵ RI e mDC CD36⁺Fc ϵ RI⁺ em PBMC. (A) Estratégia de análise para marcação de células dendríticas mieloideas com dupla expressão de citocinas intracelulares. (B) Frequência da expressão de CD83, CD36 e Fc ϵ RI em situação basal e após estímulos (SEB, TLR2, TLR4 e TLR7/8) entre pacientes com DA (n = 21) comparados com o grupo controle (n = 21). (C) Avaliação da frequência da dupla

marcação CD36⁺FcεRI⁺ (IDEC-*like*) em condição basal e após os referidos estímulos, nos pacientes com DA (n = 21) comparado aos controles (n = 21). Os traços representam a mediana da secreção dos marcadores supracitados expressos em %. *p ≤ 0,05.

Quadro 4: Expressão de CD83, CD36, FcεRI e de mDCsCD36⁺FcεRI⁺.

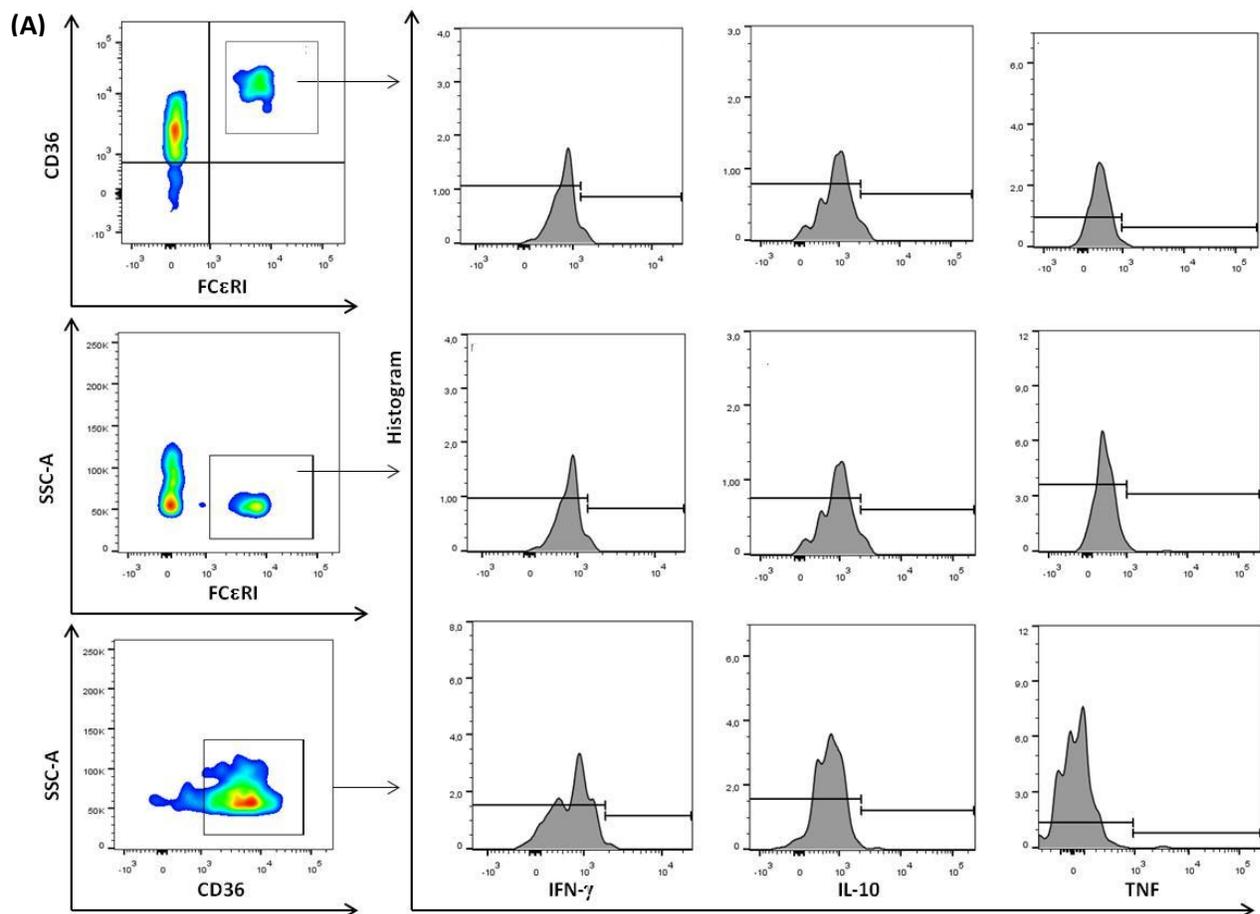
Estímulo	Resultado
TLR4 (LPS)	↑FcεRI
TLR2 (Pam3CSK4)	↑CD36 ⁺ FcεRI ⁺

4.4 Avaliação funcional das mDC CD36⁺FcεRI⁺ em PBMC (IDEC-*like*) através da produção de citocinas por citometria de fluxo

Realizamos a seguir uma avaliação funcional das mDC CD36⁺, FcεRI⁺ e CD36⁺FcεRI⁺ (IDEC-*like*) através da produção das citocinas IFN-γ, IL-10 e TNF. A estratégia de análise para se chegar à população IDEC-*like*, com a expressão das referidas citocinas, está demonstrada na Figura 6A.

Observamos uma tendência de aumento da frequência de expressão de IFN-γ, IL-10 e TNF nas mDC CD36⁺ em PBMC nos pacientes com DA, em situação basal ou estimulada (Figura 6B). Quando avaliamos as mDC FcεRI⁺, não encontramos nenhuma diferença significativa entre os grupos estudados com relação à expressão de IFN-γ, observamos um aumento da frequência de IL-10, principalmente após estímulo com TLR7/8 (CL097) e, aumento da expressão de TNF após estímulo com TLR2 nos pacientes com DA (Figura 6C).

Ao analisarmos a produção destas citocinas em mDC CD36⁺FcεRI⁺ (IDEC-*like*), verificamos um aumento significativo dos níveis de IFN- γ em condição basal. Em condição estimulada, houve uma inversão deste perfil, porém sem significância estatística. Com relação a IL-10, observamos um aumento da frequência de sua expressão nas IDEC-*like* após estímulo com TLR7/8 (CL097). Não encontramos nenhuma diferença significativa quanto à expressão de TNF entre os grupos estudados (Figura 6D).



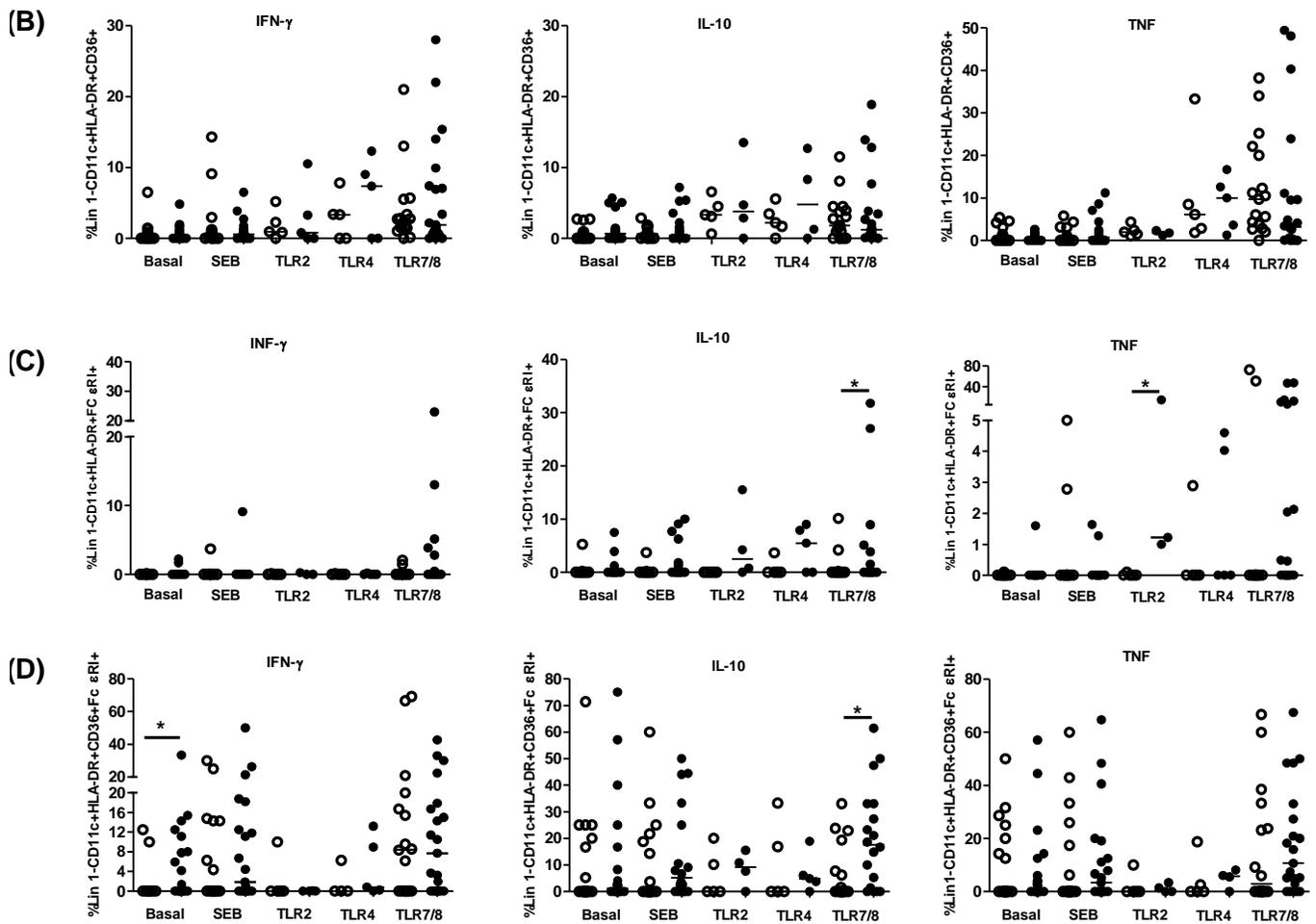


Figura 6. Frequência de IFN- γ , IL-10 e TNF em mDC CD36⁺, Fc ϵ RI⁺e IDEC-like (A) Estratégia de análise para avaliação de IDEC-like e expressão de citocinas. **(B)** Níveis de IFN- γ , IL-10 e TNF nas mDC CD36⁺ em PBMC em condição basal e após estímulos (SEB, TLR2, TLR4 e TLR7/8) em pacientes com DA (n = 21) comparados aos controles (n = 21). **(C)** Níveis de IFN- γ , IL-10 e TNF nas mDC Fc ϵ RI⁺ em PBMC em condição basal e após os referidos estímulos em pacientes com DA (n = 21) comparados aos controles (n = 21). **(D)** Níveis de IFN- γ , IL-10 e TNF nas IDEC-like em situação basal e após os referidos estímulos em pacientes com DA (n = 21) comparados aos controles (n = 21). Os traços representam a mediana dos níveis de citocinas expressos em %. * $p \leq 0,05$.

Quadro 5: Achados referentes à produção de citocinas em mDC CD36⁺, FcεRI⁺ e IDEC-like.

Estímulo	Tipo celular	Resultado
TLR7/8 (CL097)	FcεRI ⁺	↑ IL-10
TLR2 (LPS)	FcεRI ⁺	↑ TNF
Basal	CD36 ⁺ FcεRI ⁺	↑ IFN-γ
TLR7/8 (CL097)	CD36 ⁺ FcεRI ⁺	↑ IL-10

Não encontramos correlação entre gravidade da DA e a frequência da expressão das citocinas nos tipos celulares estudados.

5 DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Na dermatite atópica, as células apresentadoras de antígenos IDEC, pertencentes ao grupo das mDC, e que expressam receptores de trombospondina (CD36⁺) e receptores de alta afinidade por IgE (FcεRI⁺), participam de forma relevante na patogenia da doença, especialmente na resposta mediada por IgE (27). O presente estudo visou avaliar o perfil fenotípico e funcional destas células apresentadoras de antígenos nos pacientes com DA, através da produção de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas IL-10, IFN- γ e TNF, frente a estímulos de receptores *Toll-like*.

Estudos realizados em dermatoses inflamatórias (psoríase) apontam possível papel pró-inflamatório das células dendríticas. As mDC encontradas na pele psoriática apresentam baixa frequência de IFN- γ e aumento na frequência de IL-10. Na DA, à semelhança da psoríase, ocorre ativação crônica de células T, onde a diferenciação celular depende da presença de DC maduras e inflamatórias (44). A análise de MoDC (células dendríticas geradas a partir de cultura de monócitos *in vitro*) na DA evidencia baixa frequência de IFN- γ , indicando predominância do perfil Th2, e consequente diminuição do perfil Th1 (45). Com relação ao TNF- α , há relatos do aumento da sua frequência em situação basal e frente ao estímulo SEB, em mDC de PBMC de pacientes na fase crônica de DA. As mDC não estimuladas apresentam polarização das citocinas para o perfil Th1, tanto em indivíduos atópicos quanto não-atópicos; após estímulo com SEB, ocorre polarização para o perfil Th2 (46).

Estudos envolvendo diferentes tipos celulares (monócitos, macrófagos, e mDC), com os TLR demonstram que, disfunções do TLR2 podem levar ao aumento de suscetibilidade a infecções microbianas e HSV (herpes simples), favorecendo a progressão da DA (48). A disfunção de TLR4, por sua vez, está associada à suscetibilidade a infecções por bactérias Gram negativas e progressão rápida de septicemia em pacientes imunodeprimidos (47).

No intuito de se caracterizar o perfil funcional das mDC na DA sob influência dos TLR (TLR2, TLR4, TLR7/8) e enterotoxina estafilocócica (SEB), realizamos avaliação da produção de IFN- γ , TNF e IL-10 por citometria de fluxo. Nos pacientes com DA, obtivemos evidente redução da frequência de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF, frente a estímulos de TLR2 (Pam3CSK4) e TLR7/8 (CL097) respectivamente. Verificamos, ainda, aumento de IL-10 frente a estímulo de TLR4 (LPS) nos pacientes com DA, sugerindo modificação do perfil pró-inflamatório, sob influência dos TLR analisados (TLR2, TLR4 e TLR7/8).

Uma vez encontrada diminuição da frequência de IFN- γ e TNF e aumento de IL-10 frente ao estímulo com TLR nas mDC monofuncionais, decidimos avaliar o potencial imunomodulador destas citocinas, através da avaliação da dupla expressão de IFN- γ com IL-10 e/ou TNF. Detectamos aumento da frequência da coexpressão de IFN- γ^+ IL-10 $^+$ nas mDC no sangue periférico de pacientes com DA em situação basal, indicando possível disfunção da IL-10 no processo inflamatório. Acreditamos que o aumento da frequência de IL-10 caracterize o perfil tolerogênico destas células dendríticas, contribuindo assim, com a perpetuação do

processo inflamatório na DA. Não existem relatos na literatura sobre mDC tolerogênicas na DA.

Observamos ainda, aumento na frequência da coexpressão de IFN- γ ⁺TNF⁺ nas mDC em situação basal, indicando manutenção do perfil pró-inflamatório nos pacientes com DA.

Na DA existem dois tipos principais de mDC: as células de Langerhans e células dendríticas epidérmicas inflamatórias (IDEC). Na pele lesada dos pacientes com DA, as mDC são caracterizadas pela expressão aumentada de uma gama de marcadores celulares, especialmente o Fc ϵ RI (22, 27, 28). Após análise funcional das mDC nos adultos com DA, realizamos avaliação destas mDC em PBMC, utilizando-se dos marcadores de superfície CD83, CD36 e Fc ϵ RI. Importante destacar que há escassez de estudos em DA com mDC em PBMC.

Com relação aos dados de literatura relacionados às mDC na pele com DA, há relatos de aumento da expressão de Fc ϵ RI em condição basal após testes de contato com alérgenos, situação esta reversível após 24-72h (48). Outro estudo em DA, utilizando pele e MoDC, revela aumento na frequência de Fc ϵ RI em situação basal, sugerindo *cross-talk* entre LC, IDEC e LT, com liberação de quimiocinas e *skin homing* de DC e de LT, e progressão da inflamação (49).

Ainda, existem evidências indicando *cross-talk* entre TLR e Fc ϵ RI, relatando ação sinérgica dos mesmos, onde se observa que o TLR4 é relevante na produção de IL-4, IL-8 e IL-13 em doenças inflamatórias (47). Estudos em

monócitos do sangue periférico de pacientes com DA mostram diminuição na produção de citocinas pró-inflamatórias, e aumento da expressão de células $Fc\epsilon RI^+$ mediadas por TLR2 (50).

Em nossa análise, encontramos aumento da frequência da expressão de $Fc\epsilon RI^+$ frente a estímulo de TLR4 em mDC de PBMC nos pacientes com DA, corroborando os dados da literatura supracitados (50). Encontramos, ainda, nestes mesmos doentes, aumento da frequência da expressão de células mDC $CD36^+Fc\epsilon RI^+$ (*IDEC-like*), em condição *ex vivo*, após estímulo com TLR2. O aumento da frequência da expressão das *IDEC-like* circulantes sugere recrutamento das mesmas para os sítios inflamatórios cutâneos (*skin homing*).

Após caracterização do perfil fenotípico das *IDEC-like*, avaliamos o perfil funcional destas células, através da análise da produção de $IFN-\gamma$, IL-10 e TNF. Estudos recentes relatam a importância do $Fc\epsilon RI$ na indução do fenômeno de tolerância alérgeno-específica. Dentre eles, destacamos a ativação de monócitos e MoDC que expressam $Fc\epsilon RI$, na DA, levando ao aumento da produção de IL-10 (51).

Alguns autores, utilizando células dendríticas inflamatórias epidérmicas derivadas de monócito (*IDEC-DC*), demonstram produção aumentada de IL-12 e IL-18 *in vitro*, quando ativadas via receptor $Fc\epsilon RI$. Estas *IDEC-DC* induzem diferenciação das células T *naive*, levando à produção de $IFN-\gamma$, e polarização da resposta imune Th2 para resposta do tipo Th1 *in vivo*. Ainda, o *cross-talk* entre CL,

IDEC, células T, e outros tipos celulares em lesões de pele nas dermatoses eczematosas, através da libertação de quimiocinas, pode contribuir para o recrutamento de mais precursores de DC e de células T, promovendo, o círculo vicioso da reação inflamatória (49).

Nossos resultados demonstraram que, em situação basal, as IDEC-*like* em PBMC apresentaram aumento na frequência de IFN- γ , evidenciando, assim, o perfil pró-inflamatório destas células. Em condição estimulada, houve uma inversão deste perfil, mesmo que sem significância estatística, sugerindo possível tentativa de modulação do processo inflamatório. Após estímulo com agonista TLR7/8, houve aumento na frequência de IL-10, sugerindo perfil tolerogênico destas IDEC-*like*. Estudos indicam que, o TLR7/8, por seu papel protetor em respostas alérgicas, pode representar futuro alvo terapêutico (50), reforçando a relevância da imunomodulação.

Portanto, os dados apresentados indicam participação das mDC e das IDEC-*like* na regulação do processo inflamatório da DA, sugerindo papel tolerogênico das mesmas, especialmente sob estímulo de TLR4 e TLR7/8. Interessante ressaltar, que, apesar de sua influência sobre linfócitos T na DA (52), as enterotoxinas estafilocócicas não mostraram papel relevante na modulação da resposta inflamatória nas IDEC-*like* desta enfermidade. Assim, o presente estudo corrobora a relevância das células IDEC-*like* na perpetuação do processo inflamatório na DA durante o processo de *skin homing*.

6 CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

- As mDC circulantes na DA apresentaram perfil imunomodulador influenciado por TLR, evidenciado pela diminuição da frequência na expressão de IFN- γ e TNF, frente a estímulos com TLR2 (Pam3CSK4) e TLR7/8 (CL097), e pelo aumento de IL-10 frente a estímulo de TLR4 (LPS).
- A análise fenotípica das IDEC-*like*, através da expressão de CD36 e Fc ϵ RI, indicou aumento da frequência destas células em PBMC, sugerindo recrutamento das mesmas para os sítios inflamatórios cutâneos (*skin homing*) na DA.
- O aumento da frequência na expressão de IL-10 pelas IDEC-*like* frente ao estímulo TLR7/8 (CL097), sugerindo papel tolerogênico destas células.

7. ANEXOS

Anexo 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 DE CÉLULAS DENDRÍTICAS INFLAMATÓRIAS NA DERMATITE ATÓPICA DO ADULTO.

Pesquisador Responsável: Valéria Aoki

Versão: 3

Pesquisador Executante: Vanessa Gonçalves Dos Santos

CAAE: 08166412.7.0000.0068

Co-autores: Dra. Maria Notomi Sato, Dra. Raquel Leão Orfali, Tiago de Oliveira Titz

Finalidade Acadêmica: Mestrado

Instituição: HCFMUSP

Departamento: DERMATOLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 9902

Número do Parecer: 164.106

Data da Relatoria: 05/12/2012

Apresentação do Projeto: Avaliar sorollogicamente pacientes portadores de Dermatite atópica atendidos no ambulatório de dermatologia do HCFMUSP

Objetivo da Pesquisa: Avaliar o fenotipo e o funcionamento das células dendríticas na dermatite atópica, as quais podem ter um papel importante na resposta inicial da doença, e sua correlação com a gravidade da doença. Serão avaliados 15 pacientes e 20 controles

Avaliação dos Riscos e Benefícios: não há riscos envolvidos, a não ser o inerente à colheita de sangue.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Não apresenta questionamentos de natureza ética.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Os pesquisadores providenciaram os esclarecimentos solicitados.

Recomendações: Aprovação

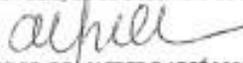
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Aprovado sem pendências

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Aprovado

São Paulo, 12 de Dezembro de 2012


PROF. DR. ALFREDO JOSÉ MANSUR
Vice-Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Anexo 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido

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 de células dendríticas inflamatórias na dermatite atópica do adulto".

PESQUISADOR: Dra. Valéria Aoki

CARGO/FUNÇÃO: Professor Doutor
60080

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL

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 o objetivo entender melhor a doença de pele chamada dermatite atópica, que causa coceira, descamação e vermelhidão levando a um desconforto por um longo período. Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que irá analisar tipos de células brancas do sangue periférico de pacientes do ambulatório de dermatite atópica do Hospital das Clínicas e indivíduos não portadores da doença (grupo controle) do Laboratório de Investigação Médica unidade 56 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo;

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados: Serão realizados exames laboratoriais, não rotineiros, para estudar os fatores de defesa do organismo mediados pelas células brancas do sangue e em tecido de pele. Os exames serão feitos no próprio Hospital das Clínicas sem nenhum custo para o paciente, que pode aproveitar o dia das consultas para realizar a coleta de das amostras de sangue ou biópsia de pele. Os pacientes continuarão a ser acompanhados como sempre no ambulatório da dermatologia. Todos os pacientes terão acesso aos resultados de seus exames no momento em que quiserem e com as explicações necessárias para seu entendimento. O paciente pode em qualquer momento não concordar em fazer os exames que serão pedidos;

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados: Será realizada coleta 30 mL (seis colheres de sopa) de sangue, por punção periférica da veia do antebraço. Para coleta da biópsia de pele os pacientes receberão anestesia local, e serão obtidos 4mm de diâmetro da pele. As amostras serão enviadas para o laboratório para serem analisadas. Os mesmos exames serão realizados no grupo controle;

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3: A picada da agulha da anestesia local assim como a agulha da coleta pode levar a um leve desconforto que passará em poucos minutos. Um dia após pode se sentir em torno da picada uma mancha roxa ao redor da picada da agulha onde se coletou sangue que desaparece em poucos dias sem maiores problemas. Caso haja necessidade será dado 1 ponto na cicatriz que formará após a biópsia da pele, e o paciente irá receber uma guia para retirada dos pontos em qualquer posto de serviço público.

5 – Benefícios para o participante: Não há benefício direto para o participante;

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: Você não é obrigado a realizar estes procedimentos se não quiser, e não sofrerá nenhuma penalidade caso não queira. Mesmo que não concorde em participar do estudo, você 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 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: Você pode sair a qualquer momento do estudo e deixar de participar sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento no ambulatório de dermatologia da FMUSP;

9 – Direito de confidencialidade: As informações obtidas serão analisadas junto com as informações de outros pacientes, não sendo divulgada a identidade de nenhum paciente;

10 – Direito de ser mantido atualizado: Dos resultados parciais da pesquisa, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 – Despesas e compensações: Você não terá despesas pessoais em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não terá benefício financeiro pela sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela sairá do orçamento da pesquisa;

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

Anexo 3 – Quadro demográfico dos indivíduos participantes do estudo.

Paciente	Idade	Sexo	EASI	Controle	Idade	Sexo
1	37	M	36,3	1	41	F
2	20	M	11,2	2	29	F
3	20	F	34,8	3	25	M
4	30	M	48,4	4	27	F
5	59	M	22,0	5	26	M
6	28	M	35,2	6	33	M
7	24	F	50,0	7	27	F
8	39	F	31,6	8	26	F
9	25	F	31,2	9	25	F
10	43	F	33,5	10	36	F
11	29	M	40,2	11	23	F
12	21	M	48,2	12	32	M
13	61	F	59,4	13	32	M
14	21	M	38,5	14	26	F
15	24	M	47,9	15	29	F
16	35	M	28,4	16	23	F
17	41	M	20,6	17	31	M
18	32	M	34,6	18	29	M
19	18	F	15,3	19	32	M
20	29	F	42,1	20	24	F
21	43	M	18,4	21	21	F
32,33		8F/13M		28,42		13F/8M

Anexo 4. Critérios diagnósticos da dermatite atópica

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 recorrente
- () História pessoal ou familiar de atopia (asma, rinite alérgica, dermatite atópica)

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

- () Xerose
- () Ictiose
- () Hiperlinearidade palmar
- () Queratose pilar
- () Reatividade imediata a testes cutâneos (tipo I)
- () IgE sérica elevada
- () Início em idade precoce
- () Tendência a infecções cutâneas (especialmente *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

Anexo 5. Escore de gravidade - 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

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. Addor FA, Takaoka R, Rivitti EA, Aoki V. Atopic dermatitis: correlation between non-damaged skin barrier function and disease activity. *International journal of dermatology*. 2012;51(6):672-6.
7. Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. Staphylococcal enterotoxins. *Toxins (Basel)*. 2010;2(8):2177-97.
8. Turksen K, Troy TC. Barriers built on claudins. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 12):2435-47.
9. 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.
10. 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.
11. 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. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123(6):1244-52.
12. Nograles KE, Zaba LC, Shemer A, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Kikuchi T, et al. IL-22-producing "T22" T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123(6):1244-52.e2.
13. Fujita H. The role of IL-22 and Th22 cells in human skin diseases. *J Dermatol Sci*. 2013;72(1):3-8.
14. Niebuhr M, Mainardy J, Heratizadeh A, Satzger I, Werfel T. Staphylococcal exotoxins induce interleukin 22 in human th22 cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 2014;165(1):35-9.
15. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol*. 1991;9:271-96.
16. 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.

17. Randolph GJ, Angeli V, Swartz MA. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(8):617-28.
18. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med*. 2001;194(6):863-9.
19. Briere F, Bendriss-Vermare N, Delale T, Burg S, Corbet C, Risoan MC, et al. Origin and filiation of human plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol*. 2002;63(12):1081-93.
20. Collin M, McGovern N, Haniffa M. Human dendritic cell subsets. *Immunology*. 2013;140(1):22-30.
21. Hayashi Y, Ishii Y, Hata-Suzuki M, Arai R, Chibana K, Takemasa A, et al. Comparative analysis of circulating dendritic cell subsets in patients with atopic diseases and sarcoidosis. *Respir Res*. 2013;14:29.
22. Wollenberg A, Feichtner K. Atopic dermatitis and skin allergies - update and outlook. *Allergy*. 2013;68(12):1509-19.
23. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245-52.
24. Wollenberg A, Wagner M, Gunther S, Towarowski A, Tuma E, Moderer M, et al. Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol*. 2002;119(5):1096-102.
25. Lesiak A, Smolewski P, Sysa-Jedrzejowska A, Narbutt J. The Role of T-Regulatory Cells and toll-Like Receptors 2 and 4 in Atopic Dermatitis. *Scand J Immunol*. 2012.
26. Cardoso EC, Pereira NZ, Mitsunari GE, Oliveira LM, Ruocco RM, Francisco RP, et al. TLR7/TLR8 Activation Restores Defective Cytokine Secretion by Myeloid Dendritic Cells but Not by Plasmacytoid Dendritic Cells in HIV-Infected Pregnant Women and Newborns. *PLoS One*. 2013;8(6):e67036.
27. Gros E, Novak N. Cutaneous dendritic cells in allergic inflammation. *Clin Exp Allergy*. 2012;42(8):1161-75.
28. Johnson-Huang LM, McNutt NS, Krueger JG, Lowes MA. Cytokine-producing dendritic cells in the pathogenesis of inflammatory skin diseases. *J Clin Immunol*. 2009;29(3):247-56.
29. Boltjes A, van Wijk F. Human dendritic cell functional specialization in steady-state and inflammation. *Frontiers in immunology*. 2014;5:131.
30. Yoshida K, Kubo A, Fujita H, Yokouchi M, Ishii K, Kawasaki H, et al. Distinct behavior of human Langerhans cells and inflammatory dendritic epidermal cells at tight junctions in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134(4):856-64.
31. 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.
32. Leung DY. Infection in atopic dermatitis. *Curr Opin Pediatr*. 2003;15(4):399-404.

33. Ong PY, Leung DY. The infectious aspects of atopic dermatitis. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2010;30(3):309-21.
34. Leung DY. Atopic dermatitis and the immune system: the role of superantigens and bacteria. *J Am Acad Dermatol*. 2001;45(1 Suppl):S13-6.
35. 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.
36. 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.
37. Macias ES, Pereira FA, Rietkerk W, Safai B. Superantigens in dermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2011;64(3):455-72.
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. Hanifin JM, Rajka G. Diagnostic Features of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*. 1980;92(suppl):44-7.
43. SJ T, M G, R C. Eczema area and severity index (EASI): A new tool to evaluate atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1998;1998.
44. Guttman-Yassky E, Lowes MA, Fuentes-Duculan J, Whynot J, Novitskaya I, Cardinale I, et al. Major differences in inflammatory dendritic cells and their products distinguish atopic dermatitis from psoriasis. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119(5):1210-7.
45. Gros E, Petzold S, Maintz L, Bieber T, Novak N. Reduced IFN- γ receptor expression and attenuated IFN- γ response by dendritic cells in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128(5):1015-21.
46. Nagy G, Doan-Xuan QM, Gáspár K, Mócsai G, Kapitány A, Törőcsik D, et al. The atopic skin-like microenvironment modulates the T-cell-polarising cytokine production of myeloid dendritic cells, as determined by laser scanning cytometry. *Exp Dermatol*. 2014;23(4):276-8.
47. van Egmond M, Vidarsson G, Bakema JE. Cross-talk between pathogen recognizing Toll-like receptors and immunoglobulin Fc receptors in immunity. *Immunol Rev*. 2015;268(1):311-27.

48. Eyerich K, Novak N. Immunology of atopic eczema: overcoming the Th1/Th2 paradigm. *Allergy*. 2013;68(8):974-82.
49. Novak N, Valenta R, Bohle B, Laffer S, Haberstick J, Kraft S, et al. FcεRI engagement of Langerhans cell-like dendritic cells and inflammatory dendritic epidermal cell-like dendritic cells induces chemotactic signals and different T-cell phenotypes in vitro. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113(5):949-57.
50. Novak N, Koch S, Allam JP, Bieber T. Dendritic cells: bridging innate and adaptive immunity in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(1):50-9.
51. Bieber T. The pro- and anti-inflammatory properties of human antigen-presenting cells expressing the high affinity receptor for IgE (FcεRI). *Immunobiology*. 2007;212(6):499-503.
52. 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.