

**JULIANA CRISTINA DOS SANTOS**

**“Perfil de secreção e expressão de quimiocinas e citocinas na urticária crônica”**

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

Programa de: Dermatologia  
Orientadora: Profa. Dra. Maria Notomi Sato

**São Paulo**

**2010**

**JULIANA CRISTINA DOS SANTOS**

**“Perfil de secreção e expressão de quimiocinas e citocinas na urticária crônica”**

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

Programa de: Dermatologia  
Orientadora: Profa. Dra. Maria Notomi Sato

**São Paulo**

**2010**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Santos, Juliana Cristina dos

Perfil de secreção e expressão de quimiocinas e citocinas na urticária crônica /  
Juliana Cristina dos Santos. -- São Paulo, 2010.

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

Orientadora: Maria Notomi Sato.

Descritores: 1.Urticária crônica idiopática 2.Autoanticorpos 3.Citocinas  
4.Quimiocinas 5.Linfócitos 6.Monócitos

USP/FM/DBD-238/10

**DEDICATÓRIA**

*Dedico esta dissertação de  
mestrado aos meus pais  
José e Aparecida e ao meu  
irmão Rodrigo.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço a Deus, força imensurável, pelo o dom da vida, pela felicidade concedida, pelo conforto nos dias difíceis, e pela oportunidade de mais uma conquista.*

*Aos meus pais que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos de alegrias e de choro, sempre me confortando e apoiando. Agradeço aos meus heróis, razões da minha vida.*

*Ao meu irmão Rodrigo que me incentivou em minhas escolhas.*

*Ao meu amado Fábio Flores por seu amor, carinho e dedicação.*

*Aos meus avós, tios, primos, madrinha e padrinho, todas das famílias Mazeti e Oliveira pelo carinho.*

*A minha tia Nayr Mazeti por sempre ter acreditado em mim, desde o primeiro dia de faculdade até os dias atuais.*

*A Dra. Maria Sato por esses anos de orientação, pela paciência, apoio, respeito, conselhos, sempre ajudando no meu amadurecimento profissional e que foi sempre mais do que chefe foi mãe e amiga.*

*Aos pacientes com Urticária Crônica Idiopática que se propuseram a colaborar com nosso estudo.*

*Ao Prof. e Dr. Alberto José da Silva Duarte pelo acolhimento e oportunidade de realizar meu mestrado no LIM-56.*

*Ao meu imprescindível colega Cyro Alves de Brito por toda a sua colaboração científica, dos cálculos aos experimentos, das discussões de artigos às conversas amigas, por todo carinho, atenção e dedicação.*

*Aos meus companheiros do projeto urticária: Eliana Futata, Mayce Azor, Nelson Lourenço e Viviane Nojima pela amizade e colaboração nos experimentos e nos estudos.*

*Aos meus colegas, alunos da Maria, Adriana Goldoni, Ana Elisa Fusaro, Bruno Pacola, Carolina Freggine, Elaine Cardoso, Jefferson Victor, Josenilson Feitosa, Nátalli Pagani, Orlando Piubelli, e Shinai Arriel por todo auxílio e por tornar mais alegre e agradável essa difícil jornada.*

*A Noêmia Orii pelos ensinamentos em citometria de fluxo.*

*A FAPESP, ao LIM-56 e ao HC-FMUSP pelo auxílio técnico e financeiro.*

*Ao meu colega Guilherme Silveira pelas aulas de inglês e pelo auxílio nas purificações de células.*

*As minhas colegas Suzana Lessa, Adriana Ladeira, Andressa Vaz e Soraya Ogusuku pelo apoio e alegria.*

*Aos médicos do LIM-56: Maria de Lourdes, Gil Benard, Alexandre Almeida, Dewton Vasconcelos e Jorge Casseb.*

*A todos do departamento de Dermatologia: Prof. Dr. Evandro Rivitti, Dra. Celina, Dra. Érica Prearo, Dra. Valéria Aoki e Dra. Mirian Sotto.*

*A banca do exame de qualificação, Dra. Jane Yamashita, Dr. Ricardo Romitti e Dra. Paula Rigato pelas correções e orientações para conclusão desse estudo.*

*A todos do LIM-56, pós-graduandos, técnicos, secretaria, informática, almoxarifado e limpeza.*



**ΕΠΙΓΡΑΦΕ**

*“Percebe e entende que os melhores amigos são aqueles que estão em casa, esperando por ti. Acredita que nos momentos mais difíceis da vida eles sempre estarão por perto, pois só sabem te amar e se por acaso a dor chegar ao teu lado vão estar, pra te acolher e te amparar, pois não há nada como um lar. Tua família te ama e te espera para ao teu lado sempre estar” (Anjos de Resgate)*

## NORMALIZAÇÃO

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. Serviço 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. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

## **SUMÁRIO**

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

	Página
1. INTRODUÇÃO	
1.1 Urticária Crônica Idiopática.....	02
1.2 Citocinas na Urticária Crônica Idiopática.....	04
1.3 Quimiocinas na Urticária Crônica Idiopática.....	06
2. OBJETIVOS.....	11
3. CASUÍSTICA.....	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS	
4.1 Obtenção de células mononucleares (CMN) do sangue periférico.....	15
4.2 Resposta linfoproliferativa e obtenção de sobrenadantes de culturas após estímulo <i>in vitro</i> com mitógenos e antígenos.....	15
4.3 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para dosagem de citocinas e quimiocinas.....	16
4.4 Determinação de citocinas e quimiocinas por citometria de fluxo ( <i>Cytometric Bead Array</i> - CBA).....	17
4.5 Expressão de RNAm de citocinas por reação de polimerase em cadeia em tempo real .....	17
4.6 Análise da expressão intracelular de CXCL8 e CCL2 por citometria de fluxo.....	19
4.7 Análise da expressão de CCR5 em linfócitos T por citometria de fluxo.....	20
4.8 Análise estatística.....	20
5. RESULTADOS	
5.1 Características demográficas dos pacientes com Urticária Crônica Idiopática.....	22

5.2	Determinação sérica de citocinas pró-inflamatórias na UCI.....	23
5.3	Capacidade de secreção de citocinas e de proliferação de CMN estimuladas por mitógenos na UCI.....	26
5.4	Análise <i>ex vivo</i> da expressão de citocinas em CMN de pacientes UCI.	30
5.5	Níveis séricos de quimiocinas de pacientes com UCI.....	32
5.6	Produção <i>in vitro</i> de quimiocinas por CMN estimulados por mitógenos.....	34
5.7	Análise da expressão intracelular de CXCL8 em CMN de pacientes com UCI e indivíduos controles.....	38
5.8	Análise da expressão intracelular de CCL2 em CMN de pacientes com UCI e indivíduos controles.....	47
5.9	Análise da expressão de CCR5 em linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> de pacientes com UCI e indivíduos controles.....	51
6.	DISCUSSÃO.....	55
7.	CONCLUSÕES.....	65
8.	ANEXOS	
	<b>Anexo A</b> – Aprovação do protocolo de pesquisa pelo Comitê de Ética e Pesquisa do HCFMUSP.....	67
	<b>Anexo B</b> – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	68
	<b>Anexo C</b> – Características individuais dos pacientes com Urticária Crônica Idiopática.....	70
	<b>Anexo D</b> – Curvas de amplificação e dissociação (Real-Time PCR).....	73
	<b>Anexo E</b> – Manuscrito publicado.....	75
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

**LISTAS**

## LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Células apresentadoras de antígeno
ASST	<i>Autologous serum skin test</i>
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CCL	<i>Cysteine-Cysteine Chemokine Ligand</i>
CCR	<i>Cysteine-Cysteine Chemokine Receptor</i>
CMN	Células mononucleares do sangue periférico
CRP	<i>C-reactive protein</i>
CXCL	Cysteine-X-Cysteine Chemokine Ligand
CXCR	Cysteine-X-Cysteine Chemokine Receptor
DC	Célula Dendrítica
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FcεRI	Receptor de alta afinidade para imunoglobulina E
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
I.E	Índice de Estimulação
ICAM-1	<i>Intracellular cell adhesion molecule 1</i>
IFN-γ	Interferon-gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IP-10/CXCL10	<i>Interferon-inducible protein</i>
LPS	Lipopolissacáride
MCP-1/ CCL2	<i>Monocyte chemotactic protein-1</i>
MFI	Intensidade média de fluorescência
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MIG/ CXCL9	<i>Monokine induced by gamma interferon</i>
MIP1-α/CCL3	<i>Macrophage inflammatory protein 1 alpha</i>
MMP-9	<i>matrix metalloproteinase-9</i>
NC	Não consta
ND	Não determinado
NK	<i>Natural Killer</i>
PAMPS	Padrões Moleculares Associados aos Patógenos



PBS	Tampão Fosfato-Salino
PHA	Fitohemaglutinina
PWM	<i>Pokeweed mitogen</i>
RANTES	<i>Regulated on activation normal T cell expressed and secreted</i>
<i>Real Time</i> -PCR	Reação de polimerase em cadeia em tempo real
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
ROR <sub>γ</sub> T	<i>orphan nuclear hormone receptor</i>
SAB	Soro Albumina Bovina
SEA	Enterotoxina A de <i>Staphylococcus aureus</i>
SHIP	Src-homology 2 contendo 5' inositol fosfatase
Syc	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i>
Th	Células T auxiliares
TIMP-1	<i>inhibitors of metalloproteinases</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TMB	3, 3', 5, 5' tetrametilbenzidina
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral-alfa
TT	Toxóide tetânico
UC	Urticária Crônica
UCI	Urticária Crônica idiopática

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{M}$	Micromolar
mL	Mililitro
ng	Nanograma
pg	Picograma
rpm	Rotações por minuto
$\pm$	Mais ou menos
$\Delta$	Delta
<	Menor
>	Maior
$\uparrow$	Elevado
$\downarrow$	Diminuído
$\leq$	Menor ou igual
$\geq$	Maior ou igual
=	Igual
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
L.f	Limite de floculação

## LISTA DE FIGURAS

		Página
<b>Figura 1</b>	Determinação sérica de citocinas pró-inflamatórias na UCI.....	24
<b>Figura 2</b>	Correlação dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias na UCI.....	25
<b>Figura 3</b>	Produção <i>in vitro</i> de citocinas por CMN de pacientes com UCI....	28
<b>Figura 4</b>	Resposta linfoproliferativa a mitógenos e antígenos na UCI.....	29
<b>Figura 5</b>	Expressão espontânea de RNAm de citocinas de CMN de pacientes com UCI por <i>Real-Time</i> PCR.....	31
<b>Figura 6</b>	Determinação sérica de quimiocinas de pacientes com UCI.....	33
<b>Figura 7</b>	Níveis basais de quimiocinas em sobrenadantes de cultura na UCI.....	35
<b>Figura 8</b>	Determinação de quimiocinas induzidas por PHA na UCI.....	36
<b>Figura 9</b>	Determinação de quimiocinas induzidas por SEA na UCI.....	37
<b>Figura 10</b>	Figura representativa da seleção de células CD14 <sup>+</sup> de CMN por citometria de fluxo.....	40
<b>Figura 11</b>	Histograma representativo dos níveis intracelulares de CXCL8 em monócitos .....	41
<b>Figura 12</b>	Análise da expressão intracelular de CXCL8 em células CD14 <sup>+</sup> na UCI.....	42
<b>Figura 13</b>	Figura representativa da seleção de CD4 <sup>+</sup> e de CD8 <sup>+</sup> de CMN por citometria de fluxo.....	43
<b>Figura 14</b>	Histograma representativo da expressão intracelular de CXCL8 em linfócitos T .....	44
<b>Figura 15</b>	Análise da expressão intracelular de CXCL8 em células T CD4 <sup>+</sup> ...	45
<b>Figura 16</b>	Análise da expressão intracelular de CXCL8 em células T CD8 <sup>+</sup> ...	46
<b>Figura 17</b>	Histograma representativo da expressão intracelular de CCL2 em monócitos.....	48

<b>Figura 18</b>	Análise da expressão intracelular de CCL2 em células CD14 <sup>+</sup> na UCI.....	49
<b>Figura 19</b>	Histograma representativo dos níveis intracelulares de CCL2 em linfócitos T, basófilos e linfócitos B .....	50
<b>Figura 20</b>	Determinação da expressão de CCR5 em células T CD4 <sup>+</sup> na UCI.....	52
<b>Figura 21</b>	Determinação da expressão de CCR5 em células T CD8 <sup>+</sup> na UCI.....	53

## LISTA DE TABELAS

		Página
<b>Tabela 1</b>	Características demográficas dos pacientes com Urticária Crônica Idiopática.....	22
<b>Tabela 2</b>	Características individuais dos pacientes com Urticária Crônica Idiopática (Anexo C).....	70
<b>Tabela 3</b>	Níveis de citocinas em pacientes com UCI em relação à indivíduos saudáveis.....	58
<b>Tabela 4</b>	Níveis de quimiocinas em pacientes com UCI em relação à indivíduos saudáveis.....	63

**RESUMO**

Santos, J. C. Perfil de secreção e expressão de quimiocinas e citocinas na urticária crônica idiopática [Dissertação]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2010. 89p.

**INTRODUÇÃO:** A urticária crônica é caracterizada pelo aparecimento de placas eritemato-edematosas, pruriginosas, que perduram por mais de seis semanas. A etiologia é desconhecida na maioria dos pacientes sendo definida como idiopática (UCI). A desregulação imunológica na UCI pode ser devido a distúrbios na produção de citocinas e quimiocinas. **OBJETIVOS:** Avaliar o perfil citocinas e quimiocinas em pacientes submetidos ao teste de soro autólogo (ASST) avaliando os soros, a expressão de RNAm e a expressão intracelular de células mononucleares do sangue periférico (CMN) induzidas por estímulos policlonais. **METODOLOGIA:** Pacientes com UCI (n=37) foram selecionados do Ambulatório de Dermatologia do HC-FMUSP e submetidos ao ASST. O grupo controle foi constituído por indivíduos saudáveis (n=33). Os níveis séricos de citocinas e quimiocinas foram determinados por citometria de fluxo ou por ELISA e a expressão de RNAm de citocinas foi determinada por *Real-Time* PCR. **RESULTADOS:** Uma elevação dos níveis séricos de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12p70 e IL-10 foi detectada nos pacientes com UCI comparados ao grupo controle, independente da resposta ao ASST. A secreção *in vitro* de citocinas por CMN estimuladas por fitohemaglutinina (PHA) mostrou aumento da produção de IL-2 nos pacientes com UCI e de IL-17A e IL-10 no grupo ASST positivo em relação ao grupo controle. A expressão de RNAm para IL-10 em CMN, foi diminuída no grupo ASST negativo comparado ao grupo controle. Além disto, um aumento da capacidade linfoproliferativa ao mitógeno *Pokeweed* foi observado nos pacientes ASST positivo em relação aos indivíduos controles. Os níveis séricos de CXCL8, CCL2, CXCL10 e CXCL9 foram encontrados elevados nos pacientes com UCI em relação aos controles. A secreção de quimiocinas *in vitro*, foi observado aumento dos níveis basais de CCL2 pelas CMN dos pacientes em relação aos controles, que se elevaram em resposta a enterotoxina A de *Staphylococcus aureus* (SEA). Já o estímulo com PHA promoveu aumento na produção de CXCL8 e CCL5 pelas CMN dos pacientes. A expressão intracelular de CXCL8 foi detectada principalmente nas células CD14<sup>+</sup>. A intensidade média de fluorescência (MFI) e a porcentagem da expressão de CXCL8 em CD14<sup>+</sup> nos níveis basais e estimulados com SEA encontram-se diminuídos nos pacientes com UCI comparado ao grupo controle. A expressão intracelular de CCL2 em células CD14<sup>+</sup> mostrou uma queda na porcentagem dos níveis basais somente nos pacientes ASST negativo em relação ao grupo controle. Além disto, em condições basais de cultura houve um aumento na porcentagem da expressão de CCR5 em células T CD8<sup>+</sup> de pacientes com UCI, em função do aumento no grupo ASST positivo. **CONCLUSÕES:** Os resultados enfatizam o conceito de desequilíbrio imunológico na UCI, independente da resposta ao ASST, evidenciado pelo aumento na secreção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias. Estes dados sugerem que na UCI, os linfócitos e monócitos estão ativados, os quais podem contribuir para a imunopatogênese da doença.

## **SUMMARY**



Santos, J. C. Profile of chemokine and cytokine secretion and expression in chronic idiopathic urticaria [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2010. 89p.

**INTRODUCTION:** Chronic urticaria is skin disorder characterized by recurrent and transitory itchy weals occurring regularly for more than 6 weeks. The aetiology is not identified in most patients being considered as idiopathic (CIU). The immunological dysregulation in CIU could be due to a disturbed cytokines and chemokines production.

**OBJECTIVES:** To evaluate the pattern of cytokine and chemokine in CIU patients who undergone autologous serum skin test (ASST), assessing sera, mRNA expression and intracellular expression of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) through the secretion upon induced by polyclonal stimuli.

**METHODS:** CIU patients (n=37) were selected from the Dermatological Outpatient Clinic of the Hospital das Clínicas de São Paulo (HC-FMUSP) and submitted to the ASST. The control group consisted of healthy subjects (n=33). Cytokine and chemokine levels were assessed by flow cytometer and ELISA and mRNA expression was analyzed by *Real-Time* PCR.

**RESULTS:** Elevated levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12p70 and IL-10 were observed in sera from CIU patients compared to healthy control group. CIU patients also showed increased IL-2 production by PBMC stimulated with phytohemagglutinin (PHA). Moreover, it was observed higher IL-17A and IL-10 levels in the ASST+ group compared to control group. The IL-10 mRNA expression was diminished in the ASST- group compared to control group. Furthermore, an increased lymphoproliferative response to Pokeweed mitogen was observed in the ASST+ patients compared to healthy subjects. Seric levels of CXCL8, CCL2, CXCL10 and CXCL9 were higher in CIU patients. Regarding the *in vitro* chemokines secretion, it was detected higher basal levels of CCL2 in CIU patients, which was increased by *Staphylococcus aureus* enterotoxin A (SEA). Stimulation with PHA increased the CXCL8 and CCL5 production by CIU mononuclear cells. The main source of CXCL8 was the CD14<sup>+</sup> cells. CIU CD14<sup>+</sup> cells showed decreased mean fluorescence intensity and percentage of CXCL8 expression with and without SEA stimuli. The percentage of CD14<sup>+</sup> producing CCL2 was lower in ASST- patients compared to healthy control subjects. Furthermore, in the absence of stimuli the percentage of CCR5-expressing CD8<sup>+</sup> T cells was higher in CIU patients, mainly due to an increased expression by the ASST+ group.

**CONCLUSIONS:** These results indicate an immunological dysregulation in CIU, without association to ASST response, which was evidenced by the increased production of pro-inflammatory cytokines and chemokines. The data suggest a higher activation of monocytes and lymphocytes in CIU, which may contribute to its immunopathogenesis.

## **1 INTRODUÇÃO**

## 1.1 Urticária Crônica Idiopática

Afecções dermatológicas são capazes de reduzir significativamente a qualidade de vida, sendo que uma das mais comuns é a urticária, que afeta de 15 a 25% da população em geral. A urticária crônica caracteriza-se pelo aparecimento de placas eritemato-edematosas que podem ser acompanhadas de prurido que se agravam no período noturno e pode ser classificada de acordo com a duração dos sintomas, sendo denominada aguda quando os sintomas perduram por menos que 6 semanas e crônica quando persistem por mais tempo <sup>(1)</sup>.

A urticária crônica acomete aproximadamente 0,1% da população <sup>(1)</sup> numa proporção de duas mulheres para cada homem <sup>(2)</sup>. As lesões características da urticária se devem a desgranulação de mastócitos e basófilos que liberam potentes mediadores vasoativos capazes de causar aumento da permeabilidade vascular, resultando na formação de placas eritemato-edematosas <sup>(3)</sup>. A duração das lesões varia entre 4 a 36 horas e o espectro da doença depende da frequência, número, distribuição das lesões, intensidade do prurido, e sintomas associados com angioedema, presente em 40% dos casos <sup>(4)</sup>. O prurido e a dor são consequências da estimulação de nervos sensoriais <sup>(5)</sup>.

A desgranulação das células inflamatórias se deve a causas imunológicas (autoimune, IgE, imunocomplexos, complemento), não imunológicas (pseudoalérgica, contato com substâncias tóxicas irritantes, defeito enzimático) e idiopática, quando não é possível determinar a etiologia.

Os casos mais graves de UC são de difícil tratamento, e a gravidade dos sintomas parece depender do grau de ativação das células inflamatórias, da liberação de histamina e da ativação do sistema complemento <sup>(1,6)</sup>.

Aproximadamente 70 a 80% dos casos da UC são considerados idiopáticos. Um grande avanço na compreensão da patogênese da urticária crônica idiopática (UCI) foi a evidência de que 35 a 40% dos pacientes apresentam origem autoimune, sendo não estritamente idiopática, pois apresentam autoanticorpos contra a cadeia  $\alpha$  do receptor de alta afinidade para IgE (Fc $\epsilon$ RI). Cerca de 5 a 10% dos pacientes apresentam IgG ou IgM anti-IgE capaz de promover a liberação de histamina de mastócitos e basófilos <sup>(7)</sup>.

O teste cutâneo denominado teste intradérmico de soro autólogo (ASST, *autologous serum skin test*) evidencia a presença dos autoanticorpos anti-FcεRI e/ou anti-IgE pela desgranulação de mastócitos da pele e formação de pápulas. Este teste tem sido recomendado como triagem nos casos suspeitos de UC <sup>(1)</sup>. Porém o teste padrão de laboratório para o diagnóstico e avaliação de UC de origem autoimune é o ensaio de liberação de histamina, sendo que há correlação entre os dois testes, pois pacientes com ASST positivo apresentaram positividade no teste *in vitro* de liberação de histamina, enquanto que não há liberação de histamina em pacientes com ASST negativo <sup>(8)</sup>.

Na UC, podem ser detectáveis também anticorpos reativos a tecidos tireoidianos, o que sugere associação desta doença com a doença autoimune da tireóide <sup>(9)</sup>. A prevalência de autoanticorpos anti-tireóide na UC tem sido estimada de 12 a 29% <sup>(10)</sup>. Além disto, a evidência de doença autoimune da tireóide e função anormal tireoideana é mais encontrada em pacientes com teste de soro autólogo positivo, o que corrobora a teoria da etiologia autoimune da UC <sup>(11)</sup>. Entretanto, estes autoanticorpos anti-tireóide não parecem ser os agentes causadores diretos da UC. Em crianças (4-15 anos) com UC foram observados altos títulos de anticorpos anti-nucleares (2% dos casos) sendo que o ASST foi positivo em 38% dos casos <sup>(12)</sup>.

Recentes estudos têm como foco diagnóstico e tratamento da UCI <sup>(7)</sup> assim como a compreensão do papel dos basófilos e mastócitos e de fatores da coagulação na patogenia da doença <sup>(13)</sup>.

Em biópsias de pele de pacientes com UCI observou-se que o número de mastócitos não está aumentado, porém, possuem maior capacidade de liberar histamina, apresentam um tecido edematoso com dilatação vascular e um infiltrado perivascular composto de linfócitos CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, eosinófilos, neutrófilos e basófilos <sup>(4)</sup>.

Um tipo celular frequentemente implicado no desenvolvimento da UCI é o basófilo <sup>(14)</sup>. Pacientes basopênicos são encontrados na UCI, e a basopenia é inversamente relacionada à gravidade da doença <sup>(15)</sup>. Uma das possíveis explicações seria o recrutamento dos basófilos para a pele <sup>(16)</sup>. Outra possibilidade seria a desgranulação destes por fatores circulantes presentes no soro de pacientes com UCI, capazes de ativar os basófilos e mastócitos. Moléculas de ativação presentes na superfície de basófilos servem como marcadores capazes de avaliar o grau de

ativação celular em indivíduos atópicos e pacientes com UCI. Foi demonstrado que marcadores de ativação e desgranulação como CD63 e CD203c estão aumentados nos basófilos de pacientes com UCI, e que são hiperreativos a IL-3, na resposta aos anticorpos anti-IgE <sup>(17)</sup>. Outros estudos demonstraram uma expressão alterada de Syc (*spleen tyrosine kinase*), molécula envolvida na liberação de histamina após sinalização via FcεRI, bem como uma expressão alterada de SHIP1 e SHIP2 (*homology 2 contendo 5' inositol fosfatase*), moléculas envolvidas na inibição da ativação <sup>(18)</sup>. Níveis diminuídos de SHIP1 foi observado em pacientes com UC respondedores ao estímulo com anti-IgE, já nos pacientes com UC não respondedores foi evidenciado uma diminuição da liberação de histamina, correlacionando com os níveis aumentados de SHIP1 e SHIP2 <sup>(19)</sup>.

O envolvimento de fatores da cascata de coagulação e fibrinólise são relatados na UCI em resposta ASST. O soro autólogo de pacientes com UCI quando injetado intradermicamente é capaz de induzir a liberação de histamina mesmo quando há depleção de IgG, o que sugere que outros fatores circulantes, além de autoanticorpos contra o FcεRI ou a IgE possam estar envolvidos na patogenia da doença <sup>(20)</sup>. Demonstrações da correlação positiva entre produtos de degradação da fibrina, d-dímero e proteína C reativa em pacientes com UC <sup>(21)</sup>.

Outro fator importante e pouco relatado no estudo da patogênese da UCI é o perfil de produção de citocinas e quimiocinas, em pacientes com ou sem hiperreatividade ao ASST.

## **1.2 Citocinas na Urticária Crônica Idiopática**

As citocinas são proteínas com funções de crescimento, diferenciação e ativação que regulam e determinam a natureza da resposta imunológica. Podem ser produzidas por tipos distintos de células, incluindo T CD4 auxiliaadoras (*T helper*), as células Th1 e Th2. As células Th1 secretam citocinas pró-inflamatórias, como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , enquanto as células Th2 produzem citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10 <sup>(22)</sup>.

Em geral, as citocinas possuem ação anti-inflamatória e pró-inflamatória, cuja função depende das células imunes presentes no local e do grau de resposta a estes

fatores. Citocinas como a IL-2, TNF- $\alpha$ , interferons tipo I (IFN-  $\alpha$  e  $\beta$ ) e II (IFN- $\gamma$ ) e a IL-17 tem sido amplamente estudadas nas doenças autoimunes, devido a sua natureza pró-inflamatória.

A IL-17 é importante na iniciação e manutenção de processos inflamatórios, estando envolvida na produção de outras citocinas pró-inflamatórias. É constituída pelas isoformas: IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e IL-17F, sendo as isoformas A e F, produzidas pelas Th17, uma população de específica de células T CD4<sup>+</sup> <sup>(23)</sup> que expressam o fator de transcrição *orphan nuclear hormone receptor* (ROR $\gamma$ T). Funcionalmente, as células Th17 contribuem para a defesa do hospedeiro contra bactérias extracelulares e são importantes no desenvolvimento de doenças alérgicas, como asma e dermatite alérgica de contato <sup>(24)</sup>. Além disto, as células Th17 parecem exercer um papel na patogênese das doenças autoimunes e inflamatórias crônicas, como a psoríase, dermatite atópica <sup>(25)</sup> e mais recente o lúpus sistêmico <sup>(26)</sup>.

As evidências sobre o perfil de produção de citocinas na UC, em pacientes com ou sem autoanticorpos anti-Fc $\epsilon$ RI, ainda não são conclusivos, muitas vezes controversos, principalmente devido as diferenças metodológicas aplicadas nos estudos.

Nas lesões de pele de pacientes com UC, verificou-se um aumento da expressão de citocinas e mediadores inflamatórios. Estudos *in situ* das pápulas de pacientes com UC evidenciam um aumento da expressão de E-selectina e de ICAM-1 (*intracellular cell adhesion molecule 1*), associado a elevados níveis de TNF- $\alpha$ , IL-4 e leucotrieno C4 (LCT4) <sup>(27)</sup>. Outro estudo imunoistoquímico das pápulas de pacientes ASST+ mostrou um perfil inflamatório com resposta mista Th1/Th2 e importante infiltração neutrofílica <sup>(16)</sup>. Em 2003, Caproni e colaboradores <sup>(28)</sup> demonstraram maior prevalência de citocinas Th2 como IL-4 e IL-5 em pacientes com UCI enquanto que em outro estudo verificou-se o aumento de TNF- $\alpha$  e IL-3 nas lesões de pele de pacientes com urticária aguda, crônica e de contato <sup>(29)</sup>.

Estudos relacionados à detecção de citocinas no soro de pacientes com UCI são mais escassos. Entretanto, tem sido observado aumento dos níveis de IL-13 em pacientes ASST+, e níveis séricos similares de IFN- $\gamma$  e IL-4 entre os grupos ASST+ e ASST- <sup>(30)</sup>. Uma das hipóteses é que a IL-13 poderia aumentar a expressão do receptor Fc $\epsilon$ RI nos mastócitos com a consequente liberação de mediadores levando

ao aumento da inflamação cutânea. Na avaliação sérica de IL-18 de pacientes com UC, foram detectados níveis similares entre os pacientes com ASST positivo e negativo <sup>(31)</sup>. Entretanto, aumento dos níveis de IL-18 nos pacientes com ASST positivo correlacionou à gravidade clínica dos pacientes.

Há descrição de que as células T CD4<sup>+</sup> de pacientes com UC estão ativadas e secretam mais IFN- $\gamma$  e IL-4 quando estimuladas com PMA (*phorbol myristate acetate*) em relação aos indivíduos controle <sup>(32)</sup>. Em contraste, outro estudo evidenciou diminuição na produção de IL-2, IFN- $\gamma$  e de IL-4 por células mononucleares estimuladas com PHA, principalmente no grupo ASST positivo, sugerindo modulação negativa das células Th1/Th2 na UC <sup>(33)</sup>. Significativa diminuição na produção de IFN- $\gamma$  foi observada em pacientes com UC, mesmo quando subdivididos quanto ao teste de soro autólogo <sup>(34)</sup>. Por outro lado, os autores também observaram aumento na produção de IL-10 e TNF- $\alpha$  em resposta a PHA e LPS dos pacientes com UC em relação ao grupo controle. Nossos resultados prévios mostram que na UCI há um aumento dos níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-12p70 e IL-6 associados a um desequilíbrio na produção de citocinas induzidas por PHA, como a IL-2, IL-17A e IL-10 <sup>(35)</sup>. Estas alterações observadas foram independentes do ASST, ou seja, acometendo a maioria dos pacientes com UCI. Estes dados salientam o conceito de desequilíbrio da produção de citocinas na UCI, possivelmente decorrente de alterações na produção de citocinas com potencial regulatório, e desta forma, a importância em investigar o perfil de citocinas na UCI.

### **1.3 Quimiocinas na Urticária Crônica Idiopática**

As quimiocinas são os principais mediadores da migração leucocitária para o foco inflamatório, podendo exercer um papel benéfico ou não ao organismo, seja por estimular uma adequada resposta imunológica à invasão de patógenos, ou por mediar a destruição de tecidos, como nas doenças autoimunes. São secretadas em resposta as citocinas pró-inflamatórias, capazes de promover a quimiotaxia de uma ampla variedade de células, incluindo neutrófilos, monócitos, linfócitos, eosinófilos, fibroblastos e queratinócitos<sup>(36)</sup>.

Compõem um grupo de pequenas moléculas (8 a 12 kD) que possuem cerca de 20 a 50% de homologia e são caracterizadas pela presença de três a quatro resíduos conservados de cisteína. O número e o espaçamento entre a primeira cisteína na seqüência de aminoácidos são utilizados para classificar quatro subfamílias: C, CC, CXC e CX3C. Quando há duas cisteínas adjacentes na região aminoterminal são pertencentes a subfamília CC também conhecidas como família  $\beta$ , que compreende as quimiocinas de CCL1 a CCL27. Da mesma forma, as quimiocinas CXCL1 a CXCL15 são pertencentes a subfamília CXC, também conhecida como a família  $\alpha$ , onde é encontrado um outro aminoácido entre duas cisteínas <sup>(37)</sup>. Outras quimiocinas como CCL21 e CXCL13 são fatores considerados homeostáticos, que orientam o *homing* e a motilidade dos linfócitos e das células dendríticas nos tecidos linfóides <sup>(38)</sup>. A magnitude da resposta imune depende da capacidade modulatória exercida pelas quimiocinas homeostáticas.

As quimiocinas ainda podem ser classificadas em duas principais subfamílias funcionais: as inflamatórias e as homeostáticas. As quimiocinas inflamatórias controlam o recrutamento de leucócitos na inflamação e lesão tecidual, enquanto que as homeostáticas têm função de direcionar os leucócitos para os órgãos linfóides secundários, medula óssea e timo, durante a hematopoiese, e também de colaborar com a angiogênese <sup>(39)</sup>.

Uma vez induzidas, vão atuar nas células que expressam os receptores apropriados (36). As quimiocinas C-C interagem com pelo menos 11 receptores distintos (CCR1-CCR11), enquanto as quimiocinas C-X-C interagem com 5 receptores (CXCR1-CXCR5) <sup>(40)</sup>.

Possuem uma variedade de funções além da quimiotaxia, visto que as quimiocinas CCL3, CCL4 e CCL5 podem diretamente promover o desenvolvimento de linfócitos Th1, através da produção de IFN- $\gamma$ , ou indiretamente através do aumento da produção de IL-12 pela APC (Célula apresentadora de antígeno). Em contraste, CCL2, CCL17, CCL8, CCL13 podem inibir a produção de IL-12 pela APC e assim favorecem a produção de IL-4 de células T ativadas direcionando sua diferenciação para o fenótipo Th2 <sup>(41)</sup>.

Devido o seu efeito biológico as quimiocinas CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9 e CXCL10 podem estar implicadas na patogênese na urticária crônica idiopática.



O CCL2 (*monocyte chemoattractant protein 1 – MCP1*) é um membro da família de quimiocinas C-C, e um potente fator quimiotático para monócitos. É produzido por uma variedade de tipos celulares como células endoteliais, células da musculatura lisa, astrócitos, fibroblastos e monócitos. Regula a migração e infiltração de células que possuem o seu receptor o CCR2<sup>(42)</sup>, como monócitos, linfócitos T de memória e células NK (*natural killer*)<sup>(36)</sup>.

Assim como o CCL2, o CCL5 também é uma  $\beta$  quimiocina, conhecida como RANTES (*Regulated on Activated Normal T-Cell Expressed and Secreted*), responsável por atrair monócitos, linfócitos T, eosinófilos e basófilos para o sítio inflamatório<sup>(43-45)</sup>. Promove a desgranulação de basófilos, *burst* respiratório em eosinófilos e ativação de linfócitos T<sup>(46-48)</sup>, ligando-se aos seus receptores específicos, CCR1, CCR3 e CCR5 nas células alvos<sup>(42)</sup>.

Entre as  $\alpha$  quimiocinas (C-X-C), a IL-8 (CXCL8), é uma quimiocina pró-inflamatória secretada por monócitos, macrófagos, fibroblastos e células endoteliais (49-52), promovendo a quimiotaxia de neutrófilos pela interação com os receptores CXCR1 e CXCR2<sup>(42, 53)</sup>. Já a CXCL10 (*interferon-inducible protein 10 - IP-10*) é quimioatraente para monócitos e células T, promovendo a adesão de células T às células endoteliais e pode participar da regulação da angiogênese<sup>(54)</sup>. É produzido por uma variedade de células, como linfócitos T, macrófagos, células endoteliais e astrócitos<sup>(55)</sup>. Outra  $\alpha$  quimiocina é a CXCL9 (*Monokine induced by gamma interferon – MIG*), que é responsável pelo recrutamento de células T ativadas e, assim como a CXCL10 são induzidas por IFN- $\gamma$ . CXCL10 e CXCL9 compartilham o receptor CCR3<sup>(42)</sup>.

Tem sido descrito a participação de proteínas quimiotáticas em doenças autoimunes, como artrite reumatóide, lúpus e esclerose múltipla<sup>(56-57)</sup>. Na artrite reumatóide, os níveis de MIP1- $\alpha$ /CCL3 (macrophage inflammatory protein 1 alpha) e MIP-2 estão aumentados nas articulações artríticas, e correlacionam com a gravidade da doença<sup>(58)</sup>. Além disto, CXCL8 e CCL2 também são detectadas no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide<sup>(59)</sup>. Tem sido descrito que as quimiocinas da família CXC, como a CXCL10 exercem um importante papel em doenças autoimunes endocrinológicas, como na tireoidite de Hashimoto<sup>(60)</sup>, na doença de Graves<sup>(60)</sup> e na *diabetes mellitus* tipo I<sup>(61-62)</sup>.

Assim como as citocinas, as quimiocinas também são raramente estudadas na UCI. Estudos relatam níveis séricos de CCL3 no grupo ASST- e níveis indetectáveis de CCL17 e CXCL10 <sup>(30)</sup>. Outros relatam um aumento de CCL3 e CCL5 em sobrenadantes de culturas de CMN estimuladas com fitohemaglutinina (PHA) <sup>(34)</sup>.

As alterações na produção de quimiocinas e de citocinas, sejam pró ou anti-inflamatórias podem ser fatores para a instalação e desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas e/ou autoimunes. A caracterização da produção e da expressão de quimiocinas e de citocinas na UCI poderá contribuir para a compreensão da cronicidade das lesões nesta doença, em presença ou não de autoanticorpos anti-FcεRI.

## **2 OBJETIVOS**

O projeto teve como objetivo avaliar o perfil de produção de citocinas e quimiocinas nos pacientes com Urticária Crônica Idiopática, submetidos ao teste intradérmico de soro autólogo e comparados com indivíduos sadios.

**Primeira etapa:**

- Determinação dos níveis séricos de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12p70 e IL-10 por Citometria de fluxo;
- Análise *in vitro* da produção de citocinas de células mononucleares do sangue periférico estimuladas por fitohemaglutinina (PHA) por ensaio imunoenzimático (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-2, IL-4 e IL-10);
- Análise da expressão de RNAm de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10 em CMN *ex vivo* por Real Time PCR, e
- Resposta linfoproliferativa à mitógenos de células T e B (PHA e *pokeweed*) e ao antígeno toxoide tetânico;

**Segunda etapa:**

- Determinação dos níveis séricos de CXCL8, CXCL10, CXCL9, CCL2 e CCL5 por citometria de fluxo;
- Produção de quimiocinas de células mononucleares do sangue periférico estimuladas por PHA e por enterotoxina A de *Staphylococcus aureus* (SEA) por ensaio imunoenzimático (CXCL8, CXCL10, CCL2 e CCL5);
- Avaliar a expressão intracelular de CXCL8 e CCL2 em CMN na população CD14<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> sob estímulo de SEA e PHA, respectivamente por citometria de fluxo e,
- Análise da expressão do receptor CCR5 na população T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> sob estímulo de PHA por citometria de fluxo.



Pacientes com quadro de urticária crônica (UC) com sintomas recorrentes acima de seis semanas de duração foram selecionados no Ambulatório de Urticária do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HC-FMUSP). Foram incluídos 37 pacientes, sendo 31 mulheres e 6 homens, idade  $47,11 \text{ anos} \pm 12,37$ , com variação de 19 a 67 anos.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de ética do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (Cappesq nº 1016/07) (**ANEXO A**).

O grupo controle foi composto por 33 indivíduos saudáveis, idade  $40,28 \text{ anos} \pm 9,834$ , com variação de 23 a 60 anos, do Instituto de Medicina Tropical, sem história de urticária, de ambos os sexos e com idade acima de 18 anos.

Os pacientes e indivíduos controles foram informados ao termo de consentimento e livre esclarecido para posteriormente serem incluídos no estudo (**ANEXO B**).

### **Critérios de exclusão**

Pacientes com evidência clínica de urticária-vasculite ou urticária física, constituíram critérios de exclusão. O uso de anti-histamínicos foi evitado por pelo menos 48 horas antes da coleta da amostra para a realização do ASST. Nenhum paciente fazia uso de medicação imunossupressora.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **4.1 Obtenção de células mononucleares (CMN) do sangue periférico**

Amostras de sangue periférico foram coletadas em tubo heparinizado estéril, diluídas, volume a volume, em solução fisiológica e centrifugadas por 20 minutos a 2200 rpm em solução gradiente de Ficoll-Hypaque (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, EUA) para obtenção de CMN. Após duas lavagens em meio de cultura RPMI-1640 (Inlab, Diadema, SP, BR) suplementado com gentamicina (10 µg/mL, Novafarma, SP, BR) a 1100 rpm por 10 minutos, as células obtidas foram quantificadas em contador automático (Cell Dyn 1400, Abbot) e a concentração de células foi ajustada de acordo com o ensaio a ser realizado. A viabilidade celular foi observada com auxílio do corante Azul de tripan.

#### **4.2 Resposta linfoproliferativa e obtenção de sobrenadantes de culturas após estímulo *in vitro* com mitógenos e antígenos**

A suspensão de CMN, obtida como descrito no item 4.1, diluídas em meio RPMI-1640 enriquecido com 10% de soro AB humano (Sigma, Steinheim, Alemanha) inativado (RPMI-S), foi distribuída na concentração de  $2,0 \times 10^5$  células por orifício e cultivadas em placas de 96 orifícios (Costar, Cambridge, MA, USA) com fitohemaglutinina (PHA, 2,5 µg/mL; Gibco BRL, NY, USA), pokeweed (PWM, 5 µg/mL; Sigma, St. Louis, MO, USA) ou com Toxóide tetânico (TT, 0,04 Lf/mL; Instituto Butantã, São Paulo, Brasil) a 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Para análise da resposta linfoproliferativa as células foram cultivadas em triplicata por três ou seis dias e pulsadas com 1 mCi/well de <sup>3</sup>H-Thymidine (New England Nuclear, USA) por orifício, 18 horas antes de serem coletadas. A radioatividade incorporada pelas células foi determinada em contador de cintilação beta (1205 Betaplate, Wallac, USA). Os resultados foram expressos pela contagem das triplicatas e pelo cálculo do I.E (Índice de Estimulação: média do cpm da cultura estimulada/ média do cpm da cultura não estimulada).

Para análise das quimiocinas e citocinas nos sobrenadantes de culturas, as CMN foram distribuídas na concentração de  $3 \times 10^6$  células/orifício em



microplacas de 24 orifícios (Costar, Cambridge, MA, USA) com meio de cultura RPMI-S cultivadas na presença de PHA (2,5 µg/mL, Gibco, NY, EUA) e enterotoxina A de *Staphylococcus aureus* (SEA, 40 ng/mL) por 24 e 48 horas de incubação a 37° C em estufa a 5% de CO<sub>2</sub>. Os sobrenadantes das culturas foram coletados, centrifugados a 1000 rpm por 5 minutos, aliqüotados e congelados a -80° C para posterior dosagem de citocinas e quimiocinas.

### **4.3 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para dosagem de citocinas e quimiocinas**

A determinação de IL-17A foi realizada em sobrenadantes de culturas de CMN estimuladas por 48 horas com PHA, as quimiocinas (CXCL8, CCL2, CCL5 e CXCL-10) foram analisadas nos sobrenadantes de CMN estimuladas por PHA e SEA e os níveis séricos de RANTES realizados por ELISA, seguindo as especificações do fabricante (R&D Systems Corporation, Minneapolis, MN). Resumidamente, microplacas com 96 orifícios (A-2, Costar) foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais anti-quimiocinas/citocinas diluídos em PBS e incubadas por 18 horas à temperatura ambiente. As placas foram bloqueadas com PBS/Soro Albumina Bovina 4% (SAB, Sigma) e incubadas por uma hora à 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 uma hora à temperatura ambiente e após o término deste período, os respectivos anticorpos anti-quimiocinas/citocinas conjugados à biotina foram adicionados às placas e incubados por 1 hora à temperatura ambiente. A seguir, após um ciclo de três lavagens, foi adicionada estreptoavidina peroxidase do kit por 20 minutos à temperatura ambiente. Após novas lavagens, substrato 3, 3', 5, 5' tetrametilbenzidina (TMB, Zymed, São Francisco, CA, EUA) foi adicionado às placas e a reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 1 M. A leitura foi realizada em leitor de microplacas de ELISA (Molecular Devices, CA, EUA) a 450 nm.

Limites de detecção: CXCL8 (7,81 pg/mL), CCL5 (7,81 pg/mL), CCL2 (23,44 pg/mL), CXCL10 (3,91 pg/mL), IL-17A (15,62pg/mL).

#### **4.4 Determinação de citocinas e quimiocinas por citometria de fluxo (Cytometric Bead Array - CBA)**

As dosagens de citocinas no soro e sobrenadantes de cultura estimuladas por 24 horas com PHA e quimiocinas no soro de pacientes e do grupo controle foram realizadas pelo método *Cytometric Bead Array* (CBA), utilizando-se os kits: Th1/Th2 (IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF), *Human Inflammation* (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-12p70) e *Human Chemokine*, (CXCL8, CXCL9, CCL2, CXCL10) (BD Pharmingen, CA, USA). Em resumo, os soros e os padrões de citocinas do kit foram incubados com microesferas de captura recobertas com anticorpos específicos para as respectivas citocinas/quimiocinas e com o anticorpo de detecção marcado com ficoeritrina (PE). Após as incubações, foi acrescentado 1mL da solução de lavagem e centrifugado por 10 minutos a 1100 rpm. O sobrenadante foi desprezado e com 300 $\mu$ L da solução de lavagem as amostras foram ressuspendidas para as aquisições em citômetro de fluxo, BD FACS Calibur (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). Os resultados foram gerados em formato gráfico e tabular utilizando o BD CBA Analysis Software.

##### Limites de detecção:

CBA *Human Inflammation*: IL-1 $\beta$  (7,2 pg/mL), IL-6 (2,5 pg/mL), IL-10 (3,3 pg/mL), TNF- $\alpha$  (3,7 pg/mL), IL-12p70 (1,9 pg/mL).

CBA Th1/Th2: IL-2 (2,6 pg/mL), IL-4 (2,6 pg/mL), IL-10 (2,8 pg/mL), TNF- $\alpha$  (2,8 pg/mL), IFN- $\gamma$  (7,1 pg/mL).

CBA *Human Chemokine*: CXCL8 (0,2 pg/mL), CCL5 (1,0 pg/mL), CXCL9 (2,5 pg/mL), CCL2 (2,7 pg/mL), CXCL10 (2,8 pg/mL).

#### **4.5 Expressão de RNAm de citocinas por reação de polimerase em cadeia em tempo real**

A análise da expressão de RNAm por *Real Time*-PCR foi realizada em CMN, não estimuladas. O RNA total de  $1 \times 10^6$  CMN congelado em solução de RNA

later (Sigma, Steinheim, Alemanha) foi extraído com o *QIAamp® RNA Blood Mini Kits* (Qiagen, Valencia, CA, EUA), seguindo as orientações fornecidas pelo fabricante. O cDNA foi sintetizado utilizando o kit *Sensiscript Reverse Transcription Handbook* (Qiagen, Valencia, CA, EUA). Para a realização da reação de amplificação em tempo real, foram utilizados 3µL cDNA (1 a 10µg), 25µL da solução *Platinum SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1µL de *ROX Reference Dye*, 19µL de água destilada Rnase/DNase free e 1µL (10µM) dos iniciadores sense e anti-sense. A síntese dos iniciadores sense e anti-sense para IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN-γ e TNF-α, e do controle interno albumina humana foi realizada pela Invitrogen (Carlsbad, CA). O Real-Time PCR foi realizado no termociclador iCycler (BioRad, EUA). Os dados obtidos foram interpretados com o programa iCycler iQ Program (BioRad). As condições de amplificação foram: desnaturação 45 ciclos à 95°C por 15 segundos, anelamento dos iniciadores 45 ciclos à 62°C por 5 segundos, extensão 45 ciclos à 72°C por 15 segundos. Temperatura de *Melting* (Tm): 70°C.

As seqüências dos iniciadores foram às seguintes:

**Albumina** Sense: 5'GCT GTC ATC TCT TGT GGG CTG T3',  
 Antisense: 5'AAA CTC ATG GGA GCT GCT GGT T 3'

**IL-2** Sense: 5' AGT CCC TGG GTC TTA AGT GAA AG3'  
 Anti-Sense: 5' CAA GAA GGC CAC AGA ACT GAA 3'

**IL-4** Sense: 5' ACA GCC TCA CAG AGC AGA AGA CT 3'  
 Anti-Sense: 5' TGT TCT TGG AGG CAG CAA AGA 3'

**IL-6** Sense: 5'CCT GAG AAA GGA GAC ATG TAA CAA GA 3'  
 Anti-Sense: 5' GGC AAG TCT CCT CAT TGA AT CC 3'

**IL-10** Sense: 5' GCT GGA GGA CTT TAA GGG TTA CCT 3'  
 Anti-Sense: 5' CTT GAT GTC TGG GTC TTG GTT GT 3'

**IFN-γ** Sense: 5' GTT TTG GGT TCT CTT GGC TGT TA 3'  
 Anti-Sense: 5' AAA AGA GTT CCA TTA TCC GCT ACA TC 3'

**TNF-α** Sense: 5'CCC AGG CAG TCA GAT CAT CTT C 3'  
 Anti-Sense: 5'GCT TGA GGG TTT GCT ACA ACA TG 3'

Os resultados foram expressos como número de cópias das citocinas por  $10^6$  cópias de albumina.

#### **4.6 Análise da expressão intracelular de CXCL8 e CCL2 por citometria de fluxo**

A suspensão de CMN, foi distribuída na concentração de  $3 \times 10^6$  células/orifício em microplacas de 24 orifícios (Costar, Cambridge, MA, USA) com RPMI-S, na presença ou ausência do superantígeno SEA ( $1 \mu\text{g/mL}$ , Sigma) ou do estímulo policlonal para células T, a PHA ( $2,5 \mu\text{g/mL}$ , Gibco, NY, EUA), na presença de  $10 \mu\text{g/mL}$  de inibidor de transporte de proteína intracelular (Brefeldina A, Sigma) por 18 horas de incubação à  $37^\circ \text{C}$  em estufa a 5% de  $\text{CO}_2$ . Ao término da incubação as células foram coletadas, divididas em tubos de citometria, e lavadas em PBS/ Azida 0,1%/ SAB 0,2%. A seguir, as células foram incubadas por 10 minutos à  $4^\circ \text{C}$  com  $10 \mu\text{l}$  de gamaglobulina humana para saturar os receptores de IgG e marcadas com anticorpos monoclonais, conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) ou ficoeritrina-cianina 5.1 (PC5) com os seus respectivos controles isotípicos.

As células estimuladas com SEA foram marcadas com anti-CD14 PC5 (Iotest) e as células estimuladas com PHA foram marcadas com anti-CD3 PC5 e anti-CD8 FITC (BD pharmingen) por 30 minutos à  $4^\circ \text{C}$  protegido da luz. Após uma lavagem com PBS/ Azida 0.1%/ SAB 0.2%, as células foram fixadas com  $100 \mu\text{l}$  do reagente A (*Fixation Medium* – Caltag) por 15 minutos em temperatura ambiente, lavadas com PBS/ Azida 0.1%/ SAB 0.2%, e permeabilizadas com  $100 \mu\text{l}$  do reagente B (*Permeabilization Medium* – Caltag). A marcação intracelular foi realizada acrescentando-se anti-CXCL8 PE (BD pharmingen) ou anti-CCL2 PE (eBioscience) ou com os respectivos anticorpos isotípicos por 20 minutos à temperatura ambiente. As células foram lavadas, ressuspendidas em  $700 \mu\text{l}$  PBS/ Azida 0.1%/ SAB 0.2% e o número relativo de cada população foi avaliado pela aquisição de 10.000 eventos em aparelho de citometria de fluxo (Coulter-Epics) utilizando o programa System II Versão 3.0 (Beckman Coulter, Inc-USA).

#### **4.7 Análise da expressão de CCR5 em linfócitos T por citometria de fluxo**

A suspensão de CMN, foi distribuída na concentração de  $3 \times 10^6$  células/orifício em microplacas de 24 orifícios (Costar, Cambridge, MA, USA) com RPMI-S, na presença ou ausência de PHA (2,5 µg/mL, Gibco, NY, EUA), por 18 horas de incubação à 37° C em estufa a 5% de CO<sub>2</sub>. Ao término da incubação as células foram coletadas, divididas em tubos de citometria, e lavadas em PBS/ Azida 0,1%/ SAB 0,2%. A seguir, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais, conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) ou ficoeritrina-cianina 5.1 (PC5) com os seus respectivos controles isotípicos.

As células foram marcadas com anti-CD3 PC5, anti-CD8 FITC (BD pharmingen) e anti-CCR5 PE (R&D) por 30 minutos à 4°C protegido da luz. Após incubação as células foram lavadas com PBS/ Azida 0.1%/ SAB 0.2% e ressuspendidas em 500µl de isoton e 100 µl de PBS/Paraformaldeído 1%. O número relativo de cada população foi avaliado pela aquisição de 10.000 eventos em aparelho de citometria de fluxo (Coulter-Epics) utilizando o programa System II Versão 3.0 (Beckman Coulter, Inc- USA).

**4.8 Análise estatística:** O Mann-Whitney *U* test foi utilizado para comparar variáveis entre pacientes com UCI e indivíduos controles. O teste Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn's foi usado para comparar os subgrupos de acordo com o teste de soro autólogo e grupo controle. Correlações foram analisadas pelo teste não-paramétrico *Spearman*. Para analisar a diferença de expressão de cultura de células estimulada de não estimulada (basal) foi utilizado o método não paramétrico pareado de *Wilcoxon*. O valor de *P* menor que 0,05 foi considerado significativo.

## **5 RESULTADOS**

## 5.1 Características demográficas dos pacientes com Urticária Crônica Idiopática

Para o estudo foram selecionados 37 pacientes com UCI do Ambulatório de Dermatologia do HC-FMUSP. Na **Tabela 1** verifica-se que a frequência de indivíduos do sexo feminino foi predominante (31) em relação ao sexo masculino (6), com idade média de 47,11 anos  $\pm$  12,37. A duração das lesões dos pacientes foi de 11,92 anos  $\pm$  11,68. As características individuais dos pacientes com UCI encontram-se na **Tabela 2 (Anexo C)**.

Os pacientes foram submetidos ao teste intradérmico de soro autólogo (ASST) como evidência de autoanticorpos IgG anti-Fc $\epsilon$ RI, o receptor de alta afinidade para IgE (1). A **Tabela 1** mostra que 16/37 pacientes apresentaram ASST positivo (43,24% ASST+) e negativos em 21/37 pacientes (ASST-, 56.76%), onde a distribuição de sexo foi semelhante entre os subgrupos. A média de duração da doença de 10,61  $\pm$  8,44 anos dos pacientes foi semelhante entre os subgrupos. A frequência de angioedema foi de 75% nos pacientes ASST+ e 52,38% nos ASST-.

**TABELA 1.** Características demográficas dos pacientes com Urticária Crônica Idiopática

	UCI	ASST-	ASST+
<b>Nº Pacientes</b>	37	21 (56,76%)	16 (43,24%)
<b>Mulheres/Homens</b>	31/6	18/3	13/3
<b>Idade (variação) em anos</b>	47,11 $\pm$ 12,37* (19-67)	48,48 $\pm$ 10,97* (30-65)	45,68 $\pm$ 13,51* (19-67)
<b>Duração da doença em anos</b>	10,61 $\pm$ 8,44*	10,61 $\pm$ 8,44*	9,93 $\pm$ 9,39*
<b>Angioedema</b>	23/37 (62,16%)	11/21 (52,38%)	12/16 (75%)

\* média  $\pm$  D.P, ASST (*autologous serum skin test*)

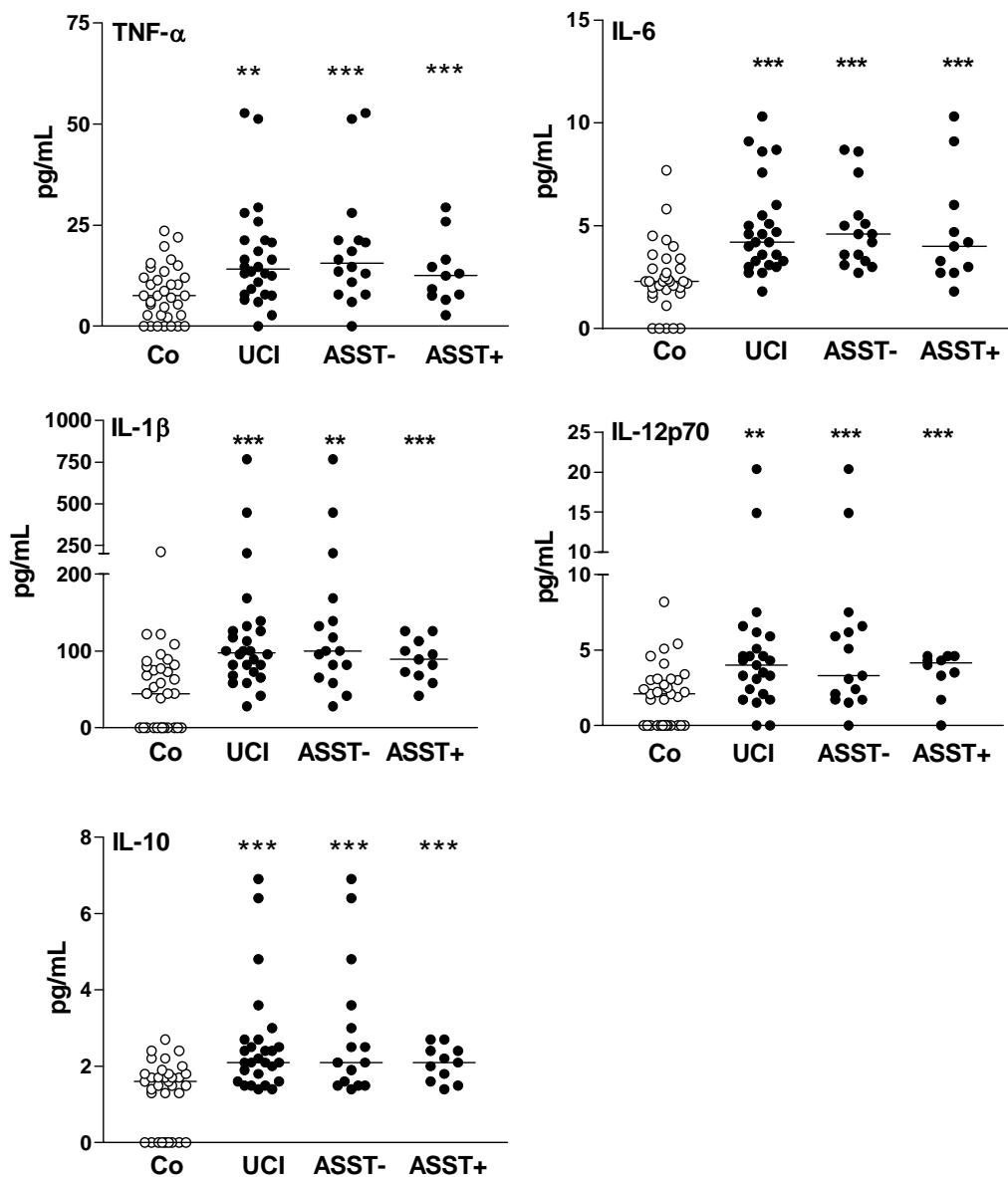
Inicialmente, investigamos o perfil de citocinas pela concentração sérica, pela expressão *ex vivo* de RNAm em CMN e pela secreção de citocinas por CMN induzidas por mitógenos em pacientes com Urticária Crônica Idiopática (UCI) comparado com indivíduos saudáveis.

## **5.2 Determinação sérica de citocinas pró-inflamatórias na UCI**

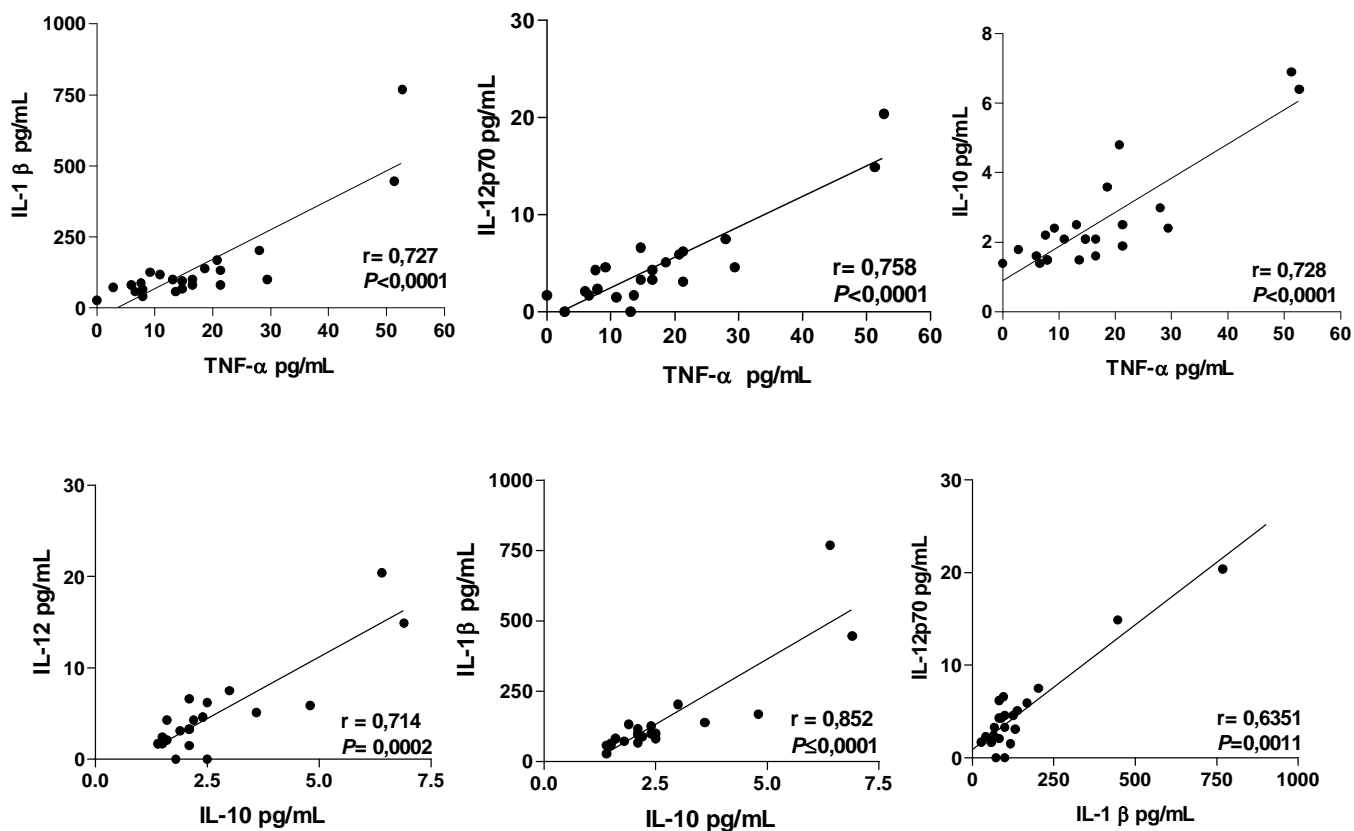
Os níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias foram determinados por citometria de fluxo pelo método *cytometric bead array* (CBA). A Figura 1 mostra que os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12p70 e IL-10 foram significativamente aumentados nos soros dos pacientes em relação aos indivíduos controles, independente da resposta ao ASST.

Além disto, foi observado que os níveis séricos de TNF- $\alpha$  dos pacientes apresentam forte correlação positiva com IL-1 $\beta$  ( $r=0,727$ ,  $P<0,0001$ ), IL-12p70 ( $r=0,758$ ,  $P<0,0001$ ) e com IL-10 ( $r=0,728$ ,  $P<0,0001$ ). Da mesma forma, houve correlação positiva da IL-10 com IL-12p70 ( $r=0,714$ ,  $P=0,0002$ ) e com IL-1 $\beta$  ( $r=0,852$   $P\leq 0,0001$ ). Também foi observado que a IL-1 $\beta$  correlacionou positivamente com a IL-12p70 ( $r=0,6351$ ,  $P=0,0011$ ) (Figura 2), evidenciando que todas as citocinas pró-inflamatórias analisadas estão elevadas no soro dos pacientes. Já nos indivíduos controles foi evidenciado uma fraca correlação entre os níveis séricos de TNF- $\alpha$  e de IL-12p70 ( $r=0,468$ ,  $P=0,012$ ) (Dados não mostrados).





**Figura 1. Determinação sérica de citocinas pró-inflamatórias na UCI.** Soros de indivíduos controles (Co, n=33) e pacientes com UCI (n=27), UCI com ASST negativo (ASST-, n=16), UCI com ASST positivo (ASST+, n=11), foram avaliadas por citometria de fluxo. A linha horizontal representa a mediana. \*\* $P \leq 0,01$  \*\*\* $P \leq 0,001$  quando comparado ao grupo controle.



**Figura 2. Correlação dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias na UCI.**

Correlação dos níveis séricos de TNF- $\alpha$  e IL-10 com as demais citocinas de pacientes com UCI (n=26).

### 5.3 Capacidade de secreção de citocinas e de proliferação de CMN estimuladas por mitógenos na UCI

Para avaliar a capacidade das CMN em secretar citocinas induzidas por mitógenos, foram realizadas culturas de CMN estimuladas por 48 horas com fitohemaglutinina (PHA) e a dosagem de citocinas realizada nos sobrenadantes de cultura por CBA ou por ELISA (IL-17A).

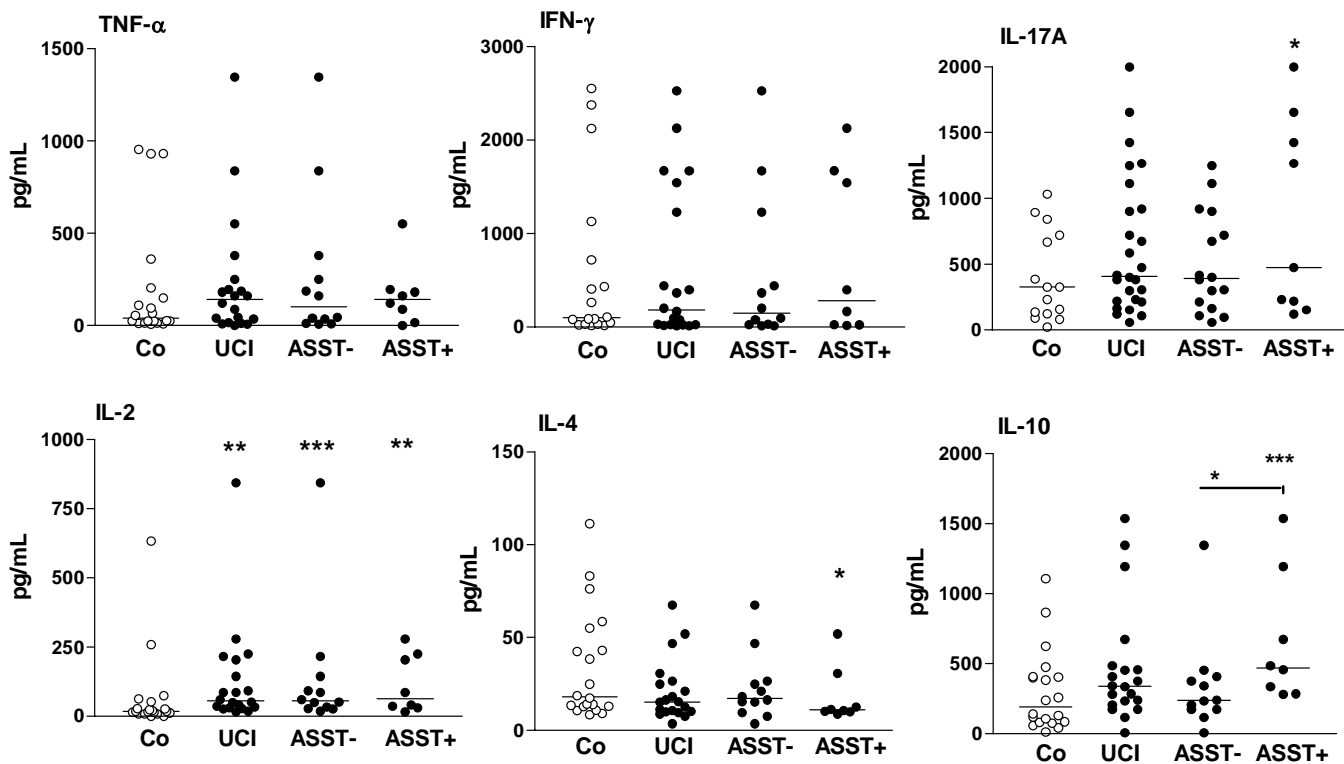
A Figura 3 mostra que a produção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  não difere entre o grupo de pacientes e de controles. Já a produção de IL-17A do subgrupo ASST+ dos pacientes foi superior comparado aos indivíduos saudáveis, especialmente devido a quatro amostras num total de 9 (44%) que produziram níveis maiores de 1000pg/mL. Além disso, o subgrupo ASST+ mostra aumento da produção de IL-10 em relação aos controles e também ao ASST- (Figura 3). Dois pacientes ASST+ de oito (25%) tiveram produção de IL-10 acima de 1000pg/mL. Em contraste, a produção de IL-4 foi diminuída nos pacientes ASST+ em relação ao grupo controle.

A secreção de IL-2 pelas CMN dos pacientes com UCI, independente do ASST foi significativamente elevada em relação ao grupo controle (Figura 3).

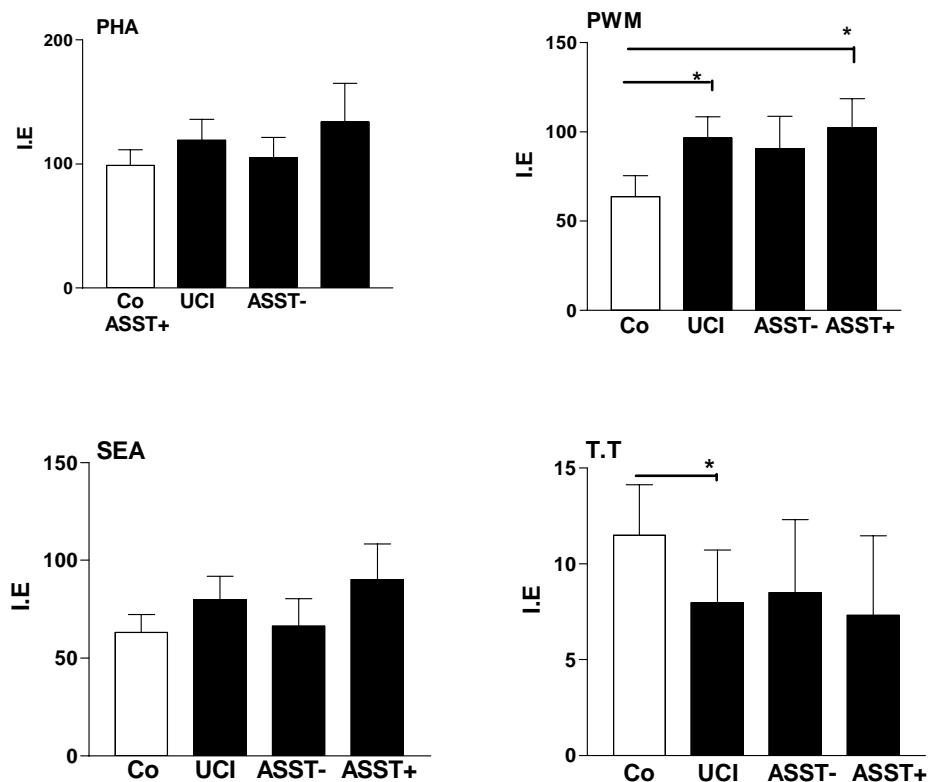
Os resultados evidenciam que há um desequilíbrio na produção de citocinas na UCI, sendo as pró-inflamatórias detectáveis no soro e a secreção induzida por mitógeno de célula T mostra um aumento de IL-2, IL-17A e IL-10, simultaneamente à diminuição de IL-4 nos pacientes ASST+.

Em paralelo, a capacidade linfoproliferativa de CMN foi avaliada pela incorporação de timidina em resposta ao estímulo policlonal de células T (PHA), ao superantígeno enterotoxina A de *Staphylococcus aureus* (SEA), ao estímulo policlonal de células B, o Pokeweed mitogen (PWM) e ao antígeno Toxóide tetânico (TT). A resposta linfoproliferativa para SEA e PHA foi comparável entre o grupo de pacientes e controles. Entretanto, os pacientes com UCI mostram um aumento significativo da capacidade linfoproliferativa ao PWM (Figura 4), devido ao aumento da resposta de pacientes ASST positivos comparados aos indivíduos controles. A resposta antígeno-específica para o TT foi significativamente diminuída nos pacientes em relação ao grupo controle. Os resultados mostram que há uma imunocompetência

na UCI e que a população de células B é hiperrespondedora ao estímulo policlonal dependente de células T.



**Figura 3. Produção *in vitro* de citocinas por CMN de pacientes com UCI.** Culturas de CMN de pacientes com UCI (n=20) e indivíduos controles (n=20), UCI com ASST negativo (ASST-, n=12), UCI com ASST positivo (ASST+, n=8), foram estimuladas por 48 horas com PHA e as citocinas nos sobrenadantes foram dosadas por citometria de fluxo. Determinação de IL-17A foi realizada por ELISA. Os resultados são mostrados pela diferença entre as culturas com estímulo com as culturas sem estímulo (basal). A linha horizontal representa a mediana. \* $P \leq 0,05$  \*\* $P \leq 0,01$  \*\*\* $P \leq 0,001$  quando comparado ao grupo controle.



Estímulo	Grupos			
	Controles	UCI	ASST-	ASST+
PHA	98.95 ± 59.54	119 ± 92.42	105.3 ± 63.39	133.7 ± 116.7
SEA	63.22 ± 37.49	79.84 ± 57.32	66.46 ± 43.98	90.13 ± 65.64
PWM	63.75 ± 52.49	96.50 ± 60.91*	90.72 ± 64.86	102.3 ± 58.73**
TT	11,50 ± 13,40	7,96 ± 14,88*	8,49 ± 15,28	7,32 ± 14,97

**Figura 4. Resposta linfoproliferativa a mitógenos e antígenos na UCI.** A resposta linfoproliferativa de indivíduos controles (Co, n=29) e pacientes com UCI (n=29), UCI com ASST negativo (ASST-, n=15), UCI com ASST positivo (ASST+, n=14) foi avaliada em cultura de 3 dias de incubação com PHA (2,5µg/mL) ou SEA (40ng/mL) e por 6 dias para o mitógeno PWM (5µg/mL) ou antígeno de toxóide tetânico (TT, 0,04L.f/mL). Os resultados estão representados por média ± E.P do índice de estimulação. \* $P \leq 0,05$  \*\* $P \leq 0,01$  \*\*\*  $P \leq 0,001$  quando comparado ao grupo controle.

#### 5.4 Análise *ex vivo* da expressão de citocinas em CMN de pacientes com UCI

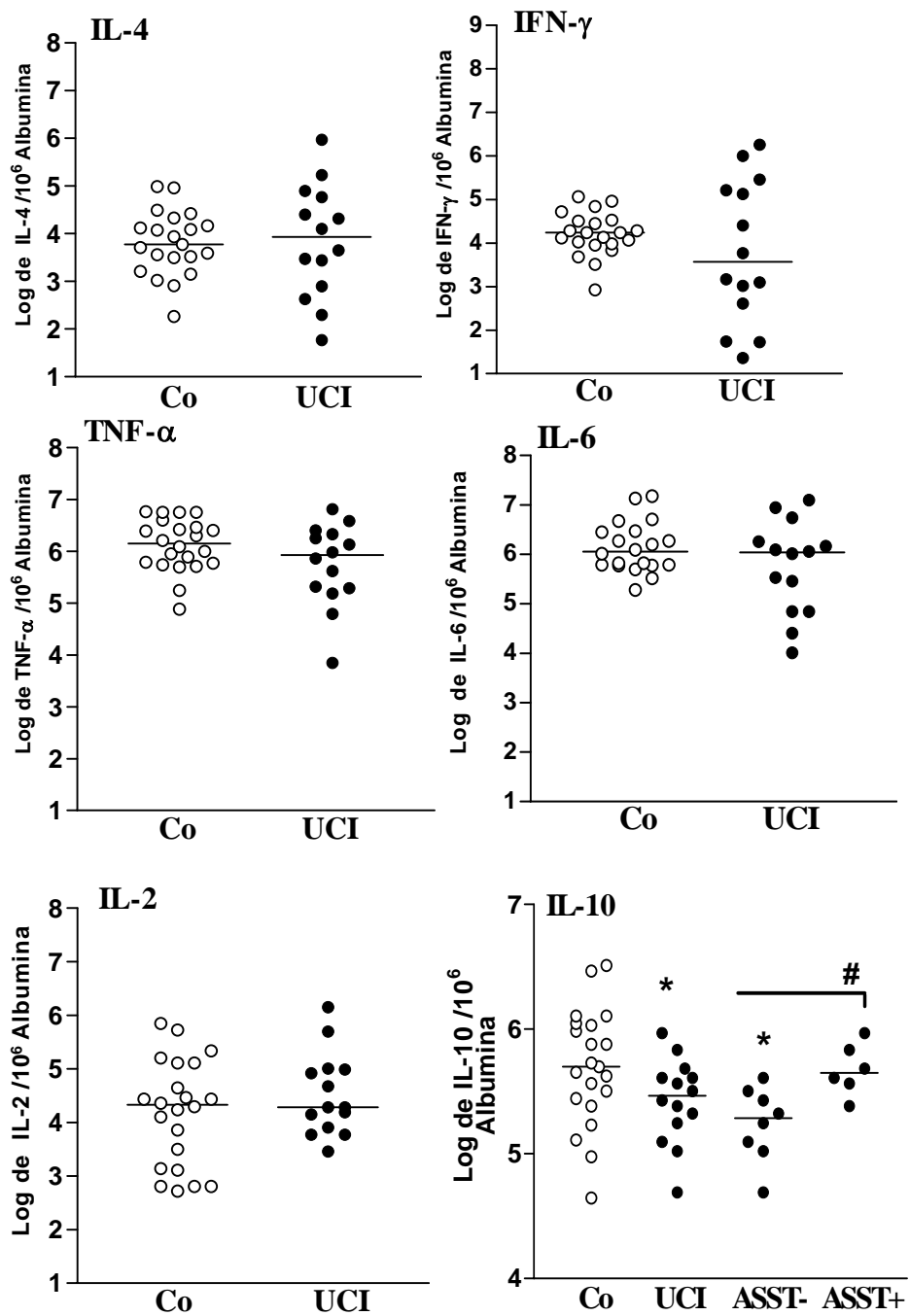
Para avaliar a expressão gênica constitutiva de citocinas, o RNAm de citocinas das CMN não estimuladas de pacientes e indivíduos saudáveis foram analisadas por reação em cadeia de polimerase em tempo real (*Real-Time* PCR). Para tal reação foi utilizada a metodologia SYBRGreen, fluorocromos que se intercalam em fitas duplas de DNA.

Os genes pesquisados foram *Il2*, *Il4*, *Ifn $\gamma$* , *Tnf $\alpha$* , *Il6* e *Il10*, utilizando a expressão de albumina como controle interno da reação. Os resultados são expressos como número de cópias das citocinas por 10<sup>6</sup> cópias de albumina.

A especificidade da reação foi confirmada através da curva de dissociação (Curva de *Melting*) para cada citocina, indicando o ponto correspondente à temperatura de dissociação da dupla fita da sequência alvo pesquisada (**ANEXO D**).

O nível espontâneo da expressão de RNAm das citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4 bem como IL-2 e IL-6 de CMN foram similares entre pacientes e indivíduos controles (Figura 5). A expressão de RNAm de IL-10 foi significativamente diminuída nos pacientes em relação ao controle, devido a diminuição da expressão no subgrupo ASST- (Figura 5).

Os resultados relacionados ao estudo do perfil de produção de citocinas foram publicados na revista *International Immunopharmacology* (2008) 8:1433-1440 (**ANEXO E**).



**Figura 5. Expressão espontânea de RNAm de citocinas de CMN de pacientes com UCI por Real-Time PCR.** CMN de indivíduos controles (Co, n=22) e pacientes com UCI (n=14), UCI com ASST negativo (ASST-, n=8), UCI com ASST positivo (ASST+, n=6). A linha horizontal representa a mediana. \* $P \leq 0,05$  \*\* $P \leq 0,01$  \*\*\* $P \leq 0,001$  quando comparado ao grupo controle. #  $P \leq 0,05$ .



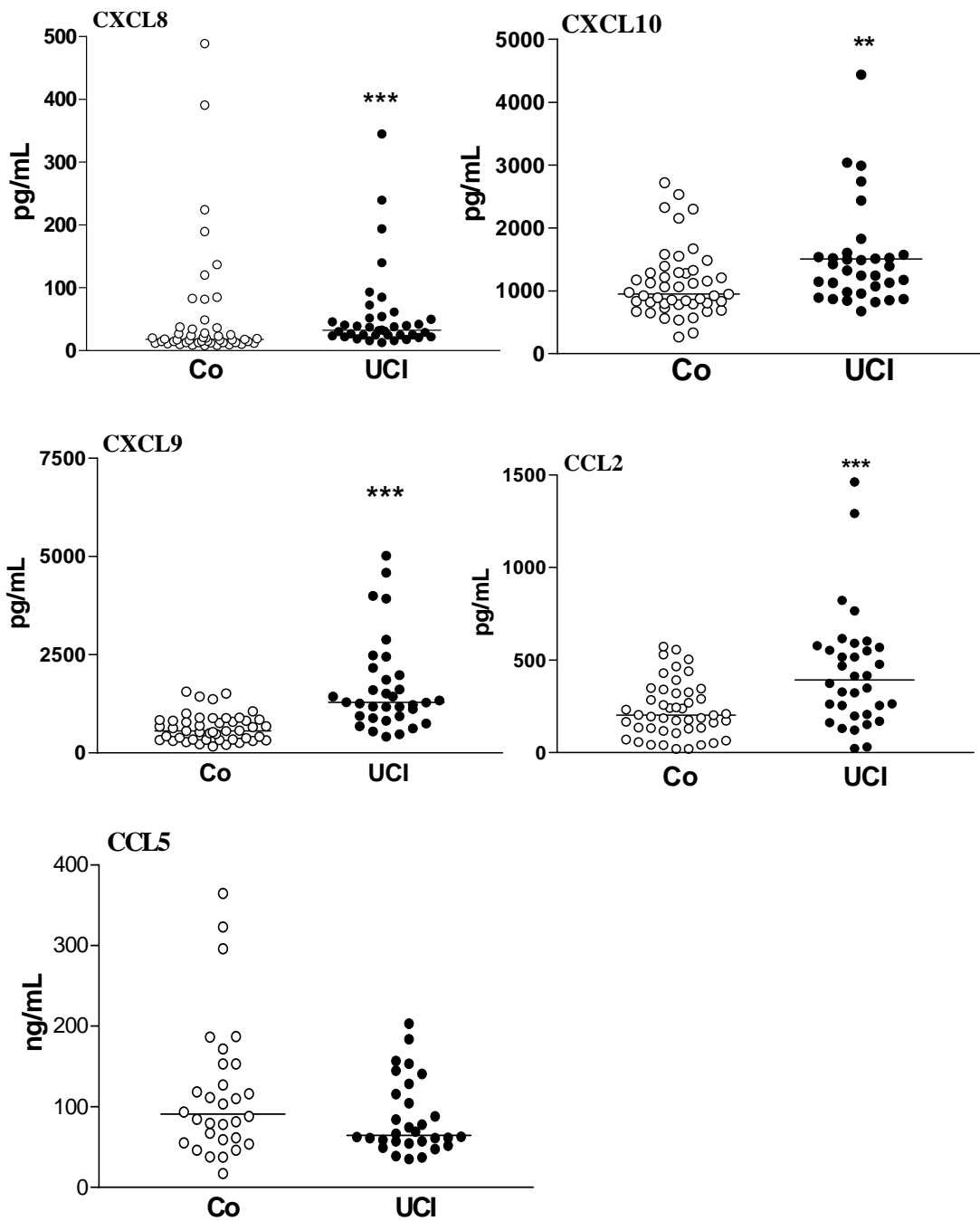
Prosseguindo a proposta de análise de quimiocinas, iniciamos o estudo dos níveis séricos e pela secreção induzidas por estímulo de determinadas quimiocinas nos pacientes com UCI comparados ao grupo controle.

### **5.5 Níveis séricos de quimiocinas de pacientes com UCI**

Considerando o desequilíbrio na produção de citocinas encontrado na UCI, tornou-se fundamental prosseguir estudando quimiocinas que possam influenciar na migração e ativação de células como neutrófilos, linfócitos, basófilos e APCs. Desta forma, foram selecionadas as quimiocinas IL-8/CXCL8, IP-10/CXCL10, MIG/CXCL9, MCP-1/CCL2 e RANTES/CCL5, que possuem importante influência nas referidas populações celulares, bem como no processo inflamatório.

A Figura 6 mostra o perfil sérico das quimiocinas dos pacientes com UCI e controles, avaliados por citometria de fluxo, pelo método CBA. Somente a CCL5 foi avaliada por ELISA, devido aos níveis muito elevados, exigiu a realização de várias diluições seriadas do soro.

Níveis significativamente elevados de CXCL8, CXCL10, CXCL9 e CCL2 foram observados no soro dos pacientes em relação aos indivíduos controles, não diferindo para CCL5 (Figura 6). O perfil das quimiocinas foi similar entre os pacientes ASST+ e ASST- (dados não apresentados).



**Figura 6. Determinação sérica de quimiocinas de pacientes com UCI.** Soros de indivíduos controles (Co, n=32) e pacientes com UCI (n=35) foram avaliados para CXCL8, CXCL10, CXCL9, CCL2 por citometria de fluxo e CCL5 por ELISA. A linha horizontal representa a mediana. \* $P \leq 0,05$  \*\* $P \leq 0,01$  \*\*\* $P \leq 0,001$  quando comparado ao grupo controle.

## **5.6 Produção *in vitro* de quimiocinas por CMN estimuladas por mitógenos**

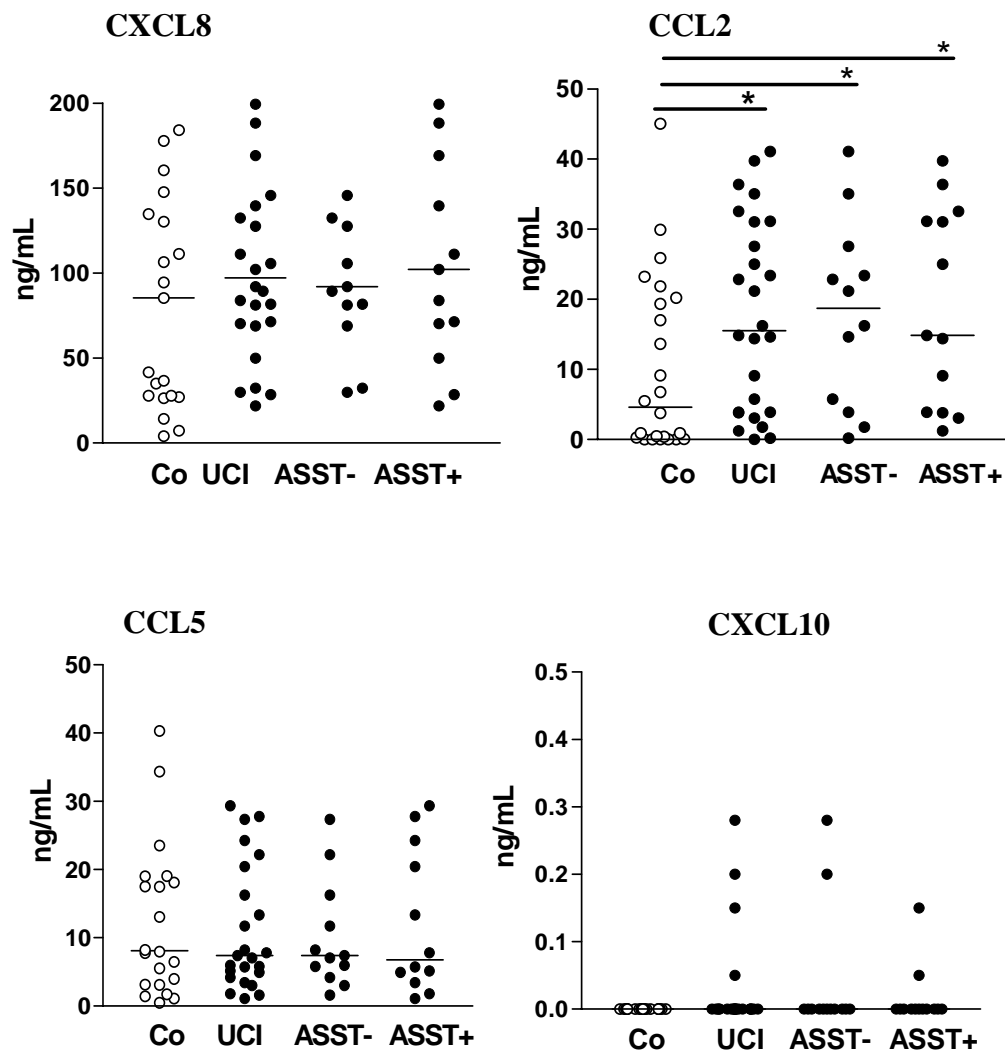
Com o propósito de averiguar se a produção de quimiocinas por CMN induzidas por mitógenos *in vitro* estão alterados na UCI, o passo seguinte foi determinar a secreção de quimiocinas pelas CMN estimuladas por 24 horas com PHA e com SEA. As quimiocinas foram determinadas por ELISA.

Os níveis basais, ou seja, secreção espontânea sem estímulo, de CCL2 pelas CMN já se encontram elevados nos pacientes comparado as CMN de indivíduos controles (Figura 7). Apesar dos níveis basais de CXCL8 e CCL5 atingirem níveis de 85 ng/mL e 8 ng/mL, respectivamente, não houve diferença entre os grupos (Figura 7).

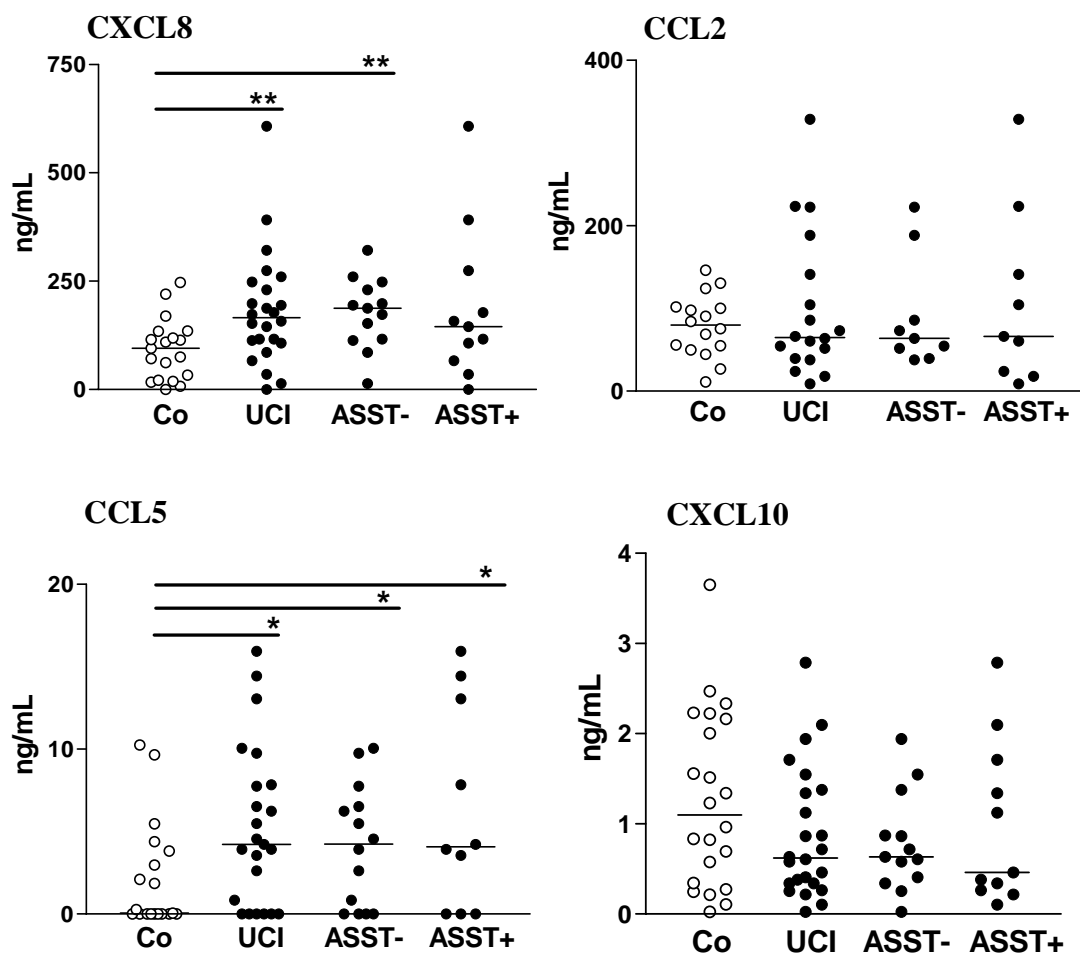
Para avaliar a produção de quimiocinas induzidas pelos estímulos PHA e SEA, foi calculada a diferença dos níveis estimulados e o nível basal. A Fig 8 mostra que sob estímulo de PHA há um significativo aumento de CXCL8 e CCL5 pelas CMN dos pacientes em relação ao grupo controle. O aumento de CXCL8 foi detectado no subgrupo ASST- e para CCL5 foi significativamente elevada em ambos, ASST positivo e negativo, em relação ao grupo controle.

Utilizando o superantígeno SEA foi identificado aumento na capacidade de secreção de CCL2 pelas CMN de pacientes de ambos, ASST positivo e negativo comparado aos indivíduos controles (Figura 9). A secreção de CXCL10, não diferiu entre pacientes e controles para ambos os estímulos PHA e SEA.

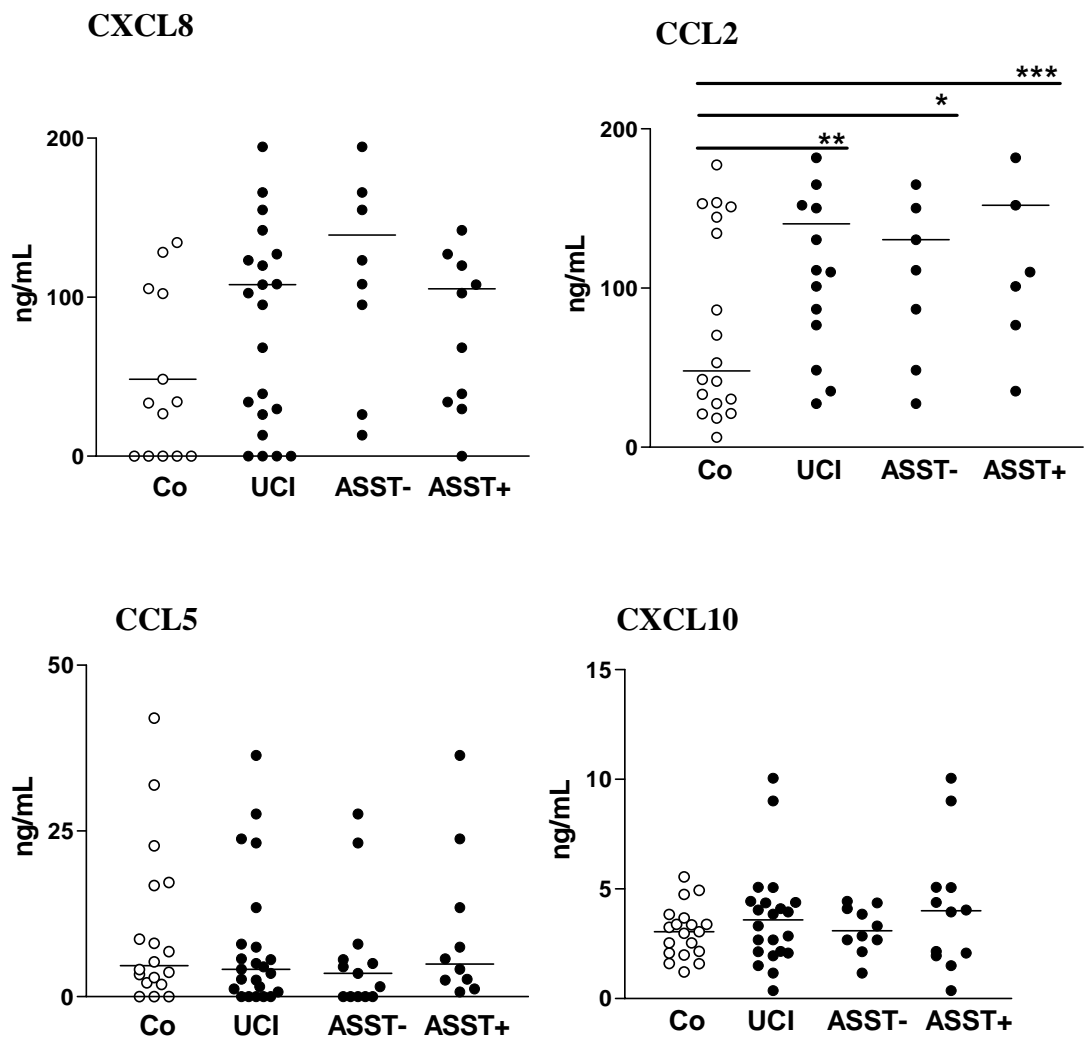
Estes dados evidenciam que na UCI, a ativação das células T pela PHA gera um aumento de CCL5 e o superantígeno SEA leva a ativação da população de monócitos, pela secreção de CCL2.



**Figura 7. Níveis basais de quimiocinas em sobrenadantes de cultura na UCI.** CMN de pacientes com UCI (n=26) e indivíduos controles (n=25), UCI com ASST negativo (ASST-, n=13), UCI com ASST positivo (ASST+, n=13) foram cultivadas por 24 horas sem estímulo. A quantificação de citocinas nos sobrenadantes foi realizada por ELISA. A linha horizontal representa a mediana. \* $P \leq 0,05$  quando comparado ao grupo controle.



**Figura 8. Determinação de quimiocinas induzidas por PHA na UCI.** CMN de indivíduos controles (n=26), pacientes com UCI (n=26) com ASST negativo (ASST-, n=13), e ASST positivo (ASST+, n=13) foram estimuladas com PHA por 24 horas. Os níveis de quimiocinas nos sobrenadantes foram determinados por ELISA. Os resultados representam a diferença entre as culturas com estímulo e as sem estímulo (basal). A linha horizontal representa a mediana. \* $P \leq 0,05$  \*\*  $P \leq 0,01$ ; quando comparado ao grupo controle.



**Figura 9. Determinação de quimiocinas induzidas por SEA na UCI.** Culturas de CMN de indivíduos controles (n=26), pacientes com UCI (n=26), com ASST negativo (ASST-, n=13) e com ASST positivo (ASST+, n=13) foram estimuladas com SEA por 24 horas. Os níveis de quimiocinas nos sobrenadantes foram determinados por ELISA. Os resultados são mostrados pela diferença entre as culturas com estímulo e as sem estímulo (basal). A linha horizontal representa a mediana. \* $P \leq 0,05$  \*\*  $P \leq 0,01$  \*\*\* $P \leq 0,001$  quando comparado ao grupo controle.

### **5.7 Análise da expressão intracelular de CXCL8 em CMN de pacientes com UCI e indivíduos controles**

Visto o aumento de secreção de CXCL8 pelas CMN dos pacientes, avaliamos qual seria a população celular secretora desta quimiocina. Para tal, CMN de pacientes com UCI e indivíduos controles foram cultivadas por 18 horas na presença ou ausência (basal) de 1µg/mL SEA juntamente com o inibidor de secreção, a brefeldina A (10µg/mL). Após o período de cultivo, as CMN foram marcadas utilizando anticorpos anti-CD14 humano conjugados com PC5, permeabilizadas, fixadas e posteriormente, submetidas a marcação intracelular com anticorpos anti-CXCL8 conjugados com PE, e avaliadas por citometria de fluxo.

A Figura 10A ilustra a região onde estão localizados os monócitos no sangue periférico de um indivíduo controle e a intensidade de expressão de CD14 por granulosidade ilustrando a identificação de monócitos pela expressão de CD14 (Figura 10B). Já a figura 11 ilustra um histograma representativo da expressão de CXCL8 em monócitos. Evidenciamos que os níveis intracelulares de CXCL8 são principalmente detectados nas células CD14<sup>+</sup>, mesmo sem estímulo (Figura 11A). Após a estimulação com SEA, há um aumento na intensidade de expressão de CXCL8 (Figura 11B).

Ao avaliarmos a intensidade média de fluorescência (MFI) de CXCL8 em células CD14<sup>+</sup> podemos evidenciar uma significativa diminuição no grupo de pacientes ASST<sup>+</sup> e quando estimulado essa diminuição ocorre em ambos os grupo ASST<sup>+</sup> e ASST<sup>-</sup>, comparados ao grupo controle. (Figura 12A). Quando avaliada a porcentagem de expressão de CXCL8 nas células CD14<sup>+</sup> identificamos que os níveis basais e estimulados também foram diminuídos nos pacientes com UCI, somente nos ASST<sup>-</sup>, comparados com o grupo controle (Figura 12B).

Apesar de verificarmos que as células que expressam CXCL8 intracelular são as células CD14<sup>+</sup>, passamos a verificar se as células T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> podem expressar CXCL8. Para tal, avaliamos a expressão de CXCL8 utilizando linfócitos T de indivíduos saudáveis.

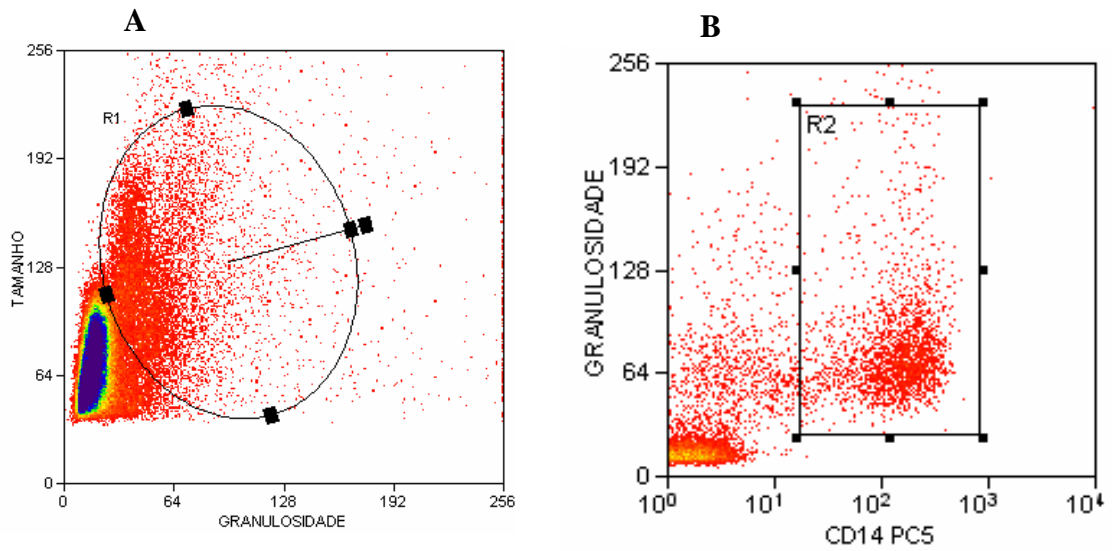
A Figura 13A ilustra a aquisição de CMN por tamanho *versus* granulosidade indicando a região onde se localizam os linfócitos. Na figura 13B ilustramos a

identificação de linfócitos T pela expressão de CD3 e das células CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> ou CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (Figura 13C).

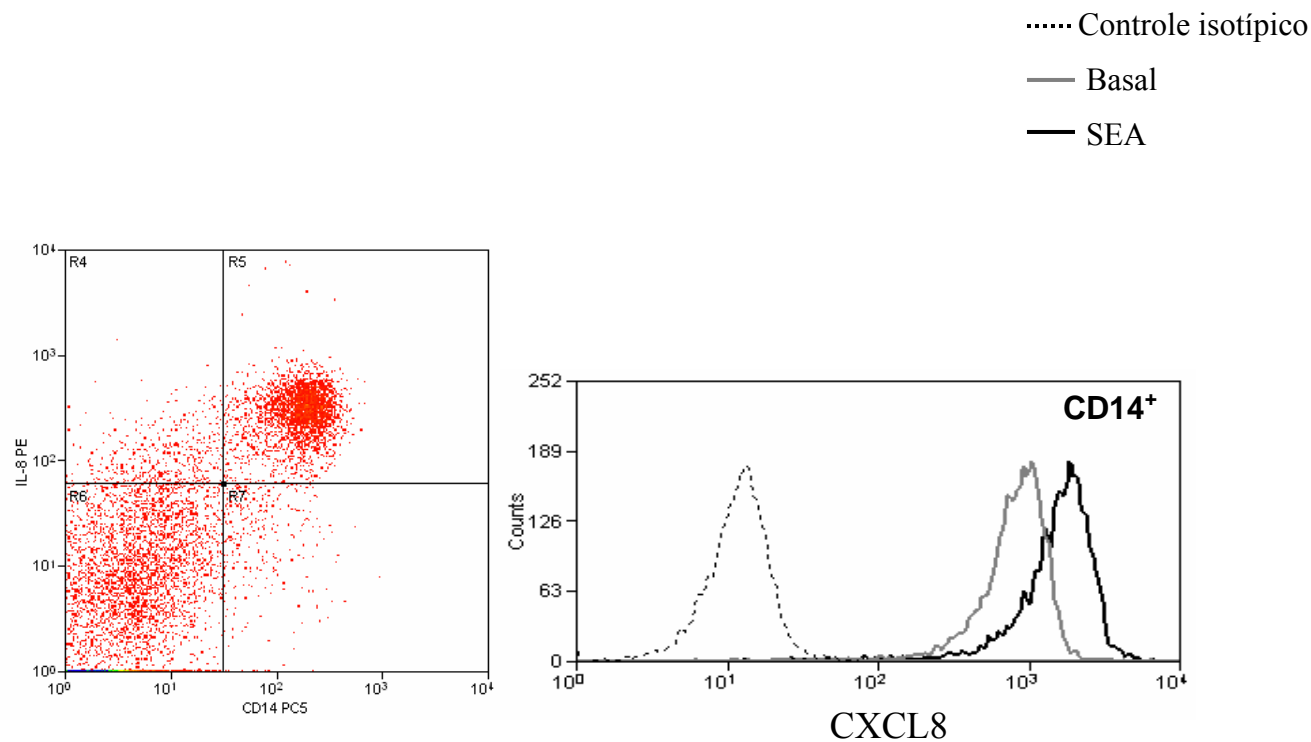
A Figura 14 mostra os histogramas representativos da expressão de CXCL8 nas células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. Pode-se observar nas condições basais uma baixa frequência de células CD4<sup>+</sup>/CXCL8<sup>+</sup> de percentual médio inferior à  $1,398 \pm 1,818$  (Figura 15A). Os níveis percentuais ou a intensidade de expressão de CXCL8 (Figura 15B) não se alteraram com o estímulo. Além disto, não houve diferença da expressão de CXCL8 em células T CD8<sup>+</sup> (Figura 16).

Estes dados mostram que a população secretora de CXCL8 concentram-se em monócitos e enfatizam que os dados observados de secreção de CXCL8 em células estimuladas com PHA (Figura 8) são derivados de monócitos.

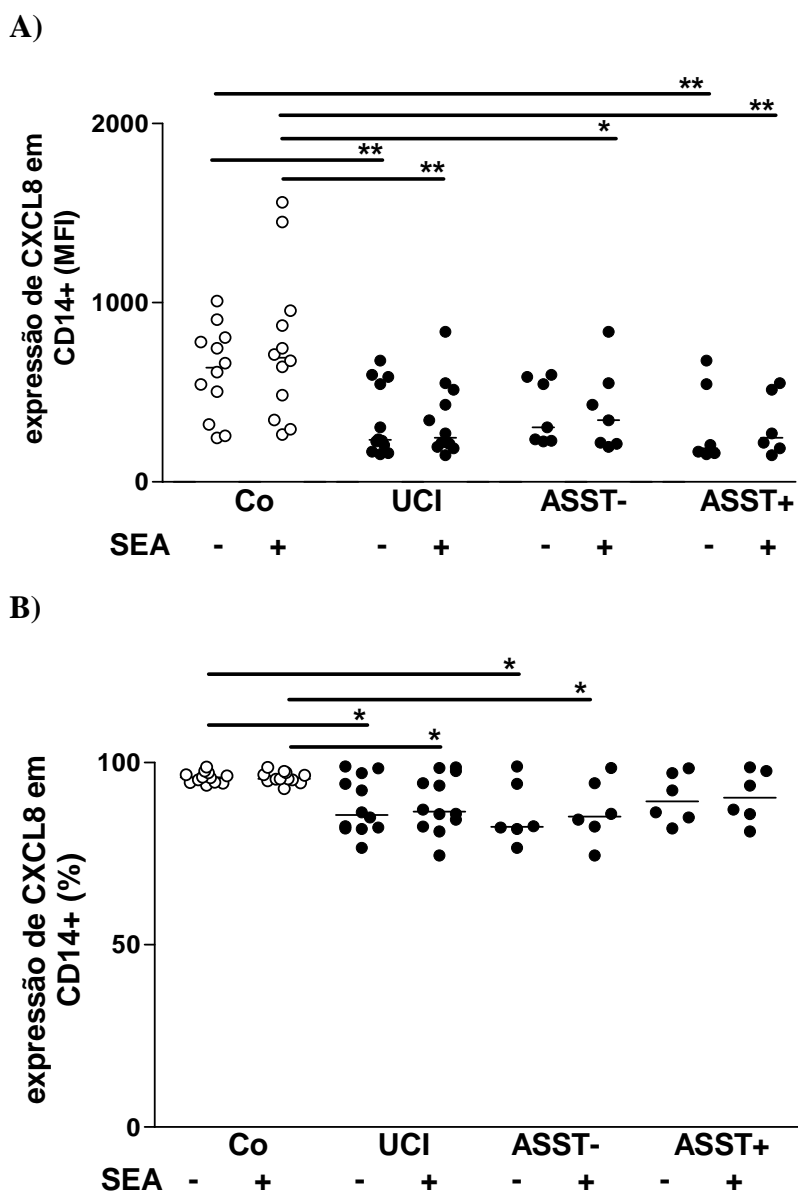




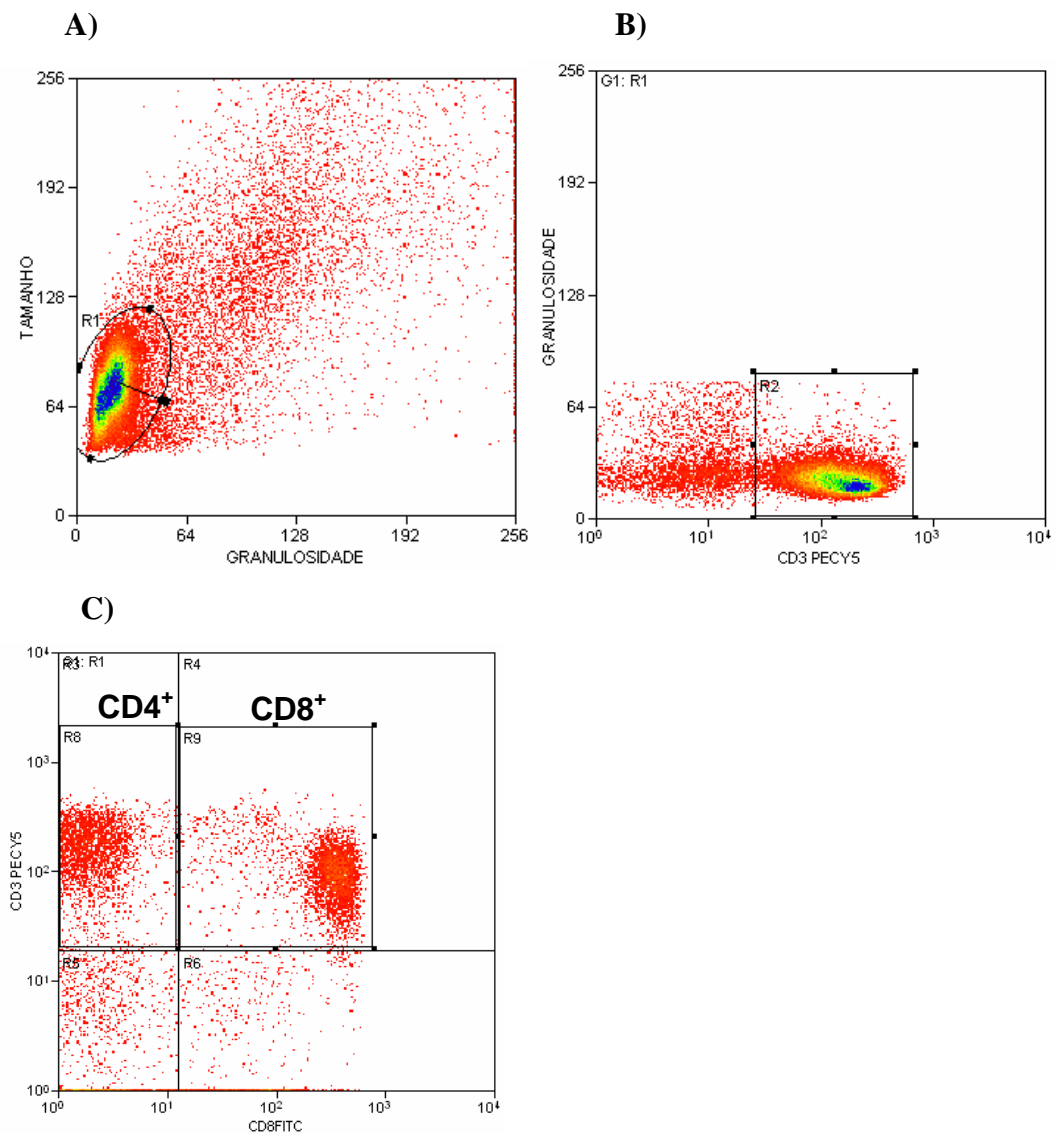
**Figura 10. Figura representativa da seleção de células CD14<sup>+</sup> de CMN por citometria de fluxo. (A) O círculo representa a região onde estão localizados os monócitos no sangue periférico de indivíduo saudável. (B) Monócitos marcados com anticorpo anti-CD14 humano conjugado com PC5.**



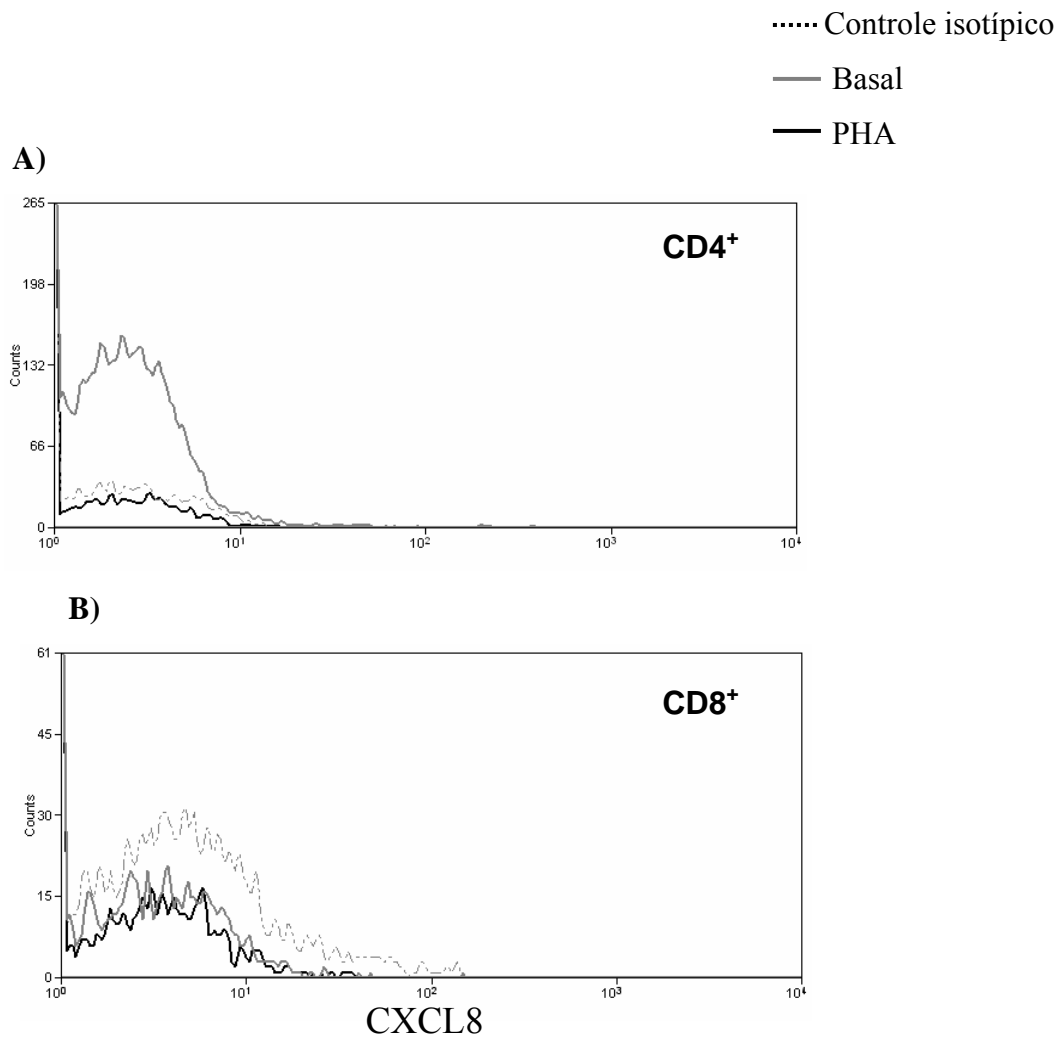
**Figura 11. Histograma representativo dos níveis intracelulares de CXCL8 em monócitos.** Amostra de sangue periférico de um indivíduo controle, após cultura de 18 horas de incubação na presença ou ausência (basal) de SEA juntamente com brefeldina A. As células CD14<sup>+</sup> foram marcadas com anti-CXCL8 PE e analisadas por citometria de fluxo. A linha tracejada representa o controle isotípico, a cinza o basal e a preta contínua quando estimulado com SEA.



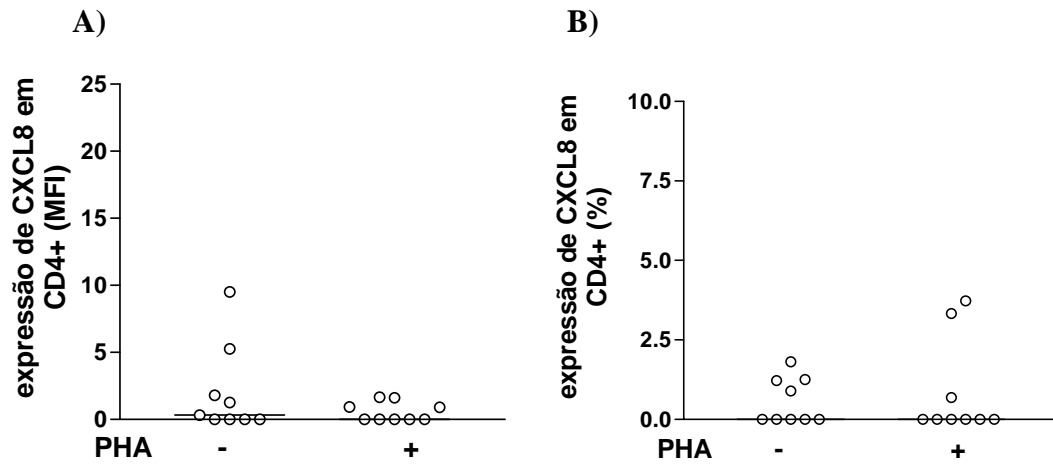
**Figura 12. Análise da expressão intracelular de CXCL8 em células CD14<sup>+</sup> na UCI.** Culturas de CMN de indivíduos controles (n=12), pacientes com UCI (n=12), com ASST negativo (ASST-, n=6) e com ASST positivo (ASST+, n=6) após 18 horas de incubação na presença ou ausência (basal) de SEA juntamente com a brefeldina A. As células CD14<sup>+</sup> foram marcadas com anti-CXCL8 PE e avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados são mostrados de acordo com a intensidade média de fluorescência (MFI) de CXCL8 (A) e também de acordo a porcentagem de expressão (B). A linha horizontal representa a mediana. \* $P \leq 0,05$  \*\*  $P \leq 0,01$  quando comparado com o respectivo grupo indicado.



**Figura 13. Figura representativa da seleção de CD4<sup>+</sup> e de CD8<sup>+</sup> de CMN por citometria de fluxo.** (A) O círculo representa a região onde estão localizados os linfócitos. (B) Células CD3<sup>+</sup> de indivíduo saudável marcadas com anticorpos anti-CD3 humano conjugados com PC5. (C) Região de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>) e de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>) selecionados a partir da região de células CD3<sup>+</sup>.



**Figura 14. Histograma representativo da expressão intracelular de CXCL8 em linfócitos T.** CMN de um indivíduo controle foram cultivadas por 18 horas na presença ou ausência (basal) de PHA juntamente com a brefeldina A. As células T CD4<sup>+</sup> (A) e T CD8<sup>+</sup> (B) foram analisadas quanto à expressão de CXCL8 intracelular por citometria de fluxo. A linha tracejada representa o controle isotípico, a cinza o basal e a preta contínua quando estimulado com PHA.



**Figura 15. Análise da expressão intracelular de CXCL8 em células T CD4<sup>+</sup>.** CMN de indivíduos controles (n=9) após 18 horas de incubação na presença ou ausência (basal) de PHA juntamente com a brefeldina A. As células CD4<sup>+</sup> foram marcadas com anti-CXCL8 PE e analisadas por citometria de fluxo. A linha horizontal representa a mediana. (A) Intensidade média de fluorescência. (B) Porcentagem.



## 5.8 Análise da expressão intracelular de CCL2 em CMN de pacientes com UCI e indivíduos controles

CCL2 é secretada por vários tipos celulares, incluindo monócitos e é quimiotática para monócitos, basófilos e células T<sup>(36)</sup>. Considerando que a produção de CCL2 por CMN estimuladas com SEA está aumentada em pacientes com UCI iniciamos a análise para identificar se a população de monócitos produz esta quimiocina. Para avaliar a presença intracelular de CCL2 em monócitos, as CMN de pacientes com UCI e indivíduos controles foram incubadas por 18 horas na presença ou ausência (basal) de SEA, juntamente com o inibidor de secreção, a brefeldina A. A expressão de CCL2 foi analisada por citometria de fluxo.

A Figura 17 ilustra um histograma representativo da expressão intracelular de CCL2 em monócitos de um indivíduo controle.

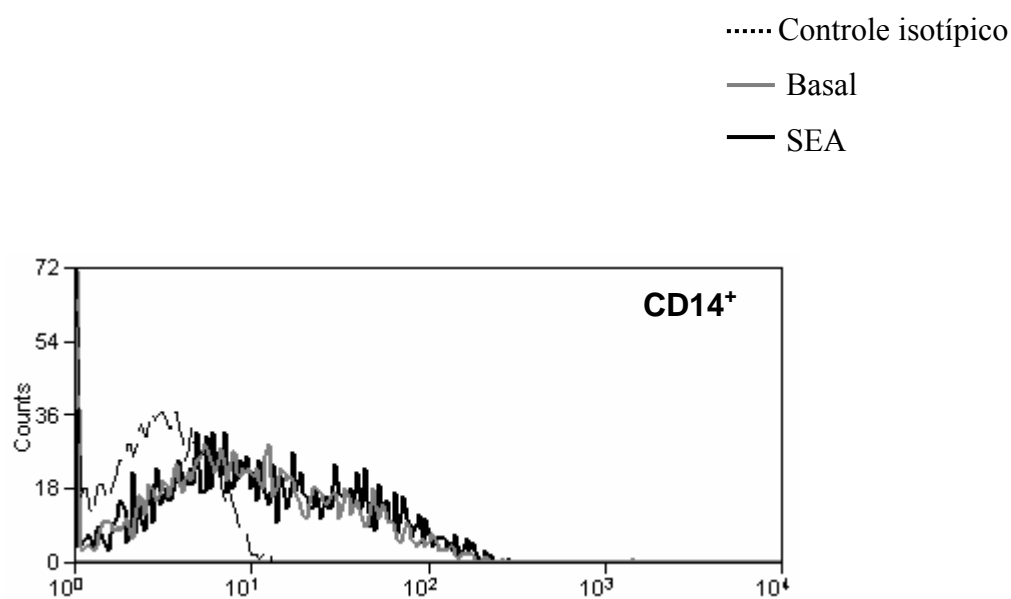
A Figura 18B mostra que em condições basais a porcentagem de expressão intracelular de CCL2 em células CD14<sup>+</sup> está diminuída nos pacientes ASST- em relação ao grupo controle. Entre os subgrupos ASST, foi evidenciada uma significativa diminuição de CCL2 no grupo ASST- comparado ao grupo ASST+. Nenhuma diferença foi encontrada quanto à intensidade média de fluorescência de CCL2 em células CD14<sup>+</sup> de pacientes com UCI em comparação ao grupo controle, mesmo em condições estimuladas (Figura 18A).

O próximo passo foi avaliar se outras populações celulares presentes nas CMN, além das CD14<sup>+</sup>, poderiam expressar níveis intracelulares de CCL2. Ao avaliarmos as células T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, linfócitos B *naive* e de memória, bem como basófilos, não foi encontrado presença de CCL2 (Figura 19). Assim podemos inferir que o CCL2 encontrado nos sobrenadantes de cultura de CMN estimulados com SEA foram produzidos pelos monócitos.

Os resultados evidenciam que após estímulo com SEA a secreção de CXCL8 e CCL2 pelas CMN de pacientes com UCI e indivíduos controles é decorrente principalmente da secreção de células CD14<sup>+</sup>, sendo parcial a contribuição dos linfócitos T na secreção de CXCL8. Quanto à secreção de CCL2, as células CD14<sup>+</sup> foram identificadas como as principais produtoras, visto que em CMN não foi identificado níveis intracelulares de CCL2 em linfócitos B e T bem como em

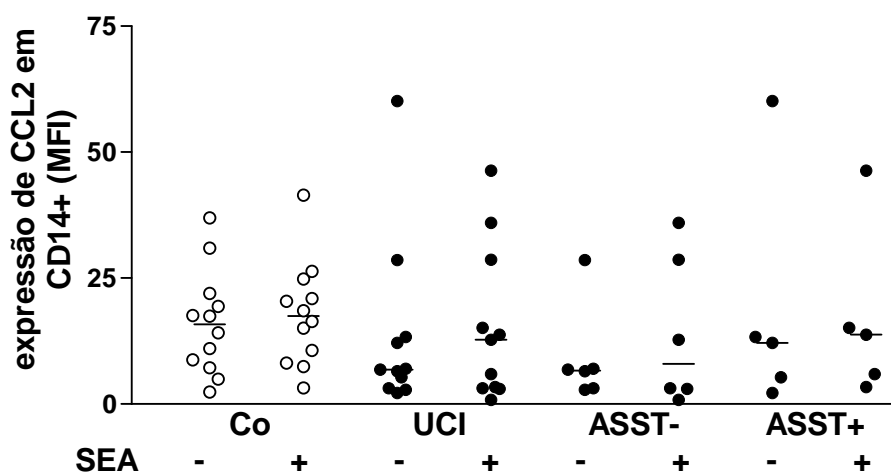


basófilos. Estes dados em conjunto mostram que a população de monócito na UCI encontra-se ativada.

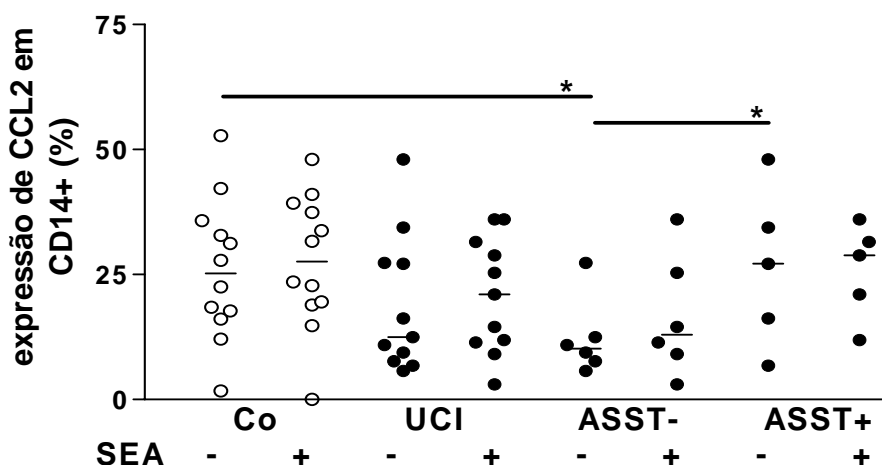


**Figura 17. Histograma representativo da expressão intracelular de CCL2 em monócitos.** CMN de um indivíduo controle foram cultivadas por 18 horas na presença ou ausência (basal) de SEA juntamente com a brefeldina A. As células CD14<sup>+</sup> foram marcadas com anti-CCL2 PE e analisadas por citometria de fluxo. A linha tracejada representa o controle isotópico, a cinza o basal e a preta contínua quando estimulado com SEA.

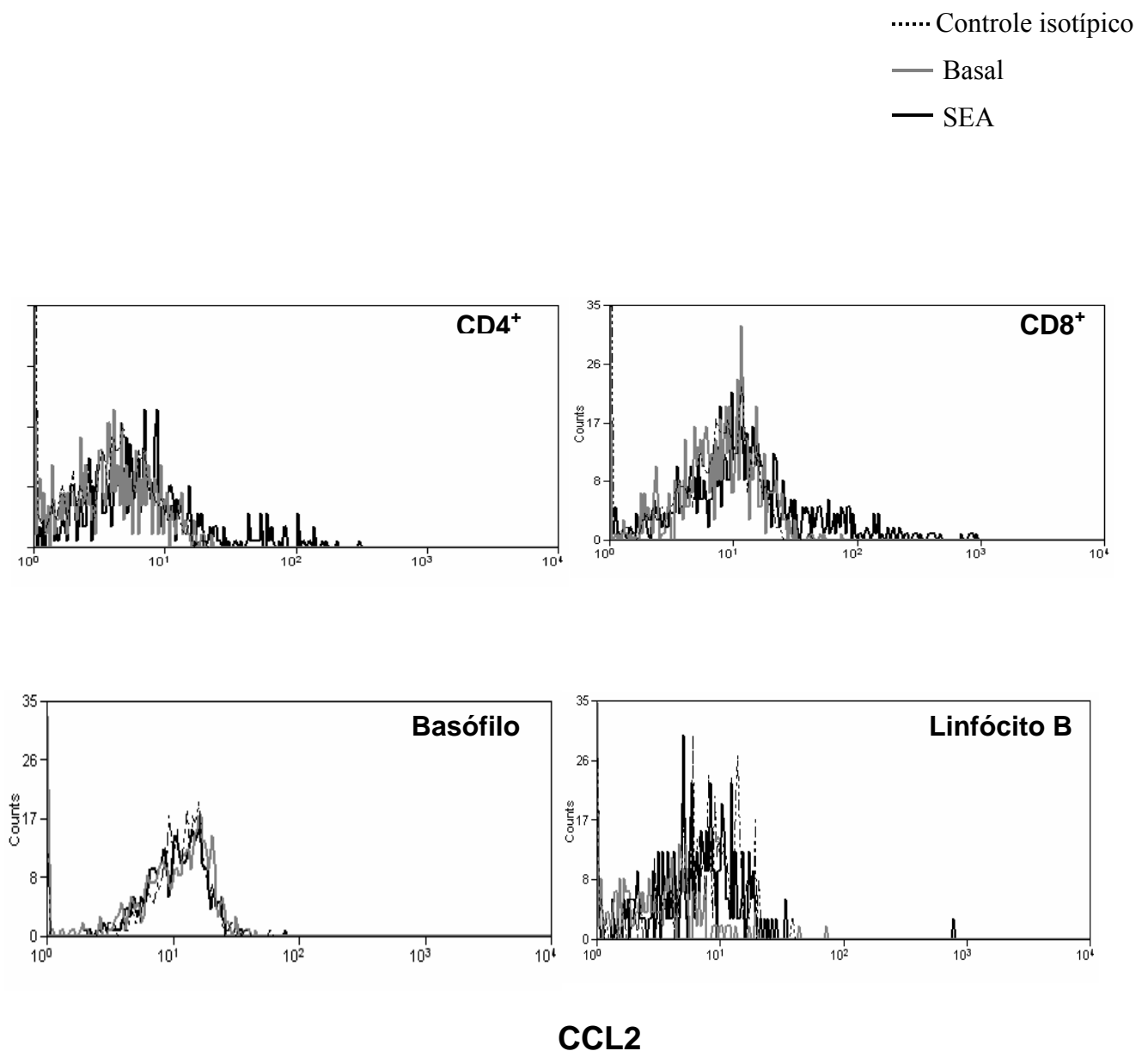
A)



B)



**Figura 18. Análise da expressão intracelular de CCL2 em células CD14<sup>+</sup> na UCI.** CMN de indivíduos controles (n=12), pacientes com UCI (n=11), com ASST negativo (ASST-, n=6) e com ASST positivo (ASST+, n=5) após 18 horas de incubação na presença ou ausência (basal) de SEA juntamente com a brefeldina A. As células CD14<sup>+</sup> foram marcadas com anti-CCL2 PE e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados são mostrados de acordo com a intensidade média de fluorescência (MFI) de CCL2 (A) e também de acordo a porcentagem de expressão (B). A linha horizontal representa a mediana. \* $P \leq 0,05$  quando comparado com o respectivo grupo indicado.



**Figura 19. Histograma representativo dos níveis intracelulares de CCL2 em linfócitos T, basófilos e linfócitos B.** CMN de um indivíduo controle foram cultivadas por 18 horas de incubação na presença ou ausência (basal) de SEA juntamente com a brefeldina A. As células foram analisadas quanto a expressão de CCL2 intracelular por citometria de fluxo. A linha tracejada representa o controle isotópico, a cinza o basal e a preta contínua quando estimulado com PHA.

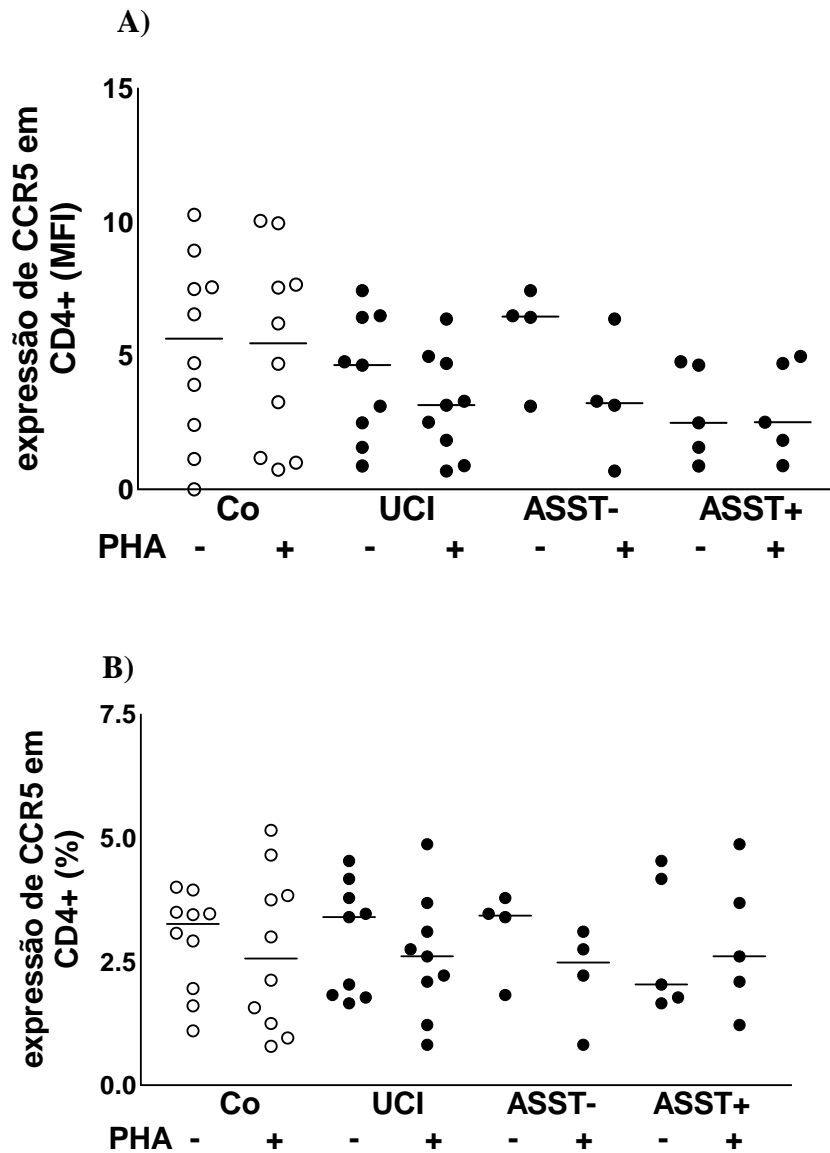
### **5.9 Análise da expressão de CCR5 em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> de pacientes com UCI e indivíduos controles**

CCR5 é um receptor acoplado à proteína G, expresso predominantemente em macrófagos diferenciados de monócitos do sangue periférico e em células Th1 ativadas em resposta a inflamação tendo como ligantes CCL3, CCL4, CCL8, CCL3L1 e CCL5<sup>(63)</sup>.

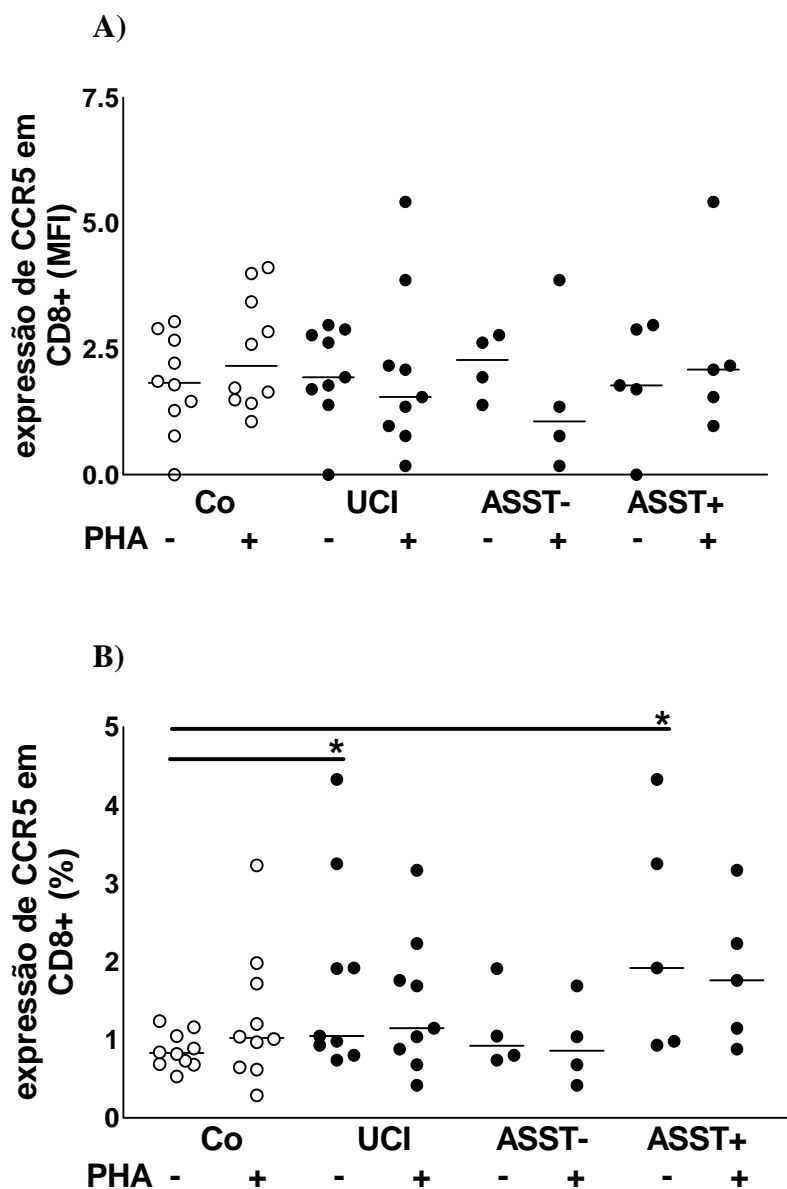
A produção de CCL5 por CMN estimulados por PHA foi significativamente elevada nos pacientes com UCI em relação aos controles. Para avaliar se há uma concomitante alteração na expressão do seu receptor, CCR5, em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, avaliamos a expressão após estimulação com PHA.

Ao avaliarmos o receptor CCR5 pudemos evidenciar em condições basais um aumento significativo da porcentagem de expressão de CCR5 nas células T CD8<sup>+</sup> de pacientes com UCI comparado ao grupo controle, devido ao aumento da porcentagem no grupo pacientes positivo ao ASST (Figura 21B). Não observamos diferença quanto à porcentagem de expressão de CCR5 em células T CD4<sup>+</sup> e nem quanto ao MFI em células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> de pacientes com UCI, mesmo quando utilizado o estímulo policlonal para as células T, a PHA (Figuras 20 e 21).

Os dados mostram que na UCI as CMN ativadas por PHA produzem mais CCL5, sendo que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> têm uma maior expressão espontânea de CCR5.



**Figura 20. Determinação da expressão de CCR5 em células T CD4<sup>+</sup> na UCI.** CMN de indivíduos controles (n=10), pacientes com UCI (n=9), com ASST negativo (ASST-, n=4) e com ASST positivo (ASST+, n=5) após 18 horas de incubação na presença ou ausência (basal) de PHA. As células CD4<sup>+</sup> foram marcadas com anti-CCR5 PE e analisadas por citometria de fluxo. A linha horizontal representa a mediana. \* $P \leq 0,05$  quando comparado ao grupo controle. (MFI) Intensidade média de fluorescência. (%) Porcentagem.



**Figura 21. Determinação da expressão de CCR5 em células T CD8<sup>+</sup> na UCI.** CMN de indivíduos controles (n=10), pacientes com UCI (n=9), com ASST negativo (ASST-n=4) e com ASST positivo (ASST+, n=5) após 18 horas de incubação na presença ou ausência (basal) de PHA. As células CD8<sup>+</sup> foram marcadas com anti-CCR5 PE e analisadas por citometria de fluxo. A linha horizontal representa a mediana. \* $P \leq 0,05$  quando comparado ao grupo controle. (MFI) Intensidade média de fluorescência. (%) Porcentagem.

## **6 DISCUSSÃO**

Os resultados mostram que na UCI há um desequilíbrio imunológico, evidenciado pelo aumento da secreção de quimiocinas e citocinas, sejam pelos níveis séricos ou induzidos por estímulos. As alterações na produção de citocinas, foram encontradas sem predomínio de um determinado subtipo seja, Th1, Th2 ou Th17. Além disto, os dados evidenciaram intenso aumento das quimiocinas, especialmente de CXCL8 e CCL2, que explicam a ativação de monócitos e de linfócitos encontrado na UCI e que podem estar envolvidos na ativação de basófilos e mastócitos na UCI. Estes achados foram evidenciados em pacientes com UCI, de ambos subgrupos ASST, positivo e negativo.

A presença de quimiocinas e citocinas séricas representa um produto de uma série de populações celulares, até mesmo endoteliais e epiteliais, que podem ser produzidas no sítio inflamatório. Geralmente, as quimiocinas são detectáveis em maiores concentrações, já as citocinas são encontradas em baixos níveis nos soros de indivíduos saudáveis.

Inicialmente, realizamos o estudo abrangendo as citocinas séricas nos pacientes com UCI. As citocinas de perfil pró-inflamatório foram detectáveis em níveis elevados nos soros dos pacientes, sem relação quanto a positividade do ASST. As citocinas tipicamente inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  assim como IL-10 e IL-12p70 foram detectáveis na maioria dos pacientes com UCI (90%), o que não foi observado nos indivíduos controles. Quanto a IL-10, foi evidenciado que 13,79% dos pacientes (4/29) tiveram níveis detectáveis, correlacionando-se positivamente com TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-12p70.

Em contraste, foi descrito que os níveis de TNF- $\alpha$  determinadas por ELISA, não se alteram nos pacientes com UCI em relação ao grupo controle <sup>(65)</sup>. É possível que esta diferença seja devido a metodologia empregada, na qual a citometria de fluxo (*cytometric bead array*) possui alta sensibilidade e a vantagem de dosar vários analitos em uma pequena quantidade de amostra <sup>(66)</sup>.

Outra citocina com caráter inflamatório, como a IL-18 foi descrito estar elevado no soro dos pacientes com UCI, sem diferir quanto ao ASST nem quanto a teste de liberação de histamina <sup>(31)</sup>. Entretanto, mostrou correlação positiva de acordo com a gravidade da doença, ou seja, os que apresentam lesões mais graves possuíam maiores níveis de IL-18.



A capacidade *in vitro* de secreção de IL-2, IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17A por CMN induzidas por PHA durante 48 horas de cultura foi analisada nos pacientes com UCI. Um significativo aumento de IL-2 foi detectado em ambos os subgrupos ASST+ e ASST-, o que evidencia a ocorrência de ativação linfocitária nos pacientes com UCI (**Tabela 3**). Por outro lado, há descrição de diminuição de citocinas Th1 e Th2, como IL-2, IFN- $\gamma$  e de IL-4 nos pacientes com UCI comparados ao grupo controle <sup>(33)</sup>. Nossos resultados mostram que os níveis de IFN- $\gamma$  não se alteram, mas a produção de IL-4 diminui significativamente no subgrupo ASST+. A diminuição de IL-4 encontrada somente no ASST+, pode sugerir um maior consumo desta citocina, em decorrência da ativação celular. Entretanto, não avaliamos esta citocina em período mais precoce, como em 24 horas de cultura.

Além disto, no subgrupo ASST+ detectamos um significativo aumento da IL-17A em relação ao grupo controle, citocina esta relacionada com as células Th17, que até o momento não tinha sido determinada na UCI. A família da IL-17 é constituída por IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e IL-17F, sendo as isoformas A e F produzidas por uma população de linhagem específica de células T CD4<sup>+</sup> denominada Th17 <sup>(23)</sup>. Estas citocinas são fatores importantes na iniciação e manutenção de processos inflamatórios, envolvida na produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6, proteínas de fase aguda, G-CSF, e prostaglandina E2 <sup>(67)</sup> e que atua sinergicamente com o TNF- $\alpha$ . Além disto, a Th17 parece exercer um papel na patogênese das doenças autoimunes e inflamatórias crônicas, como a psoríase <sup>(68)</sup>, dermatite atópica <sup>(25, 69)</sup>, esclerose múltipla <sup>(70)</sup>, esclerose sistêmica <sup>(71)</sup>, pênfigóide bolhoso <sup>(72)</sup>, artrite reumatóide <sup>(73)</sup> e assim como no lúpus sistêmico <sup>(26)</sup>.

A IL-17A e F induzem a produção de várias citocinas e quimiocinas, incluindo TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, CCL2, CXCL8, GRO $\alpha$ , G-CSF, bem como a expressão de ICAM-1 por monócitos, células epiteliais das vias aéreas, células endoteliais vasculares e fibroblastos <sup>(25)</sup>. A IL-17 aumenta a produção de IL-6 e CXCL8 em queratinócitos e induz uma fraca expressão de ICAM-1 e HLA-DR <sup>(74-75)</sup>. Estes dados sugerem que a IL-17A que encontramos elevada na UCI, pode exibir um importante papel na ativação da secreção de quimiocinas, como CXCL-8 e CCL2, que foram detectadas aumentadas no soro e na secreção *in vitro*.

Nossos resultados mostram um perfil de hiperreatividade imunológica nos indivíduos ASST+, como observado pelo aumento de secreção de IL-17A, diminuição de IL-4 e aumento da capacidade linfoproliferativa ao PWM. Esse aumento da capacidade linfoproliferativa nos permite sugerir que as células B são hiperreativas ao estímulo PWM em colaboração com as células T. A normalidade de resposta T que observamos nos pacientes com UCI já tinha sido relatada previamente<sup>(76)</sup>. Alterações relacionadas ao crescimento celular podem estar envolvidas na patogênese da UCI, como descrito pelo aumento da expressão de p21RAS, proteína regulatória responsável por uma variedade de sinais extracelulares nas CMN dos pacientes<sup>(76)</sup>.

Para avaliar a expressão de RNAm de citocinas em situação de homeostase, a análise foi realizada em CMNs não estimuladas. Entre as citocinas avaliadas, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  não foi observado diferença de expressão entre as CMN de pacientes e controles. Contudo, a expressão do RNAm de IL-10 foi encontrada em níveis significativamente reduzidos nos pacientes com UCI no subgrupo ASST-. A IL-10 possui potentes propriedades imunológicas como cofator para a sobrevivência de células B, diferenciação, secreção de imunoglobulinas e proliferação, bem como na participação de processos inflamatórios. É possível que várias populações estejam implicadas na diminuição de IL-10 nas CMN dos ASST-, incluindo as células T, B, monócitos e DCs.

A **Tabela 3** mostra o perfil de secreção de citocinas na UCI de estudos da literatura, realizada em várias condições, seja no soro, induzida e mesmo quanto a expressão de RNAm.

Tabela 3: Níveis de citocinas em pacientes com UCI em relação à indivíduos saudáveis

	N	Soro	Estímulo <i>in vitro</i>	Expressão de RNAm
Piconi, et al., 2002	19	ND	↑ IL-10 ↑ TNF $\alpha$ ↓ IL-2 e ↓ IFN- $\gamma$ (ASST+) PHA	ND
Ferrer et al., 2002	77	↑ IL-4 = IFN- $\gamma$ e IL-5	↑ IL-4 e ↑ IFN- $\gamma$ (IC: CD4 <sup>+</sup> ) PMA	ND
Confino-Cohen et al., 2004	19	ND	↓ IL-2, ↓ IL-4, ↓ IFN- $\gamma$ PHA	ND
Caproni et al., 2004	68	↑ IL-13 (ASST+), = IL-4, IFN- $\gamma$	ND	ND
Tedeschi et al., 2006	62	= TNF- $\alpha$	ND	ND
Tedeschi et al., 2007	34	↑ IL-18	ND	ND
dos Santos et al., 2008	29	↑ IL-1 $\beta$ , ↑ IL-6, ↑ IL-10, ↑ IL-12p70, ↑ TNF- $\alpha$	ASST+: ↑ IL-2, IL-17A, IL-10; ↓ IL-4 ASST-: ↑ IL-2 = IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ PHA	↓ IL-10 (ASST-) = IL-2, IL-4, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$

ND: Não Determinado; ASST: *autologous serum skin test*; N: Amostragem, = Semelhante ao grupo controle; PHA: fitohemaglutinina; PWM: pokeweed mitogen; IC: Intracelular.

Uma das propostas do nosso Projeto foi avaliar o perfil de produção e os níveis séricos de quimiocinas na UCI, considerando que estes fatores exercem importante papel da patogênese da doença, já que são fundamentais para a migração de células inflamatórias para a pele e pela existência de poucos relatos na literatura.

Inicialmente, foi evidenciado uma elevação de MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, MCP-1/CCL2 e de IL-8/CXCL8 nos soros dos pacientes com UCI em relação ao grupo controle saudável, com exceção de RANTES/CCL5. A escolha destas quimiocinas também se deve por algumas estarem relacionadas ao padrão Th1, como o CXCL9, CXCL10 e CCL5 e outra por direcionar para o padrão Th2 como o CCL2<sup>(77)</sup>. A presença destas quimiocinas no soro representa a secreção por células endoteliais, epiteliais, bem como as células do sistema imune, os quais possuem ação em diversos tipos celulares, que expressam os adequados receptores. A dosagem das quimiocinas foi realizada por um método de citometria de fluxo que possui alta sensibilidade, como realizado anteriormente com as citocinas. A dosagem de CCL5 foi realizada por ELISA, pois os níveis séricos são encontrados muito elevados exigindo amplas diluições das amostras. É possível que a mudança de método possa ter interferido na sensibilidade.

Na UCI, foi descrito que os níveis séricos de CXCL10 e CCL17, avaliados por ELISA, foram indetectáveis nos pacientes<sup>(30)</sup> (**Tabela 4**). Novamente, esta diferença em relação ao CXCL10 pode estar relacionada ao método empregado, apesar do ELISA ser um método sensível.

Nossos achados na UCI, independente da positividade do teste de soro autólogo, um indicativo de autorreatividade, confirma em adição aos dados de citocinas a evidência de um desequilíbrio no perfil imunológico.

Alterações dos níveis séricos de quimiocinas são encontrados em doenças de caráter inflamatório e/ou autoimune. De fato, as concentrações de quimiocinas relacionadas com o tipo Th1 como CXCL10 e CXCL9 estão elevadas no soro de pacientes com esclerose sistêmica, dermatomiosite, doença de Graves e também em líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide<sup>(78)</sup>. Há controvérsias de achados quanto a CXCL10 e lúpus eritematoso sistêmico, onde os níveis séricos estão dentro da normalidade<sup>(78)</sup> ou encontram-se aumentados<sup>(79)</sup>, há dados também de CXCL8 e CCL2 na forma ativa de lúpus<sup>(79)</sup>. Outras quimiocinas, como CCL5 e

CCL2 são encontradas em concentrações elevadas no soro de pacientes com artrite reumatóide juvenil <sup>(80)</sup>.

Nos pacientes detectamos também um aumento da produção espontânea *in vitro* de CCL2 pelas CMN em relação aos indivíduos controles. Esta quimiocina pode ser produzida por macrófagos, monócitos, bem como por células epiteliais e endoteliais, e tem um papel fundamental na resposta inflamatória, capaz de atrair monócitos e linfócitos T para o sítio de inflamação <sup>(81)</sup>. No nosso estudo a secreção de CCL2 pelas CMN sugere que a população responsável por essa secreção sejam os monócitos, que vão influenciar os próprios monócitos assim como linfócitos T e basófilos, células que expressam CCR2. O CCL2 e outras isoformas (MCP-2-4) possuem a propriedade de direcionar a resposta imunológica para um padrão Th2, inibindo a produção de IL-12 pelas APC e por induzir aumento de IL-4 pelas células T ativadas <sup>(41)</sup>. Por esta razão avaliamos os níveis intracelulares de CCL2 em CMN para verificar qual a população celular que possa estar envolvida no aumento da secreção *in vitro*. Posteriormente, verificamos que as principais células produtoras de CCL2, são os monócitos CD14<sup>+</sup>.

As CMN dos pacientes com UCI sob ação do SEA foram capazes de secretar mais CCL2 do que os indivíduos saudáveis, sendo o mesmo não observado para a PHA. Os níveis espontâneos de CCL2 pelas CMN já se encontravam elevados, o que refletiu quando estimuladas com SEA. A partir deste estímulo, é possível que a secreção de CCL2 seja decorrente principalmente dos monócitos, considerando que este superantígeno pode se ligar diretamente às moléculas de MHC classe II em APCs, e também nas cadeias V $\beta$  do TCR <sup>(82)</sup>.

Na UC tem sido relatado a ocorrência de um processo inflamatório que ocorre independente dos autoanticorpos anti-Fc $\epsilon$ RI, ou seja, devido a fatores inflamatórios que podem levar a desgranulação de mastócitos cutâneos. Entre os fatores descritos incluem, aumento de MMP-9 (*matrix metalloproteinase-9*), uma endopeptidase dependente de zinco, responsável pelo remodelamento e degradação da matriz extracelular <sup>(83)</sup>, aumento do inibidor de metaloproteinases, o TIMP-1 e da proteína C reativa, CRP, no plasma de pacientes com UC comparado com indivíduos saudáveis. Além disto, os níveis plasmáticos de MMP-9 tem relação com a gravidade da doença <sup>(84)</sup>.

Os nossos dados enfatizam o perfil inflamatório da UCI, e chama atenção para fatores como o CCL2 que podem estar envolvidos na patogênese da UCI, considerando seu importante papel na desgranulação de basófilos e mastócitos. Este fator possui a capacidade de induzir liberação de histamina de basófilos, que pode ser potencializado na presença de IL-3<sup>(85)</sup>, independente da IgE<sup>(48)</sup>. Os monócitos expressam receptor de baixa afinidade para IgE (FcεRII/CD23), onde a ativação deste leva a liberação de CCL2<sup>(81)</sup>. O CCL2 representa uma interação entre a ativação de monócitos, linfócitos, basófilos, mastócitos e eosinófilos nas doenças inflamatórias como na fase tardia da reação alérgica<sup>(36)</sup>.

Além disto, o estímulo das CMN com a PHA induziu um aumento da produção de CXCL8 e CCL5 nos pacientes UCI em relação ao grupo controle. Avaliando quanto à resposta ao ASST, o aumento de CXCL8 foi detectado no subgrupo ASST negativo e para CCL5 em ambos, comparados ao grupo controle.

Da mesma forma, foi observado aumento da secreção de CCL5 em CMN estimuladas com PHA de pacientes com UCI<sup>(34)</sup>. O CCL5 é produzido por linfócitos T, e possui ampla ação, seja nos eosinófilos, linfócitos, monócitos e basófilos. O fato de que conjuntamente com CCL2, atuarem nos basófilos e mastócitos, colocam estes fatores como potenciais candidatos para explicar o grau de ativação destas células e induzirem desgranulação. De fato, foi observado anteriormente que os basófilos dos pacientes com UCI, estão numericamente reduzidos, mas mostram intensa expressão de moléculas de desgranulação como CD63 e CD203c<sup>(17)</sup>. Além disto, os basófilos são hiperrespondedores a estímulo anti-IgE quando pré-tratados com IL-3. Estes achados foram encontrados similarmente nos indivíduos ASST positivos e negativos, o que salienta a existência de fatores circulantes com potencial de ativar os basófilos, além dos autoanticorpos contra o receptor de alta afinidade para IgE.

Visto que a produção de CXCL8 e CCL2 estava elevada pelas CMN, avaliamos qual seria a população celular dentre as CMN responsáveis pela produção destas quimiocinas. Assim tornou-se necessário uma avaliação dos níveis intracelulares de CXCL8 e CCL2 em células CD14<sup>+</sup>, devido ao aumento da secreção dessas quimiocinas quando induzidas com estímulo específico para APC, bem como uma análise em linfócitos T, devido alterações encontradas quando CMN foram

estimulados com estímulo policlonal para células T, a PHA. De fato, o mais proeminente produtor *in vitro* de CXCL8 é o monócito <sup>(86)</sup>.

A expressão de CXCL8 foi encontrada majoritariamente em células CD14<sup>+</sup>, mesmo sem estimulação, sendo que, quando utilizado o estímulo SEA há uma queda na percentagem e na intensidade de expressão de CXCL8 nas células CD14<sup>+</sup>. Esta diminuição da expressão intracelular de CXCL8 nos monócitos de pacientes com UCI, é consequente a intensa secreção espontânea *in vitro* detectada pelas CMN de pacientes.

Uma das quimiocinas que mostrou importante alteração nos níveis foi o CCL2, seja no soro ou induzida pelo superantígeno SEA, que a maioria dos monócitos é produtora. Estes achados de CXCL8 e CCL2 evidenciam que a população de monócitos está ativada na UCI, e que contribuem na secreção de fatores quimiotáticos de células inflamatórias. Além disto, a secreção de CCL5 está elevada após estímulo para linfócitos T, e seu receptor, o CCR5 são expressos mais intensamente nos pacientes ASST positivo na população de linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Os dados enfatizam que ambas as populações seja de monócitos e linfócitos secretam ativamente fatores que podem contribuir para o processo inflamatório da UCI.

Em conjunto, os dados obtidos até o momento enfatizam a existência de desequilíbrio da produção sistêmica de citocinas e quimiocinas na UCI que devam contribuir para a cronicidade das lesões encontradas na pele. É possível que seja decorrente de um distúrbio dos mecanismos de regulação, seja mediado pelas células reguladoras e/ou seus fatores.

Tabela 4: Níveis de quimiocinas em pacientes com UCI em relação à indivíduos saudios

	N	Níveis		Estímulo <i>in vitro</i>	Níveis intracelulares
		Soro	Esponfâneos		
Piconi, et al., 2002	19	ND	ND	↑ CCL3 ↑ CCL5 (PHA)	ND
Caproni et al., 2004	68	↑ CCL3 (ASST-) = CCL17, CXCL10	ND	ND	ND
dos Santos (atual)	35	↑ CXCL8, ↑ CXCL10, ↑ CXCL9, ↑ CCL2, = CCL5	↑ CCL2 ↑ CCR5 (CD8 <sup>+</sup> )	↑ CCL2 (SEA), ↑ CXCL8, ↑ CCL5 (PHA)	↓ CXCL8 ↓ CCL2 (CD14 <sup>+</sup> ) (SEA)

ND: Não Determinado; ASST: *autologous serum skin test*; N: Amostragem, IC: Intracelular; = Semelhante ao grupo controle; PHA: fitohemaglutinina; SEA: enterotoxina A de *Staphylococcus aureus*



## **7 CONCLUSÕES**

Os resultados obtidos nos permitiram concluir:

- a existência de um desequilíbrio na produção de citocinas e quimiocinas na UCI, com predominância de citocinas pró-inflamatórias, incluindo uma provável participação das células produtoras de IL-17, que podem estar envolvidas no aumento da produção das quimiocinas CXCL8 e CCL2,
- a elevada capacidade de secreção de CXCL8 e CCL2 evidencia a participação das células CD14<sup>+</sup> na imunopatogênese da UCI, o que sugere que os monócitos também se encontram ativados nessa doença,
- o aumento da produção de CCL5 e da expressão de CCR5 evidencia a participação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> na imunopatogênese da UCI,
- as alterações encontradas quanto ao perfil de secreção e de expressão de citocinas e quimiocinas foram detectados tanto em pacientes ASST+ quanto em pacientes ASST-,
- em conjunto, os dados evidenciam que o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e das quimiocinas CXCL8, CCL2 e CCL5, sejam potenciais candidatos para a ativação e desgranulação de basófilos e mastócitos na UCI.



## ANEXO A: Aprovação de protocolo de pesquisa pela Cappesq (HC-FMUSP)



### APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 14/11/2007, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1016/07**, intitulado: "**PERFIL DE SECREÇÃO E EXPRESSÃO DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS NA URTICÁRIA CRÔNICA**" apresentado pelo Departamento de **DERMATOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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

Pesquisador (a) Responsável: **Profª. Drª. Maria Notomi Sato**

Pesquisador (a) Executante: **Juliana Cristina dos Santos**

CAPPesq, 21 de Novembro de 2007

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

## ANEXO B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



**HOSPITAL DAS CLÍNICAS**  
**DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO - BRASIL**

Anexo I

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

#### I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE : .....
- 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 (.....) .....

#### II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **“Perfil de secreção e expressão de quimiocinas e citocinas na Urticária Crônica”**
- PESQUISADOR: Maria Notomi Sato
- CARGO/FUNÇÃO: Professor Doutor                      INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº CRBM 1690
- UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Dermatologia
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
- SEM RISCO                          RISCO MÍNIMO                          RISCO MÉDIO
- RISCO BAIXO                          RISCO MAIOR
- (probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 02 anos

3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

Os dados obtidos poderão ser acessados somente pelos investigadores, comissão de ética da instituição e autoridades sanitárias do país.

4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

A pesquisa não envolve nenhum risco à sua saúde, mas qualquer eventualidade que possa ocorrer durante a coleta de sangue é assegurada a assistência por médicos do HC-FMUSP.

5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

Em qualquer eventualidade que possa ocorrer durante a coleta de sangue será assegurada a assistência médica.

---

**V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.**

---

**VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:**

---

**VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO**

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo,                      de                      de 2008.

---

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

---

assinatura do pesquisador  
(carimbo ou nome Legível)

### Anexo C

Tabela 2: Características individuais dos pacientes com Urticária Crônica Idiopática

Paciente	Sexo	Idade	Duração da doença (anos)	ASST	Angiodema	FAN	Anti-TPO	Anti-TG	Tireopatia
UCI 1	F	53	4	-	+	-	-	-	-
UCI 2	F	30	7	-	-	-	-	-	-
UCI 3	M	59	7	-	-	-	-	-	-
UCI 4	F	40	5	-	NC	-	-	-	-
UCI 5	F	40	2	+	-	-	-	-	-
UCI 6	M	61	4	-	+	-	-	-	+
UCI 7	M	37	3	-	+	-	-	-	-
UCI 8	F	55	4	+	+	-	-	-	-
UCI 9	F	45	7	+	+	-	-	+	-
UCI 10	F	43	11	-	+	-	-	-	-
UCI 11	F	55	31	+	+	-	-	-	-
UCI 12	F	42	10	-	-	-	289	1696	-
UCI 13	F	42	NC	-	NC	-	-	-	-
UCI 14	M	67	2	+	-	+	-	-	-
UCI 15	F	62	9	-	+	-	-	-	-

UCI :Urticária Crônica Idiopática, ASST: *Autologous Serum Skin Test*, FAN: Anticorpo Anti-Nuclear, TG: Anticorpo Anti-Tireoglobulina e

TPO: Anticorpo Anti-Tireoperoxidase, NC: Não Consta.

**Tabela 2 (continuação):** Características individuais dos pacientes com Urticária Crônica Idiopática

Paciente	Sexo	Idade	Duração da doença (anos)	ASST	Angiodema	FAN	TPO	TG	Tireopatia
UCI 16	F	50	11	-	-	1:40	-	-	-
UCI 17	F	38	3	+	+	-	-	-	-
UCI 18	F	52	6	+	+	1:40	-	-	-
UCI 19	F	57	5	-	+	1:40	-	-	-
UCI 20	F	39	16	-	-	-	-	-	-
UCI 21	F	65	34	-	+	-	NC	NC	-
UCI 22	F	42	12	+	NC	-	-	-	NC
UCI 23	F	64	NC	-	NC	NC	NC	NC	NC
UCI 24	M	61	NC	+	NC	-	-	59	NC
UCI 25	F	47	24	+	+	-	-	-	-
UCI 26	F	43	0,5	+	+	1:40	+	-	+
UCI 27	F	45	12	+	+	-	-	-	-
UCI 28	F	66	16	+	+	1:160	-	-	-
UCI 29	F	51	5	-	+	-	-	-	+
UCI 30	F	58	NC	-	NC	-	-	-	NC

UCI :Urticária Crônica Idiopática, ASST: *Autologous Serum Skin Test*, FAN: Anticorpo Anti-Nuclear, TG: Anticorpo Anti-Tireoglobulina e

TPO: Anticorpo Anti-Tireoperoxidase, NC: Não Consta,



**Tabela 2 (continuação):** Características individuais dos pacientes com Urticária Crônica Idiopática

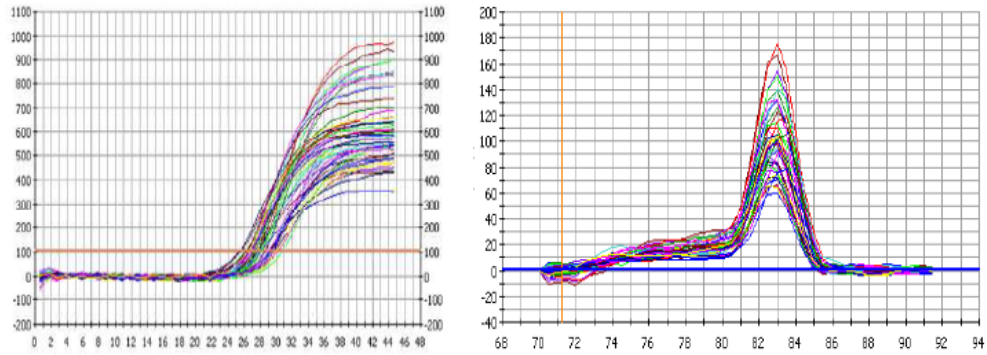
Paciente	Sexo	Idade	Duração da doença (anos)	ASST	Angiodema	FAN	TPO	TG	Tireopatia
UCI 31	F	19	6	+	+	NC	-	-	NC
UCI 32	F	40	26	-	+	-	-	-	-
UCI 33	M	22	1,5	+	+	-	-	-	-
UCI 34	F	28	18	+	+	-	-	-	-
UCI 35	F	54	19	-	+	-	-	-	+
UCI 36	F	30	12	-	+	-	+	-	-
UCI 37	F	41	3	-	-	-	-	-	-

UCI :Urticária Crônica Idiopática, ASST: *Autologous Serum Skin Test*, FAN: Anticorpo anti-fator nuclear, TG: Anticorpo anti-tireoglobulina e

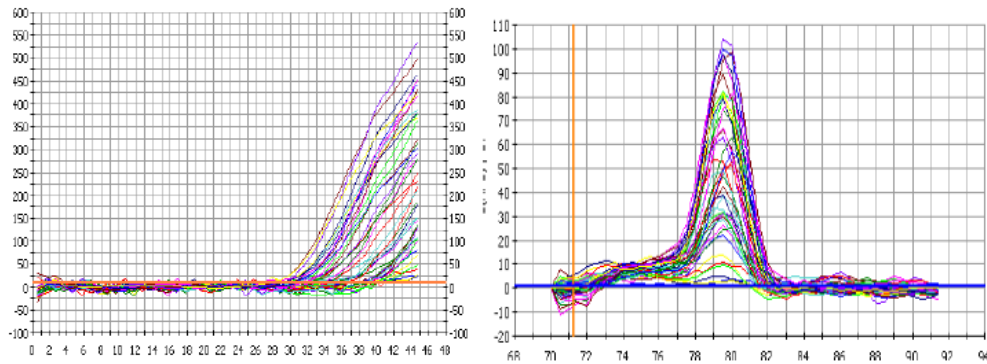
TPO: Anticorpo anti-tireoperoxidase, NC: Não Consta.

## Anexo D: Curvas de amplificação e dissociação (Real-Time PCR)

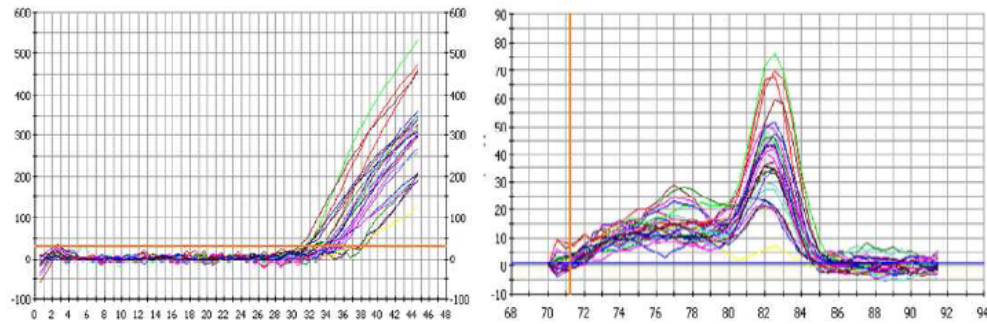
### Albumina



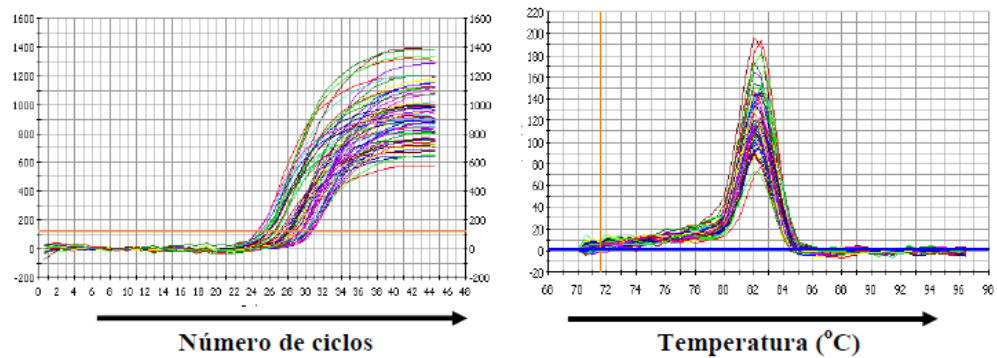
### IL-2



### IL-4

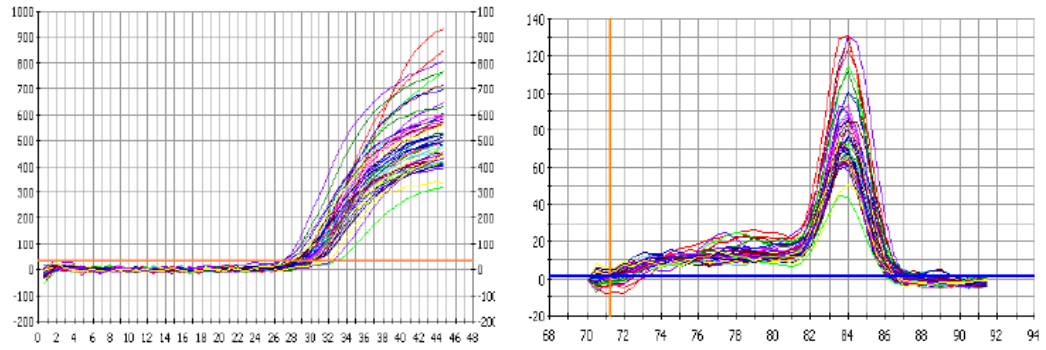


### IL-6

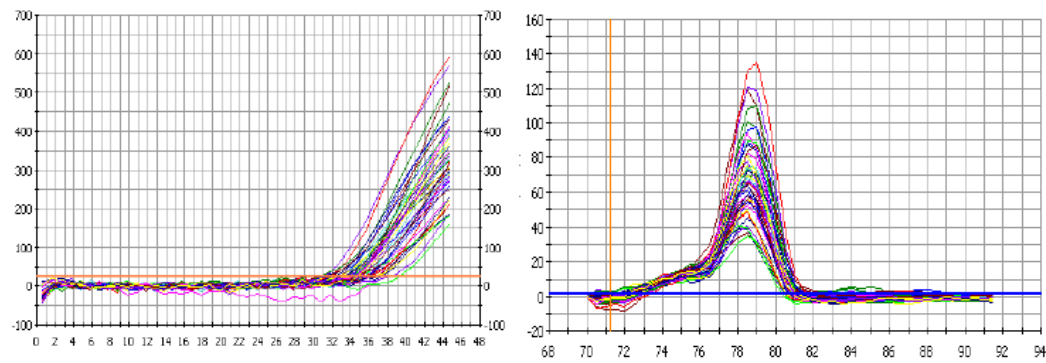


## Anexo D (continuação): Curvas de amplificação e dissociação (Real-Time PCR)

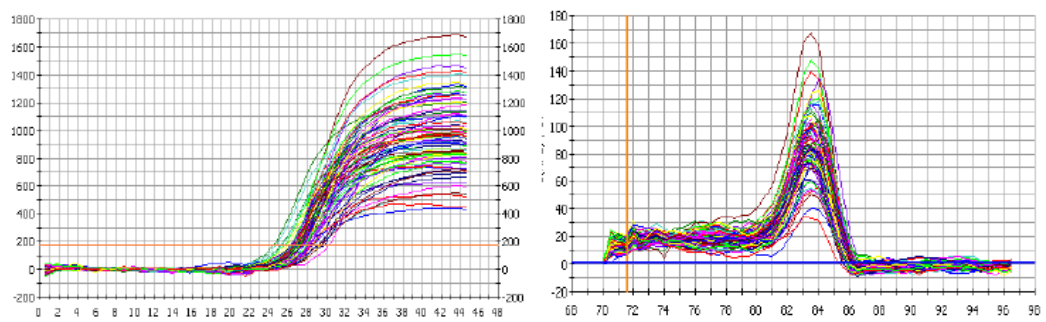
### IL-10



### IFN $\gamma$



### TNF- $\alpha$



—————→  
Número de ciclos

—————→  
Temperatura (°C)



## Increased circulating pro-inflammatory cytokines and imbalanced regulatory T-cell cytokines production in chronic idiopathic urticaria

Juliana Cristina dos Santos<sup>a</sup>, Mayce Helena Azor<sup>a</sup>, Viviane Yoshimi Nojima<sup>a</sup>, Francinelson Duarte Lourenço<sup>a</sup>, Erica Prearo<sup>b</sup>, Celina Wakisaka Maruta<sup>b</sup>, Evandro Ararigóia Rivitti<sup>b</sup>, Alberto José da Silva Duarte<sup>a</sup>, Maria Notomi Sato<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Dermatology and Immunodeficiencies (LIM-56), Department of Dermatology, Medical School of the University of São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>b</sup> Dermatological Outpatient Clinic, Hospital das Clínicas, Medical School of the University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Received 30 March 2008; received in revised form 29 May 2008; accepted 29 May 2008

### KEYWORDS

Chronic idiopathic urticaria;  
Pro-inflammatory cytokines;  
T-cell cytokines;  
Lymphoproliferation;  
mRNA

### Abstract

The immunologic characterization of chronic idiopathic urticaria (CIU), mainly regarding cytokine profile needs more investigation. We examined circulating inflammatory cytokine levels, T-cell induced secretion, and cytokine mRNA expression in patients with CIU subjected to the intradermal autologous serum skin test (ASST). Increased levels of circulating pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12p70, and IL-6 have been observed in most of patients with CIU, together with an enhancement of IL-2 secretion following T-cell stimulation. Highlighting the inflammatory profile in CIU found in ASST positive, is the enhanced B-cell proliferative responsiveness and increased IL-17 secretion levels. ASST-positive patients also exhibited impaired IL-4 secretion associated with increased IL-10 production. Altered cytokine expression in patients with ASST-negative, was the down-modulation of spontaneous IL-10 mRNA expression levels in peripheral blood mononuclear cells. Our findings support the concept of immunologic dysregulation in CIU, revealing a systemic inflammatory profile associated with disturbed cytokine production by T cells, mainly related to IL-17 and IL-10 production.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

*Abbreviations:* CIU, Chronic Idiopathic Urticaria; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; ASST, autologous serum skin test; HC, healthy control; PHA, phytohemagglutinin; PWM, pokeweed mitogen; SEA, staphylococcal enterotoxin A.

\* Corresponding author. Laboratory of Investigation in Dermatology and Immunodeficiencies, LIM 56, Department of Dermatology, School of Medicine, University of São Paulo Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 500, 3rd floor, 05403-000-São Paulo, Brazil. Tel.: +55 11 30617499; fax: +55 11 30817190.

E-mail address: marisato@usp.br (M.N. Sato).

1567-5769/\$ - see front matter © 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.intimp.2008.05.016



## 1. Introduction

Chronic urticaria is a common disabling disorder occurring in 0.1% of the population, with an average episode length of 3–5 years in adults [1]. Chronic urticaria is considered idiopathic (CIU) in a substantial percentage of cases, whereas approximately 35% to 40% of patients appears to be of autoimmune origin [2,3]. Since they have circulating IgG antibodies directed against the  $\alpha$ -subunit of the high-affinity IgE receptor (Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ ) or less commonly, against IgE itself. Circulating autoantibodies initiate a urticarial eruption by cross-linking the IgE receptor, thereby activating cutaneous mast cells [4]. The autoimmune subgroup represents the most severe form of chronic urticaria [5,6]. However, the pathogenic mechanism in the 55% to 60% of patients with CIU remains unknown. Other circulating mediators, such as cytokines produced by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) that may modulate secretion of cytokines of various other innate and adaptive immune cells may also function as histamine-releasing factors [7,8]. A positive autologous serum skin test (ASST) is a marker of CIU, together with an *in vitro* basophil and mast cell histamine-release assay. Although the ASST is a test of autoreactivity rather than a specific test of autoimmunity, it is not known if positivity to the ASST may identify an immunologic subset of CIU patients.

Activated mast cells may release both preformed and newly synthesized mediators, as well as chemotactic factors and cytokines that recruit and activate various inflammatory cells, such as polymorphonuclear cells (PMNs) and lymphocytes. Cytokines and chemokines promote immune cell recruitment and activation, and thus play an integral role in the coordination and persistence of chronic inflammation. Therefore, circulating cytokines have been described to facilitate the perpetuation of cellular and humoral autoimmune processes [9,10]. The inflammatory response exemplified by spontaneous wheals demonstrates pro-inflammatory features, involving a prominent role for lymphocytes with a mixed Th1/Th2 response [11], and neutrophils, adhesion molecules, IL-8 and chemokine receptors exerting main role in the inflammation [12]. In contrast, ASST induced wheals seem to imply different activities mainly represented by basophil granulocytes and IL-4 [12].

Furthermore, inflammatory etiopathogenesis in CIU has been described as related to increased IL-4, IL-13, and IL-18 serum levels [13–15]. Cytokines in the circulation are a feature of amplified inflammation in chronic urticaria that may be helpful in understanding the immunopathogenesis of the idiopathic variety of chronic urticaria.

Cytokines are the dominant factors guiding the development, differentiation, and regulation of immune cells. Nevertheless, a dependency on the type of *in vitro* stimulus has been shown in CIU patients with respect to different patterns of cytokine production. High levels of IL-4 and IFN- $\gamma$  produced by activated CD4<sup>+</sup> T cells upon phorbol myristate acetate stimulation [13] and down-regulation of both Th1 and Th2 cytokines upon phytohemagglutinin (PHA) stimulation, regardless of the ASST response, have both been described in CIU [16]. Moreover, high levels of IL-10 induced by mitogen have been verified in patients with CIU, again without regard to a positive or negative ASST response [17].

Inflammatory cytokines, such as IL-17, have been related with a number of human autoimmune and inflammatory dis-

eases [18,19], though this has not yet been evaluated in CIU. In humans, IL-17 production is generally thought to be restricted to T cells, secreted by activated CD4<sup>+</sup> T cells (Th1 and Th0 cells, but not Th2) [20]. A new CD4<sup>+</sup> T effector lineage, known as Th17, in which IL-17 is the major cytokine factor, have been shown to be significantly related to immune regulatory effects, such as the regulation of tissue inflammation [21]. Th17 cells are likely a mechanism through which the adaptive immune system communicates with the innate immune system to promote inflammation.

In the present study, we focused our attention on cytokine production, examining in particular the circulating levels and T-cell induced secretion. We also estimated peripheral immune status by assessing cytokine mRNA synthesis by PBMCs from CIU patients subjected to the ASST. We therefore tested the immunological competence of patients with CIU through examining the *in vitro* polyclonal B and T-cells proliferative response.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study subjects

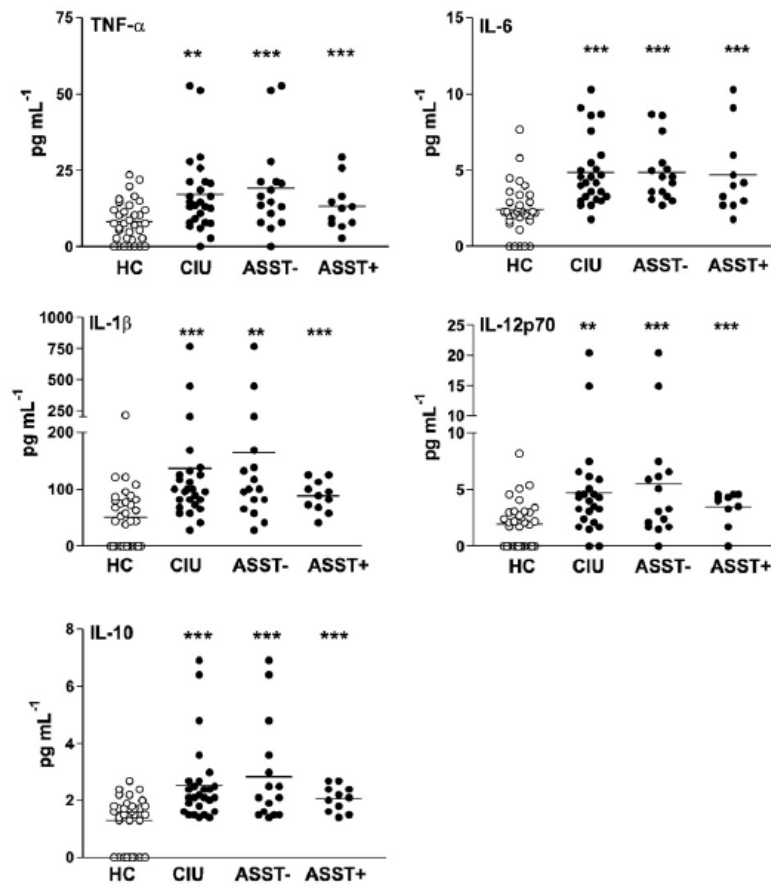
All patients with continuous CIU were selected from the Dermatological Outpatient Clinic of the Hospital das Clínicas de São Paulo (HC-FMUSP). These patients had wheals daily for 6 weeks or longer, occurring at least 4 times a week. Patients with physical urticaria, urticarial vasculitis, or food allergies were excluded, as previously described [22]. Antihistamine medications were withdrawn 48 h before the study, and none of the patients was taking corticosteroids or immunosuppressive drugs at the time of venipuncture. Samples were obtained from 29 patients with CIU (5 males and 24 females; median age 42.5 years, aged 20–66 years) and 33 health controls (7 males and 26 females, median age 35.5 years, aged 23–57 years). All subjects gave written informed consent, and the study protocol was approved by the institutional ethics committee of the HC-FMUSP.

### 2.2. Autologous serum skin test

All patients were subjected to an ASST performed according to standard methods using fresh autologous serum injected intradermally into the volar forearm skin. A positive skin test was defined as the appearance of a red serum-induced weal with a diameter  $\geq 1.5$  mm than that of the saline-induced response at 30 min.

### 2.3. Lymphoproliferative response

PBMCs were isolated from heparinized venous blood by Ficoll-Hypaque gradient (Pharmacia, Sweden) centrifugation and were diluted in RPMI medium supplemented with gentamicin (40  $\mu$ g/mL) and 10% pooled AB human serum (Sigma, St Louis, MO, USA). Cells ( $2.0 \times 10^5$  cells/well) were cultivated in 96-well flat bottom microplates (Costar, Cambridge, MA, USA) with medium only, 2.5  $\mu$ g/mL PHA (Gibco-BRL, NY, USA), pokeweed mitogen (PWM, 5  $\mu$ g/mL; Sigma, St. Louis, MO, USA), or staphylococcal enterotoxin A (SEA, 0.04  $\mu$ g/mL; Sigma), at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Cells were cultured in triplicate for 3 d or 6 d, then pulsed with 1  $\mu$ Ci/well of <sup>3</sup>H-Thymidine (New England

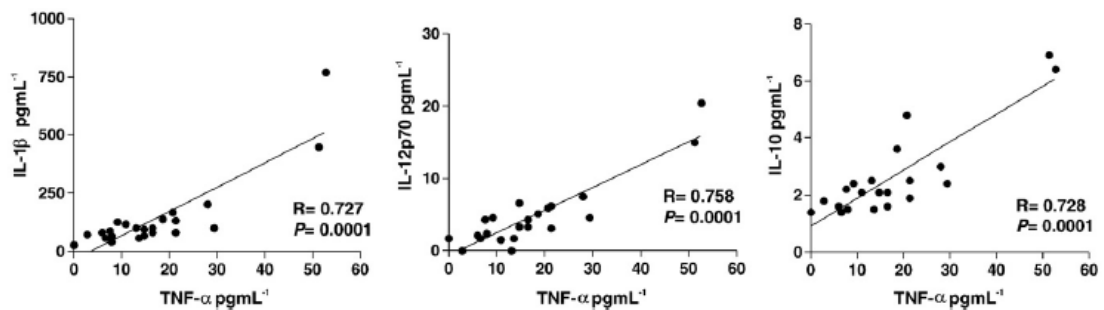


**Figure 1** Circulating cytokine levels in patients with CIU were evaluated by cytometric bead array. HC, sera from healthy controls; CIU, sera patients; ASST-, CIU with negative ASST; ASST+, CIU with positive ASST. The horizontal line represents the means. \*\*\**P*<.001, \*\**P*<0.01 compared with the HC group.

Nuclear, USA) per well for an additional 18 h before harvest. Cell-bound radioactivity was measured by liquid scintillation counting (1205 Betaplate, Wallac, USA). Proliferation was quantified by stimulation index (SI), which is calculated as the ratio of mean counts per minute (cpm) of stimulated to unstimulated replicates.

**2.4. Cytokine measurements**

Cultures of PBMC (3.0×10<sup>6</sup> cells/well) in RPMI medium supplemented with 10% AB human serum (Sigma) were incubated in 24-well plates (Costar) with medium or PHA (2.5 μg/mL) for 24 and 48 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Cell-free supernatants were



**Figure 2** Correlation of TNF-α with IL-1β IL12p70 and IL-10 serum levels from patients with CIU.

**Table 1** Profile of *in vitro* lymphoproliferative mitogens responsiveness in CIU patient

Stimulus	Groups			
	Healthy control	CIU	ASST-	ASST+
PHA#	98.95 ± 59.54	119 ± 92.42	105.3 ± 63.39	133.7 ± 116.7
SEA	63.22 ± 37.49	79.84 ± 57.32	66.46 ± 43.98	90.13 ± 65.64
PWM	63.75 ± 52.49	96.50 ± 60.91*	90.72 ± 64.86	102.3 ± 58.73**

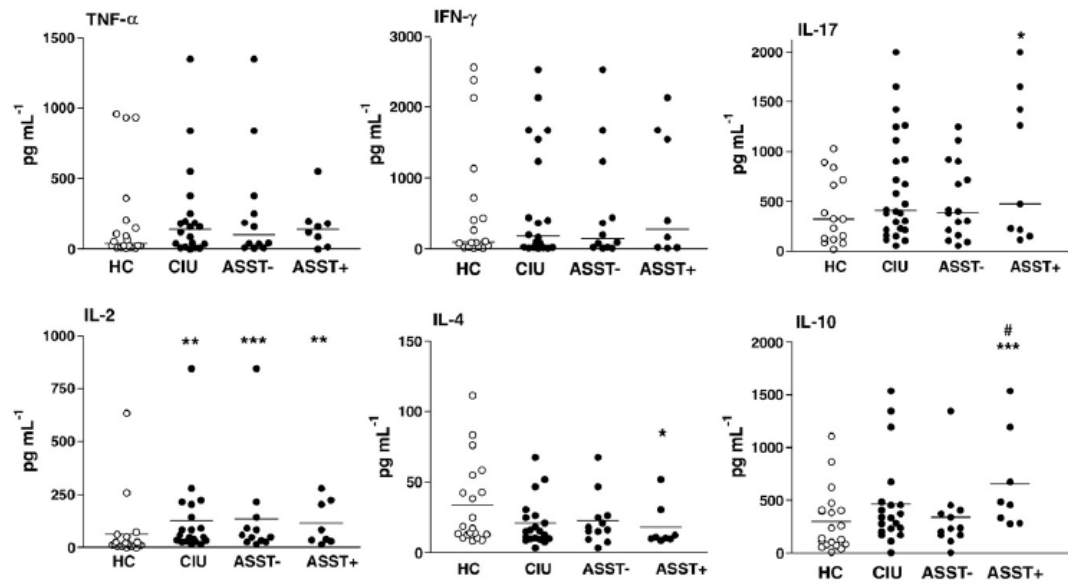
# Data represent the mean ± SD of stimulation index obtained from PBMC proliferative response of healthy control individuals (HC, N=29), CIU patients (CIU, N=29), and patients divided according to ASST result, negative (N=15) or positive (N=14). \*P<0.026, \*\*P<0.01 vs. HC individuals.

harvested and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ . Cytokines from appropriately diluted culture supernatant and undiluted serum were measured using Th1/Th2 and inflammatory cytokine bead array (CBA) kits (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA). Briefly, latex particles with 6 different fluorescent intensities coated with antibodies against specific cytokines were incubated with the samples. The particles were then labeled with a mixture of PE conjugated cytokine-specific antibodies and analyzed by flow cytometry (FACSCalibur, BD, San Jose, CA). IL-17A measurement of the culture supernatants was performed by ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN), and reaction was read at 450 nm in an ELISA microplate reader (Molecular Devices).

## 2.5. RNA isolation from PBMC and real-time polymerase chain reaction

RNA was isolated from PBMC ( $1 \times 10^6$  cells) using the QIAamp RNA Blood Mini kit (Qiagen, Valencia, CA). Reverse transcription was performed using a cDNA synthesis kit, Sensiscript

Reverse Transcriptase (Qiagen). Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed on 3.0  $\mu\text{L}$  cDNA, with 20  $\mu\text{L}$  Platinum SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0.8  $\mu\text{L}$  ROX Reference Dye, 14.6  $\mu\text{L}$  RNase/DNase-free water, and 0.8  $\mu\text{L}$  (10  $\mu\text{M}$ ) of gene-specific primers (Invitrogen, Carlsbad, CA). RT-PCR was carried out in an iCycler (BioRad, EUA) based on specific cytokine primers and general SYBR green fluorescence detection for 45 cycles of: denaturation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 15 s; annealing at  $62^{\circ}\text{C}$  for 5 s, and extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 15 s. For TNF- $\alpha$  the annealing and extension were performed at  $60^{\circ}\text{C}$  for 1 min. Primers sets were as follows: albumin sense: 5'-GCTGTCATCTCTTG TGGGCTGT-3', albumin antisense: 5'-AAA-CTCATGGGAGCT GCTGGTT-3', melting temperature ( $T_m$ )  $70^{\circ}\text{C}$ ; IFN- $\gamma$  sense: 5'-GTTTTGGGTTCTCTTGGCTGTTA-3', IFN- $\gamma$  antisense: 5'-AAAA-GAGTTCCATTATCCGCTACATC-3'; IL-4 sense: 5'-ACAGCCTCACAG AGCAGAAGACT-3', IL-4 antisense: 5'-TGTTCTTGGAGGCAGCAAAGA-3'; IL-10 sense: 5'-GCTGG-AGGACTTTAAGGGTTACTCT-3', IL-10 antisense: 5'-CTTGA-



**Figure 3** Profile of cytokines secretion induced by PHA stimulation in patients with CIU. Measurements of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 and IL-10 in supernatants of PBMC cultures from health control individuals (HC), patients with CIU, ASST negative (ASST-) or positive (ASST+) upon PHA stimulus for 48 h were performed by cytometric bead array. Determination of IL-17 was carried out by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Horizontal line represents means. \*\*\*P<.001, \*\*P<.01 and \*P<.05 compared with the HC group; #P<.05 compared with the ASST- group.



TGTC TGGGTCTTGTTGT-3'; TNF- $\alpha$  sense: 5'-CCCAGGCAGT-CAGATCATC TTC-3', TNF- $\alpha$  antisense: 5'-GCTTGAGGGTTGCTA-CAACATG-3' (Tm 55 °C) [23–25]. The copy number of cytokine message was normalized to the housekeeping gene, albumin, and presented as a ratio of cytokine to albumin copy number.

## 2.6. Statistical analysis

The Mann–Whitney *U* test was used to compare variables between patients with CIU and healthy subjects. The Kruskal–Wallis test with Dunn's posttest was used to compare non-paired data between 3 sets of data. Correlations of data were analyzed by the non-parametric Spearman test. *P* values less than .05 were considered significant.

## 3. Results

### 3.1. Circulating cytokines in chronic idiopathic urticaria

Typical inflammatory cytokines, such as TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, as well as IL-12p70 and IL-10 were significantly increased in sera from patients with CIU compared to healthy control (HC) individuals (Fig. 1). Alteration of cytokine levels was verified to occur in CIU patients with both positive and negative ASSTs.

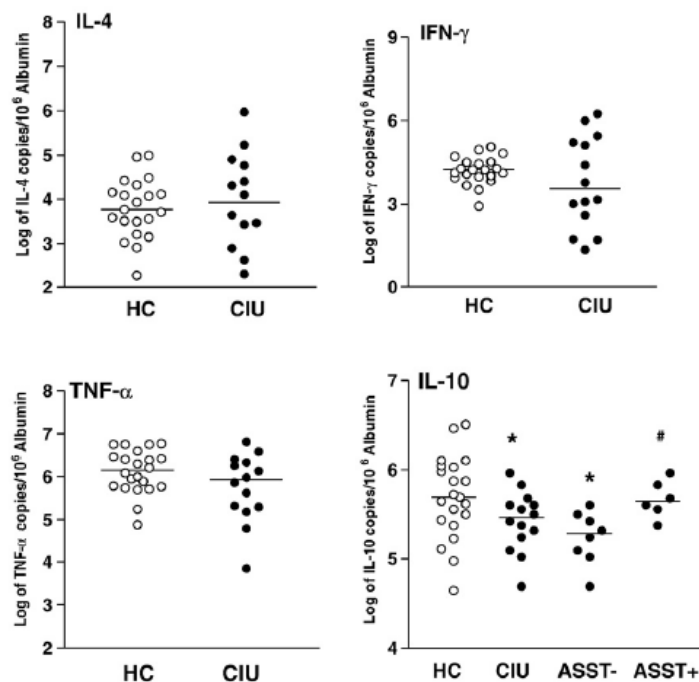
We were unable to detect cytokines in a large percentage of HC sera samples. These negative percentages were 21% for TNF- $\alpha$  (7 of 33), 36.4% for IL-12p70 and IL-1 $\beta$  (12/33); 57.6% for IL-6

(19 of 33), and 100% for IL-10. The frequency of undetectable cytokines in the sera of CIU patients was lower than seen in HCs, 14% IL-12p70 (4/29), 6.9% TNF- $\alpha$  (2/29), only 1 negative case for IL-6, and none were negative for IL-1 $\beta$ . There was one exception, IL-10, which was detectable in only 5 patients, all of which belonged to the negative ASST group. As shown in Fig. 2, TNF- $\alpha$  serum levels of CIU patients displayed a strong positive correlation with IL-1 $\beta$  ( $R=0.727$ ,  $P=0.0001$ ), IL-12p70 ( $R=0.758$ ,  $P=0.0001$ ), and IL-10 levels ( $R=0.728$ ,  $P=0.0001$ ). We observed a weak correlation between TNF- $\alpha$  serum levels from HC individuals and IL-12p70 levels ( $R=0.468$ ,  $P=0.012$ ).

### 3.2. *In vitro* proliferative response to mitogen and T-cell cytokine production in patients with CIU

To verify the cytokine secretion response to T-cell mitogenic stimulus, we first analyzed the *in vitro* PBMC  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation after PHA, PWM, or the bacterial superantigen, SEA. The lymphoproliferative response of patients with CIU to both PHA and SEA was comparable to the HC group (Table 1). However, patients with CIU displayed a significantly increased PBMC proliferative response to PWM, due to the enhanced response of positive ASST patients compared to HC individuals.

Fig. 3 shows that PHA-stimulated IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  levels were similar between patients and controls. A significant increase in IL-2 secretion was observed in patients with CIU compared to HC individuals, regardless of ASST response. A similar pattern of IL-



**Figure 4** Spontaneous cytokine mRNA expression by PBMCs from patients with CIU. HC, unstimulated PBMC from healthy individuals; CIU, patients with CIU; ASST- negative for ASST; ASST+, positive for ASST. IFN- $\gamma$ , IL-4, TNF- $\alpha$ , IL-10, and albumin mRNA expression levels were measured by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction. Horizontal line represents means. \* $P < 0.05$  compared with the HC group; #  $P < 0.05$  compared with the ASST- group.



10 and IL-4 secretion was found in both patient and control groups; however, paradoxical production of IL-10, concomitant with decreased IL-4 was detected in patients with a positive ASST. Furthermore, patients with positive ASST revealed highly variable, but significantly increased IL-17 secretion compared to healthy control individuals.

Together, these findings demonstrate the presence of circulating pro-inflammatory cytokines in the majority of patients with CIU, as well as altered cytokine production by T cells, particularly in patients with a positive ASST response.

### 3.3. Spontaneous cytokines mRNA expression in PBMC from CIU patients

To verify the steady-state levels of cytokine mRNAs, unstimulated PBMC were evaluated by Real Time PCR, as shown in Fig. 4. Spontaneous mRNA expression of IFN- $\gamma$ , IL-4, TNF- $\alpha$ , as well as IL-2 and IL-6 (data not shown) were found at similar levels in both patients with CIU and controls. We did not observe differential expression of these cytokines among patients according to the ASST response. Unexpectedly, IL-10 mRNA expression levels were significantly decreased in patients with CIU, due to the negative ASST patients, compared to both the HC group and ASST positive patients.

## 4. Discussion

The inflammatory etiopathogenesis of CIU was characterized in this study by increased circulating levels of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$ , IL-12p70, TNF- $\alpha$  and IL-6.

Systemic circulation of cytokines may reflect production by many cell types, and is likely produced mainly at the site of inflammation, therefore it is rarely measurable in healthy individuals. Contrary to healthy individuals, more than 90% of the patients with CIU had detectable levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$ , and 84% for IL-12p70. These results also demonstrate that the use of sensitive multiplex bead-based flow cytometry assay for circulating cytokines may be useful in the diagnosis/prognosis of diseases with basis in immune function disorder. The data further reinforces a possible role for inflammatory cytokines in idiopathic urticaria, which represents the majority of chronic urticaria patients [1,2]. However, it has been showed that the TNF- $\alpha$  levels are not altered in blood of patients with CIU [26]. One reason for the circulating TNF- $\alpha$  levels found in our study is probably the use of cytometric bead array system for measuring serum cytokine concentrations.

The typical inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6, as well as IL-12p70 detected in the sera of CIU patients may be implicated as factor(s) contributing to the skin lesions seen in CIU, as well as to influencing the behavior and properties of immune and other cells. In a previous report, we showed that peripheral blood basophils of CIU patients have an activated status *ex vivo*, displaying up-regulation of degranulation/activation surface markers together with IL-3-induced hyperresponsiveness for anti-IgE cross-linking histamine release [22]. This emphasizes that, besides the possibility of an intrinsic basophil defect, some circulating factors may favor the maintenance of activated basophils in the peripheral blood. Circulating cytokines, such as IL-18, have been suggested to be histamine-releasing factors, since IL-18 has been

found at high levels in CIU patients with positive ASST in parallel with clinical severity scores [15].

With regard of cytokine secretion induced by T-cell stimulation, we observed that IL-2, an essential cytokine for T-cell activation, was increased in CIU patients, despite the observation of a normal polyclonal T-cell proliferative response. It has been described in CIU, a disturbance in the p21Ras pathway in lymphocytes [27], which proto-oncogene is involved in T-cell receptor activation, as well as in IL-2 receptor signaling [28]. Also they showed that patients retained a normal *in vitro* proliferative response to T-cell mitogen [27]. Although we found an activated T-cell profile in CIU patients, this did not seem to interfere with the *in vitro* T-cell mitogen proliferative response. Nevertheless, we found that patients positive for ASST had an increased B-cell responsiveness toward pokeweed mitogen, indicating that B-cell polyclonal activation is further enhanced when requiring T-cell activation and/or cytokine production. However, we did not performed *in vitro* assays for histamine-releasing factors. It should be an important parameter for chronic autoimmune urticaria, since ASSTs and *in vitro* histamine-release assays seem to look into distinct aspects of the disease, and the specificity of ASST has been questioned [29].

Altered production of the IL-10 was observed in CIU at 3 levels: 1) in the circulation, 2) spontaneous mRNA expression, and 3) protein secreted upon T-cell stimulus. A small percentage of CIU patients with negative ASST exhibited increased IL-10 serum levels, probably produced by macrophages or keratinocytes, other than T cells, B cells, or monocytes, since, in the steady-state condition, peripheral mononuclear cells from these patients have shown down-modulation of IL-10 mRNA levels. However, unsorted peripheral mononuclear cells do not determine which cell population was responsible for the decreased IL-10 expression, allowing only verification of the peripheral immune status.

Moreover, patients with positive ASST displayed increased IL-10 secretion upon T-cell stimulus. In CIU, high levels of IL-10 were previously shown to be induced by mitogen, accompanied by decreased IFN- $\gamma$ , in patients with or without positive response to ASST [17]. Our findings indicate that alteration of IL-10 secretion is not related with modulation of IFN- $\gamma$  expression or secretion. Indeed, dysregulation of IL-10, occurred to different degrees according to the ASST response of CIU patients. IL-10 is well known to down-regulate specific effector function in monocytes, dendritic cells, natural killer cells, B cells, Th1 cells, and PMNs [30–32], which may result in diminished production of pro-inflammatory cytokines and chemokines. Moreover, IL-10 may exert potent immune stimulatory properties, as a cofactor for B-cell survival, proliferation, differentiation, and Ig secretion, as well as inducing the proliferation of CD8 T+ cell cytotoxic activity and enhancing T-cell responsiveness to IL-2 [33]. The increased IL-10 levels detected in patients presenting CIU, who were ASST positive, could be a consequence of an increase in systemic inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$  and IL-12. This observation was supported by the positive correlation between IL-10 and TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12 verified only in CIU patients, but not in healthy individuals. These pro-inflammatory cytokines may lead to an up-regulation of IL-10 expression, as observed in certain inflammatory disorders [34,35].

Interestingly, our results highlight the inflammatory profile found in CIU patients with a positive skin test, demonstrating enhanced IL-17 secretion levels induced by T-cell stimulus. IL-17 is known to possess broad inflammatory function; it induces expression of many innate inflammatory mediators, including IL-6, acute phase proteins, G-CSF, and prostaglandin E2 [36], and may synergize with TNF- $\alpha$ . The specific lineage of CD4<sup>+</sup> T cells that secrete IL-17 (T helper 17, Th17), has emerged though mounting evidence to play a central role in inflammation and autoimmunity [18,19]. Furthermore, in humans, Th17 cells require T-cell receptor ligation by cell-cell contact with Toll-like receptor-activated monocytes [37], and unlike IFN- $\gamma$ , IL-17 expression is not down-regulated by the presence of FOXP3<sup>+</sup> regulatory CD4<sup>+</sup> T cells [37]. Of note, patients with CIU and ASST positivity, show a similar pattern of IL-10 and IL-17 secretion upon T-cell stimulus, in parallel to increased circulating levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6. These pro-inflammatory cytokines, in turn, are known to be induced by IL-17, which may contribute to the inflammatory profile founded in CIU. A possible role of IL-17 in the pathology of inflammatory skin disorders, such as psoriasis, contact hypersensitivity and atopic dermatitis has been described, which indicates that IL-17 is an important mediator of tissue inflammation [38]. In chronic idiopathic urticaria, it might be relevant to verify whether Th17 cells are involved in its pathogenesis and the extent of their involvement.

Altogether the findings of this report support the concept of immunologic dysregulation in CIU, reflected by the systemic inflammatory profile in association with a disturbance of T-cell induced cytokine production. The common immunological feature in CIU was the presence of circulating pro-inflammatory cytokines, which were found in the majority of patients regardless of their ASST status. Others observed immunological features were primarily related to patients with positive ASST, including enhanced B-cell proliferative response, and increased IL-17 and IL-10 secretion levels, together with impaired IL-4 secretion. Understanding the mechanism through which the signals from regulatory T cells and/or IL-10 are integrated to influence the generation of the pro-inflammatory effects of IL-17 and other typical pro-inflammatory cytokines will be critical knowledge for the comprehension of the inflammatory etiopathogenesis in chronic idiopathic urticaria.

### Acknowledgments

This research was supported by FAPESP (no. 2004/06937-5), CAPES and UJM 56-HC/FMUSP.

### References

- [1] Greaves MW. Chronic urticaria in childhood. *Allergy* 2000;55:309–20.
- [2] Greaves MW. Chronic idiopathic urticaria. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003;3:363–8.
- [3] Kaplan AP. Chronic urticaria: pathogenesis and treatment. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:465–74.
- [4] Hide M, Francis DM, Grattan CE, Hakimi J, Kochan JP, Greaves MW. Autoantibodies against the high-affinity IgE receptor as a cause of histamine release in chronic urticaria. *N Engl J Med* 1993;328:1599–1504.
- [5] Sabroe RA, Greaves MW. Chronic idiopathic urticaria with functional autoantibodies: 12 years on. *Br J Dermatol* 2006;154:813–9.
- [6] Greaves MW, Tan KT. Chronic urticaria: recent advances. *Clin Rev Allergy Immunol* 2007;33:134–43.
- [7] MacDonald SM, Rafnar T, Langdon J, Lichtenstein LM. Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor. *Science* 1995;269:688–90.
- [8] Claveau J, Lavoie A, Brunet C, Bédard PM, Hébert J. Chronic idiopathic urticaria: possible contribution of histamine-releasing factor to pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 1993;92:132–7.
- [9] O'Shea JJ, Ma A, Lipsky P. Cytokines and autoimmunity. *Nat Rev* 2001;2:37–45.
- [10] Szodoray P, Alex P, Brun JG, Centola M, Jonsson R. Circulating cytokines in primary Sjögren's syndrome determined by a multiplex cytokine array system. *Scand J Immunol* 2004;59:592–9.
- [11] Caproni M, Giomi B, Volpi W, Melani L, Schincaglia E, Macchia D. Chronic idiopathic urticaria: infiltrating cells and related cytokines in autologous serum-induced wheals. *Clin Immunol* 2005;114:284–92.
- [12] Ying S, Meng Q, Kay AB, Robinson DS. Elevated expression of interleukin-9 mRNA in the bronchial mucosa of atopic asthmatics and allergen-induced cutaneous late-phase reaction: relationships to eosinophils, mast cells and T lymphocytes. *Clin Exp Allergy* 2002;32:866–71.
- [13] Ferrer M, Luquin E, Sanchez-Ibarrola A, Moreno C, Sanz ML, Kaplan AP. Secretion of cytokines, histamine and leukotrienes in chronic urticaria. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;129:254–60.
- [14] Caproni M, Cardinali C, Giomi B, Antiga E, D'Agata A, Walter S, et al. Serological detection of eotaxin, IL-4, IL-13, IFN-gamma, MIP-1alpha, TARC and IP-10 in chronic autoimmune urticaria and chronic idiopathic urticaria. *J Dermatol Sci* 2004;36:57–9.
- [15] Tedeschi A, Lorini M, Suli C, Asero R. Serum interleukin-18 in patients with chronic ordinary urticaria: association with disease activity. *Clin Exp Dermatol* 2007;32:568–70.
- [16] Confino-Cohen R, Goldberg A, Aharoni D, Naiman L, Buchs A, Weiss M, et al. Low stimulated IL-4 secretion in PBMC from patients with chronic idiopathic urticaria. *Cytokine* 2004;27:74–80.
- [17] Piconi S, Trabattini D, Iemoli E, Fusi ML, Villa ML, Milazzo F, et al. Immune profiles of patients with chronic idiopathic urticaria. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;128:59–66.
- [18] Miossec P. Interleukin-17 in rheumatoid arthritis: if T cells were to contribute to inflammation and destruction through synergy. *Arthritis Rheum* 2003;48:594–601.
- [19] Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* 2007;148:32–46.
- [20] Yao Z, Painter SL, Fanslow WC, Ulrich D, Macduff BM, Spriggs MK, et al. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J Immunol* 1995;155:5483–6.
- [21] Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005;6:1133–41.
- [22] Lourenço FD, Azor MH, Santos JC, Prearo E, Maruta CW, Rivitti EA, et al. Activated status of basophils in chronic urticaria leads to IL-3-hyperresponsiveness and enhancement of histamine release induced by anti-IgE stimulus. *Br J Dermatol* 2008;158:979–86.
- [23] Boeuf P, Vigan-Womas I, Jublot D, Loizon S, Barale JC, Akanmori BD, et al. CyProQuant-PCR: a real time RT-PCR technique for profiling human cytokines, based on external RNA standards, readily automatable for clinical use. *BMC Immunol* 2005;6:5.
- [24] Kvamström M, Jenmalm MC, Ekerfelt C. Effect of cryopreservation on expression of Th1 and Th2 cytokines in blood mononuclear cells from patients with different cytokine profiles, analysed with three common assays: an overall decrease of interleukin-4. *Cryobiology* 2004;49:157–68.

- [25] Gambichler T, Skrygan M, Hyun J, Bechara F, Tomi NS, Altmeyer P, et al. Cytokine mRNA expression in basal cell carcinoma. *Arch Dermatol Res* 2006;298:139–41.
- [26] Tedeschi A, Lorini M, Suli C, Asero R. No evidence of tumor necrosis factor- $\alpha$  release in blood of patients with chronic urticaria. *Allergy* 2006;61:510–1.
- [27] Confino-Cohen R, Aharoni D, Goldberg A, Gurevitch I, Buchs A, Weiss M, et al. Evidence for aberrant regulation of the p21Ras pathway in PBMCs of patients with chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:349–56.
- [28] Izquierdo Pastor M, Reif K, Cantrell D. The regulation and function of p21ras during T-cell activation and growth. *Immunol Today* 1995;16:159–64.
- [29] Asero R, Tedeschi A, Riboldi P, Cugno M. Plasma of patients with chronic urticaria shows signs of thrombin generation, and its intradermal injection causes wheal-and-flare reactions much more frequently than autologous serum. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:1113–7.
- [30] Cassatella MA, Gasperini S, Bovolenta C, Calzetti F, Vollebregt M, Scapini P, et al. Interleukin-10 (IL-10) selectively enhances C153/SOCS3 mRNA expression in human neutrophils: evidence for an IL-10-induced pathway that is independent of STAT protein activation. *Blood* 1999;94:2880–9.
- [31] Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993;11:165–90.
- [32] Buelens C, Willems F, Delvaux A, Piérard G, Delville JP, Velu T, et al. Interleukin-10 differentially regulates B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression on human peripheral blood dendritic cells. *Eur J Immunol* 1995;25:2668–72.
- [33] Thompson-Snipes L, Dhar V, Bond MW, Mosmann TR, Moore KW, Rennick DM. Interleukin 10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. *J Exp Med* 1991;173:507–10.
- [34] Beebe AM, Cua DJ, de Waal Malefyt R. The role of interleukin-10 in autoimmune disease: systemic lupus erythematosus (SLE) and multiple sclerosis (MS). *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13:403–12.
- [35] Forsberg G, Hemell O, Hammarström S, Hammarström ML. Concomitant increase of IL-10 and pro-inflammatory cytokines in intraepithelial lymphocyte subsets in celiac disease. *Int Immunol* 2007;19:993–1001.
- [36] Komiya Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2006;177:566–73.
- [37] Zanin-Zhorov A, Cahalon L, Tal G, Margalit R, Lider O, Cohen IR. Heat shock protein 60 enhances CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. *J Clin Invest* 2006;116:2022–32.
- [38] van Beelen AJ, Teunissen MBM, Kapsenberg ML, Jong EC. Interleukin-17 in inflammatory skin disorders. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007;7:374–81.

## **9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



1. Sabroe RA, Grattan CE, Francis DM, Barr RM, Kobza Black A, Greaves MW. The autologous serum skin test: a screening test for autoantibodies in chronic idiopathic urticaria. *Br J Dermatol*. 1999;140(3):446-52.
2. Kanwar AJ, Greaves MW. Approach to the patient with chronic urticaria. *Hosp Pract (Minneap)*. 1996;31(3):175-9,83-4,87-9.
3. Ring J, Brockow K, Ollert M, Engst R. Antihistamines in urticaria. *Clin Exp Allergy*. 1999;29 Suppl 1:31-7.
4. Vonakis BM, Saini SS. New concepts in chronic urticaria. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(6):709-16.
5. Hein R. Chronic urticaria: impact of allergic inflammation. *Allergy*. 2002;57 Suppl 75:19-24.
6. Fiebiger E, Hammerschmid F, Stingl G, Maurer D. Anti-FcepsilonRIalpha autoantibodies in autoimmune-mediated disorders. Identification of a structure-function relationship. *J Clin Invest*. 1998;101(1):243-51.
7. Kaplan AP, Greaves M. Pathogenesis of chronic urticaria. *Clin Exp Allergy*. 2009;39(6):777-87.
8. Niimi N, Francis DM, Kermani F, O'Donnell BF, Hide M, Kobza-Black A, et al. Dermal mast cell activation by autoantibodies against the high affinity IgE receptor in chronic urticaria. *J Invest Dermatol*. 1996;106(5):1001-6.
9. Dreskin SC, Andrews KY. The thyroid and urticaria. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2005;5(5):408-12.
10. Doutre MS. Chronic urticaria and thyroid auto-immunity. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2006;30(1):31-7.
11. O'Donnell BF, Francis DM, Swana GT, Seed PT, Kobza Black A, Greaves MW. Thyroid autoimmunity in chronic urticaria. *Br J Dermatol*. 2005;153(2):331-5.
12. Jirapongsananuruk O, Pongpreuksa S, Sangacharoenkit P, Visitsunthorn N, Vichyanond P. Identification of the etiologies of chronic urticaria in children: A prospective study of 94 patients. *Pediatr Allergy Immunol*. 2009.
13. Saini SS. Basophil responsiveness in chronic urticaria. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2009;9(4):286-90.
14. Eckman JA, Hamilton RG, Gober LM, Sterba PM, Saini SS. Basophil phenotypes in chronic idiopathic urticaria in relation to disease activity and autoantibodies. *J Invest Dermatol*. 2008;128(8):1956-63.
15. Grattan CE, Dawn G, Gibbs S, Francis DM. Blood basophil numbers in chronic ordinary urticaria and healthy controls: diurnal variation, influence of loratadine and prednisolone and relationship to disease activity. *Clin Exp Allergy*. 2003;33(3):337-41.
16. Caproni M, Giomi B, Volpi W, Melani L, Schincaglia E, Macchia D, et al. Chronic idiopathic urticaria: infiltrating cells and related cytokines in autologous serum-induced wheals. *Clin Immunol*. 2005;114(3):284-92.
17. Lourenço FD, Azor MH, Santos JC, Prearo E, Maruta CW, Rivitti EA, et al. Activated status of basophils in chronic urticaria leads to interleukin-3 hyper-responsiveness and enhancement of histamine release induced by anti-IgE stimulus. *Br J Dermatol*. 2008;158(5):979-86.
18. MacGlashan DW, Jr. Relationship between spleen tyrosine kinase and phosphatidylinositol 5' phosphatase expression and secretion from human basophils in the general population. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119(3):626-33.

19. Vonakis BM, Vasagar K, Gibbons SP, Jr., Gober L, Sterba PM, Chang H, et al. Basophil FcεRI histamine release parallels expression of Src-homology 2-containing inositol phosphatases in chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;119(2):441-8.
20. Asero R, Tedeschi A, Riboldi P, Cugno M. Plasma of patients with chronic urticaria shows signs of thrombin generation, and its intradermal injection causes wheal-and-flare reactions much more frequently than autologous serum. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117(5):1113-7.
21. Takahagi S, Mihara S, Iwamoto K, Morioka S, Okabe T, Kameyoshi Y, et al. Coagulation/fibrinolysis and inflammation markers are associated with disease activity in patients with chronic urticaria. *Allergy.* 2009.
22. Cheng X, Chen Y, Xie JJ, Yao R, Yu X, Liao MY, et al. Suppressive oligodeoxynucleotides inhibit atherosclerosis in ApoE(-/-) mice through modulation of Th1/Th2 balance. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;45(2):168-75.
23. Pappu BP, Angkasekwinai P, Dong C. Regulatory mechanisms of helper T cell differentiation: new lessons learned from interleukin 17 family cytokines. *Pharmacol Ther.* 2008;117(3):374-84.
24. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORγ. *Nat Immunol.* 2008;9(6):641-9.
25. van Beelen AJ, Teunissen MB, Kapsenberg ML, de Jong EC. Interleukin-17 in inflammatory skin disorders. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2007;7(5):374-81.
26. Doreau A, Belot A, Bastid J, Riche B, Trescol-Biemont MC, Ranchin B, et al. Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nat Immunol.* 2009;10(7):778-85.
27. Bressler RB. Pathophysiology of chronic urticaria. *Immunology and Allergy Clinics of North America*. 1995;15(4):659-77.
28. Caproni M, Volpi W, Macchia D, Giomi B, Manfredi M, Campi P, et al. Infiltrating cells and related cytokines in lesional skin of patients with chronic idiopathic urticaria and positive autologous serum skin test. *Exp Dermatol.* 2003;12(5):621-8.
29. Hermes B, Prochazka AK, Haas N, Jurgovsky K, Sticherling M, Henz BM. Upregulation of TNF-alpha and IL-3 expression in lesional and uninvolved skin in different types of urticaria. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;103(2 Pt 1):307-14.
30. Caproni M, Cardinali C, Giomi B, Antiga E, D'Agata A, Walter S, et al. Serological detection of eotaxin, IL-4, IL-13, IFN-gamma, MIP-1alpha, TARC and IP-10 in chronic autoimmune urticaria and chronic idiopathic urticaria. *J Dermatol Sci.* 2004;36(1):57-9.
31. Tedeschi A, Lorini M, Suli C, Asero R. Serum interleukin-18 in patients with chronic ordinary urticaria: association with disease activity. *Clin Exp Dermatol.* 2007;32(5):568-70.
32. Ferrer M, Luquin E, Sanchez-Ibarrola A, Moreno C, Sanz ML, Kaplan AP. Secretion of cytokines, histamine and leukotrienes in chronic urticaria. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002;129(3):254-60.

33. Confino-Cohen R, Goldberg A, Aharoni D, Naiman L, Buchs A, Weiss M, et al. Low stimulated IL-4 secretion in PBMC from patients with chronic idiopathic urticaria. *Cytokine*. 2004;27(2-3):74-80.
34. Piconi S, Trabattoni D, Iemoli E, Fusi ML, Villa ML, Milazzo F, et al. Immune profiles of patients with chronic idiopathic urticaria. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002;128(1):59-66.
35. Dos Santos JC, Azor MH, Nojima VY, Lourenco FD, Prearo E, Maruta CW, et al. Increased circulating pro-inflammatory cytokines and imbalanced regulatory T-cell cytokines production in chronic idiopathic urticaria. *Int Immunopharmacol*. 2008;8(10):1433-40.
36. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res*. 2009;29(6):313-26.
37. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 2000;12(2):121-7.
38. Mueller SN, Hosiawa-Meagher KA, Konieczny BT, Sullivan BM, Bachmann MF, Locksley RM, et al. Regulation of homeostatic chemokine expression and cell trafficking during immune responses. *Science*. 2007;317(5838):670-4.
39. Wagner W, Roderburg C, Wein F, Diehlmann A, Frankhauser M, Schubert R, et al. Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors. *Stem Cells*. 2007;25(10):2638-47.
40. Premack BA, Schall TJ. Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection. *Nat Med*. 1996;2(11):1174-8.
41. Borish LC, Steinke JW. 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(2 Suppl):S460-75.
42. Bacon K, Baggiolini M, Broxmeyer H, Horuk R, Lindley I, Mantovani A, et al. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J Interferon Cytokine Res*. 2002;22(10):1067-8.
43. Kameyoshi Y, Dorschner A, Mallet AI, Christophers E, Schroder JM. Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. *J Exp Med*. 1992;176(2):587-92.
44. Rot A, Krieger M, Brunner T, Bischoff SC, Schall TJ, Dahinden CA. RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes. *J Exp Med*. 1992;176(6):1489-95.
45. Schall TJ, Bacon K, Toy KJ, Goeddel DV. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature*. 1990;347(6294):669-71.
46. Alam R, Stafford S, Forsythe P, Harrison R, Faubion D, Lett-Brown MA, et al. RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils. *J Immunol*. 1993;150(8 Pt 1):3442-8.
47. Bacon KB, Premack BA, Gardner P, Schall TJ. Activation of dual T cell signaling pathways by the chemokine RANTES. *Science*. 1995;269(5231):1727-30.
48. Kuna P, Reddigari SR, Rucinski D, Oppenheim JJ, Kaplan AP. Monocyte chemotactic and activating factor is a potent histamine-releasing factor for human basophils. *J Exp Med*. 1992;175(2):489-93.

49. Apostolopoulos J, Davenport P, Tipping PG. Interleukin-8 production by macrophages from atheromatous plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16(8):1007-12.
50. Berger SP, Seelen MA, Hiemstra PS, Gerritsma JS, Heemskerk E, van der Woude FJ, et al. Proteinase 3, the major autoantigen of Wegener's granulomatosis, enhances IL-8 production by endothelial cells in vitro. *J Am Soc Nephrol.* 1996;7(5):694-701.
51. Lonnemann G, Engler-Blum G, Muller GA, Koch KM, Dinarello CA. Cytokines in human renal interstitial fibrosis. II. Intrinsic interleukin (IL)-1 synthesis and IL-1-dependent production of IL-6 and IL-8 by cultured kidney fibroblasts. *Kidney Int.* 1995;47(3):845-54.
52. Teranishi Y, Mizutani H, Murata M, Shimizu M, Matsushima K. Increased spontaneous production of IL-8 in peripheral blood monocytes from the psoriatic patient: relation to focal infection and response to treatments. *J Dermatol Sci.* 1995;10(1):8-15.
53. Hammond ME, Lapointe GR, Feucht PH, Hilt S, Gallegos CA, Gordon CA, et al. IL-8 induces neutrophil chemotaxis predominantly via type I IL-8 receptors. *J Immunol.* 1995;155(3):1428-33.
54. Angiolillo AL, Sgadari C, Taub DD, Liao F, Farber JM, Maheshwari S, et al. Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med.* 1995;182(1):155-62.
55. Melchjorsen J, Sorensen LN, Paludan SR. Expression and function of chemokines during viral infections: from molecular mechanisms to in vivo function. *J Leukoc Biol.* 2003;74(3):331-43.
56. Christopherson K, 2nd, Hromas R. Chemokine regulation of normal and pathologic immune responses. *Stem Cells.* 2001;19(5):388-96.
57. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(6):429-42.
58. Strieter RM, Gomperts BN, Keane MP. The role of CXC chemokines in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest.* 2007;117(3):549-56.
59. Hosaka S, Akahoshi T, Wada C, Kondo H. Expression of the chemokine superfamily in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol.* 1994;97(3):451-7.
60. Liu C, Papewalis C, Domberg J, Scherbaum WA, Schott M. Chemokines and autoimmune thyroid diseases. *Horm Metab Res.* 2008;40(6):361-8.
61. Garcia-Lopez MA, Sancho D, Sanchez-Madrid F, Marazuela M. Thyrocytes from autoimmune thyroid disorders produce the chemokines IP-10 and Mig and attract CXCR3+ lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(10):5008-16.
62. Romagnani P, Rotondi M, Lazzeri E, Lasagni L, Francalanci M, Buonamano A, et al. Expression of IP-10/CXCL10 and MIG/CXCL9 in the thyroid and increased levels of IP-10/CXCL10 in the serum of patients with recent-onset Graves' disease. *Am J Pathol.* 2002;161(1):195-206.
63. Zhao Q. Dual targeting of CCR2 and CCR5: therapeutic potential for immunologic and cardiovascular diseases. *J Leukoc Biol.* 2010.
64. Wu L, Paxton WA, Kassam N, Ruffing N, Rottman JB, Sullivan N, et al. CCR5 levels and expression pattern correlate with infectability by macrophage-tropic HIV-1, invitro. *J Exp Med.* 1997;185(9):1681-91.



65. Tedeschi A, Lorini M, Suli C, Asero R. No evidence of tumor necrosis factor-alpha release in blood of patients with chronic urticaria. *Allergy*. 2006;61(4):510-1.
66. Young SH, Antonini JM, Roberts JR, Erdely AD, Zeidler-Erdely PC. Performance evaluation of cytometric bead assays for the measurement of lung cytokines in two rodent models. *J Immunol Methods*. 2008;331(1-2):59-68.
67. Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2006;177(1):566-73.
68. Lowes MA, Kikuchi T, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Zaba LC, Haider AS, et al. Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *J Invest Dermatol*. 2008;128(5):1207-11.
69. Koga C, Kabashima K, Shiraishi N, Kobayashi M, Tokura Y. Possible pathogenic role of Th17 cells for atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2008;128(11):2625-30.
70. Matusevicius D, Kivisakk P, He B, Kostulas N, Ozenci V, Fredrikson S, et al. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 1999;5(2):101-4.
71. Kurasawa K, Hirose K, Sano H, Endo H, Shinkai H, Nawata Y, et al. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2000;43(11):2455-63.
72. Toosi S, Bystryn JC. Potential role of interleukin-17 in the pathogenesis of bullous pemphigoid. *Med Hypotheses*. 2009.
73. Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol*. 2007;148(1):32-46.
74. Albanesi C, Cavani A, Girolomoni G. IL-17 is produced by nickel-specific T lymphocytes and regulates ICAM-1 expression and chemokine production in human keratinocytes: synergistic or antagonist effects with IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol*. 1999;162(1):494-502.
75. Teunissen MB, Koomen CW, de Waal Malefyt R, Wierenga EA, Bos JD. Interleukin-17 and interferon-gamma synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 1998;111(4):645-9.
76. Confino-Cohen R, Aharoni D, Goldberg A, Gurevitch I, Buchs A, Weiss M, et al. Evidence for aberrant regulation of the p21Ras pathway in PBMCs of patients with chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;109(2):349-56.
77. Luther SA, Cyster JG. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol*. 2001;2(2):102-7.
78. Fujii H, Shimada Y, Hasegawa M, Takehara K, Sato S. Serum levels of a Th1 chemoattractant IP-10 and Th2 chemoattractants, TARC and MDC, are elevated in patients with systemic sclerosis. *J Dermatol Sci*. 2004;35(1):43-51.
79. Bauer JW, Baechler EC, Petri M, Batliwalla FM, Crawford D, Ortmann WA, et al. Elevated serum levels of interferon-regulated chemokines are biomarkers for active human systemic lupus erythematosus. *PLoS Med*. 2006;3(12):e491.
80. Yao TC, Kuo ML, See LC, Ou LS, Lee WI, Chan CK, et al. RANTES and monocyte chemoattractant protein 1 as sensitive markers of disease activity in

- patients with juvenile rheumatoid arthritis: a six-year longitudinal study. *Arthritis Rheum.* 2006;54(8):2585-93.
81. 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.
  82. Bachert C, Gevaert P, van Cauwenberge P. Staphylococcus aureus enterotoxins: a key in airway disease? *Allergy.* 2002;57(6):480-7.
  83. 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. *Clin Exp Allergy.* 2005;35(2):221-5.
  84. Tedeschi A, Asero R, Lorini M, Marzano AV, Cugno M. Plasma levels of matrix metalloproteinase-9 in chronic urticaria patients correlate with disease severity and C-reactive protein but not with circulating histamine-releasing factors. *Clin Exp Allergy.* 2010.
  85. Bischoff SC, Krieger M, Brunner T, Dahinden CA. Monocyte chemoattractant protein 1 is a potent activator of human basophils. *J Exp Med.* 1992;175(5):1271-5.
  86. Smyth MJ, Zachariae CO, Norihisa Y, Ortaldo JR, Hishinuma A, Matsushima K. IL-8 gene expression and production in human peripheral blood lymphocyte subsets. *J Immunol.* 1991;146(11):3815-23.