LUCIANA DE PAULA SAMORANO LIMA

**Avaliação do efeito do metotrexato nas manifestações
clínicas e no perfil da expressão cutânea de citocinas e
quimiocinas envolvidas na resposta inflamatória da
dermatite atópica do adulto**

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

Programa de Dermatologia

Orientadora: Profa. Dra. Valeria Aoki

**(Versão Corrigida Conforme Resolução CoPGr6018/11, de 1 de novembro de
2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)**

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Lima, Luciana de Paula Samorano
Avaliação do efeito do metotrexato nas
manifestações clínicas e no perfil da expressão
cutânea de citocinas e quimiocinas envolvidas na
resposta inflamatória da dermatite atópica do adulto
/ Luciana de Paula Samorano Lima. -- São Paulo,
2021.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.
Orientadora: Valeria Aoki.

Descritores: 1.Dermatite atópica 2.Prurido
3.Inflamação 4.Metotrexato 5.Interleucinas
6.Quimiocinas 7.Interleucina-31 8.Subunidade alfa
do receptor de IL-31 9.Adulto

USP/FM/DBD-142/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Ao meu querido e amado esposo, pelo incentivo, parceria, auxílio nos meus projetos e amor durante todos estes anos.

À minha querida e amada filha, por ser uma nova luz na minha vida e por me inspirar e incentivar a ser uma pessoa melhor a cada dia.

Aos meus queridos e amados pais, grandes responsáveis pela minha formação moral e profissional, pelo apoio, ensinamentos, exemplo e amor incondicional durante toda a minha vida.

Aos meus queridos e amados irmão, avós, familiares e amigos, pelo incentivo e amor.

A Deus, por me dar forças e me guiar nesta caminhada da vida.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Valéria Aoki, minha querida orientadora, professora e mentora, pelo incentivo, dedicação, paciência, amizade e, principalmente, por seu exemplo como médica, pesquisadora e pessoa.

Ao Prof. Dr. Cyro Festa Neto e ao Prof. Dr. José Antônio Sanches Junior, pelo apoio, suporte e incentivo durante toda a minha formação dermatológica e durante todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva, o querido Burns, pela inspiração desde os tempos da Faculdade de Medicina da USP, e por toda a ajuda, paciência e colaboração para a execução deste trabalho.

À Profa. Dra. Maria Notomi Sato, pela inspiração, incentivo e orientações durante todo o projeto.

À Kelly Manfrere e à Naiura Vieira Pereira, do LIM56 (Laboratório de Investigação em Dermatologia e Imunodeficiências), por sua dedicação, atenção, paciência e valiosa ajuda neste trabalho.

Às Dras. Mariana Colombini Zaniboni, Raquel Leão Orfali e, em especial, ao Dr. Roberto Takaoka, colegas do ambulatório de Dermatite Atópica, por todo o apoio, incentivo, amizade e exemplo de dedicação aos pacientes com dermatite atópica.

À Profa. Dra. Zilda Najjar Prado de Oliveira, Dra. Maria Cecília da Matta Rivitti Machado, Dra. Anita Rotter e ao Prof. Dr. Vitor Manoel Silva dos Reis, por todo o apoio, amizade, parceria e convivência nos ambulatórios de Dermatologia Pediátrica e Alergia do HC-FMUSP.

Às Profas. Dras. Neusa Yuriko Sakai Valente e Mirian Nakagami Sotto, pelo incentivo e ajuda na execução deste projeto e pelos ensinamentos e amizade durante toda a minha formação dermatológica e durante todos estes anos.

Aos queridos professores da minha banca de qualificação, Profa Dra. Zilda Najjar Prado de Oliveira, Profa. Dra. Neusa Yuriko Sakai Valente, Prof. Dr. Vitor Manoel Silva dos Reis, pela amizade e pelas sugestões valiosas para o aprimoramento deste trabalho.

Aos queridos Caroline Gracia Plena Sol Colacique, Daiana Pess, Gustavo Alcoforado Franco Lima, Juliana Olivieri Gordilho, Klicia Novais Quental, Larissa Karine Leite Portocarrero, Marcella Soares Pincelli, Marina Lino Vieira, Mauricio Menezes Aben-Athar Ivo, Paulo Vitor Fiani e Pedro Iezzi Forli, pela enorme colaboração com este trabalho e pelo carinho.

Às queridas Dra. Claudia Giuli Santi, Dra. Denise Miyamoto e Dra. Paula Ferreira, pela amizade especial e incentivo. Aos queridos Dr. João Avancini e Ligia Maria Ichimura Fukumori, agradeço também pelo apoio e amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Dermatopatologia do Departamento de Dermatologia do HC-FMUSP - Flavia Cristaldi, Jacqueline Meneghim, Maria Cristina Galhardo – pela colaboração na execução do estudo.

À Sandra Maria da Silva, Laura da Conceição Reis e Rosa Makie Ishii, da equipe de enfermagem da Dermatologia do HC-FMUSP, por toda a ajuda para a execução das biópsias cutâneas.

Ao Amadeu Ferreira e à Rosangela Evangelista de Sousa, funcionários do setor administrativo, por me auxiliaram durante todo o projeto, em especial na convocação dos pacientes, com muita paciência e carinho.

Ao Alexandre Vargas, fotógrafo do Departamento de Dermatologia do HC-FMUSP, por realizar as fotografias dos pacientes e, posteriormente, auxiliar-me na montagem de algumas figuras.

Ao Alessandro Mendonça Mazzoni, Henry Dan Kyomoto e à Kelly Manfrere, por todo o suporte e atenção com a análise estatística dos resultados.

Aos funcionários Marcelo Alves, Rute Eugenio Meneses, Rodrigo Nakagawa e Maria Auxiliadora Araujo de Sousa, pela eficiência em me auxiliarem, sobretudo, com os processos relacionados à pós-graduação.

Aos queridos professores, médicos assistentes, colaboradores, preceptores, residentes, alunos e funcionários do Departamento de Dermatologia do HC-FMUSP, pela parceria e aprendizado durante todos estes anos na dermatologia.

A todos do LIM-56 que, direta ou indiretamente, colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho.

À Faculdade de Medicina da USP e aos amigos e professores com quem tive o privilégio de conviver e aprender durante minha formação como médica.

A todos os professores que, ao longo da minha vida, inspiraram-me e me incentivaram a buscar conhecimento.

Aos pacientes e seus familiares, pela confiança e colaboração. Acompanhá-los durante todos estes anos e observar sua melhora, tanto das lesões de pele quanto da sua qualidade de vida, são motivos de grande satisfação e incentivo nesta caminhada da medicina e da dermatologia.

Aos professores doutores da banca examinadora, pela participação fundamental na conclusão deste trabalho e desta etapa importantes em minha vida.

À FUNDERSP, Fundo de Apoio à Dermatologia de São Paulo – Sebastião Sampaio e Sociedade Brasileira de Dermatologia – Regional do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro e por tornar possível a concretização desta pesquisa.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas,
mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra
alma humana.”

Carl Jung.

Normatização

Essa tese está de acordo com as seguintes normas em vigor no momento dessa publicação:

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

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Fredd, Maria F. Crestana, Marinalva de Sousa Araújo, Suely Campos Cardoso, Valeria Vilhena. 3a Ed. São Paulo. Divisão de Biblioteca e Documentação, 2011.

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

Sumário

Lista de abreviaturas.....	xiii
Lista de símbolos	xvi
Lista de figuras.....	xvii
Lista de quadros.....	xxiii
Lista de tabelas	xxiv
Resumo.....	xxv
Abstract.....	xxvii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Dermatite atópica e fisiopatogenia.....	3
1.1.1 Fatores genéticos	4
1.1.2 Alterações da barreira cutânea e da imunidade inata	5
1.1.3 Alterações da imunidade adaptativa.....	6
1.1.4 Alterações das células dendríticas e células T reguladoras	9
1.1.5 Alterações do microbioma cutâneo.....	10
1.2 Dermatite atópica e prurido.....	11
1.3 Dermatite atópica e tratamento.....	14
1.4 Dermatite atópica e metotrexato	15
1.4.1 Estudos sobre o uso do metotrexato na dermatite atópica.....	18
1.4.2 Estudos comparando o uso do metotrexato e da azatioprina na dermatite atópica.....	21
1.4.3 Estudos comparando o uso do metotrexato e da ciclosporina na dermatite atópica.....	22
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivos gerais	28
2.2 Objetivos específicos	28
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	30
3.1 Seleção de indivíduos.....	31
3.1.1 Critérios de inclusão de doentes com dermatite atópica	31
3.1.2 Critérios de exclusão de doentes	32

3.2 Desenho do estudo	32
3.3 Regime de administração do metotrexato	33
3.4 Avaliação dos escores de gravidade	34
3.5 Avaliação do prurido	34
3.6 Fotografias do quadro clínico dos pacientes com dermatite atópica..	34
3.7 Cronograma de visitas dos pacientes	34
3.8 Dosagem sérica de IgE.....	35
3.9 Cronograma e obtenção dos fragmentos de pele	36
3.10 Reação imunoistoquímica.....	36
3.10.1 Análise das lâminas.....	38
3.11 Expressão de RNAm de citocinas por <i>Real Time</i> -PCR	39
3.12 Fluxograma das análises laboratoriais do estudo	41
3.13 Análise e correlação dos parâmetros.....	41
4 RESULTADOS.....	43
4.1 Características demográficas dos pacientes e dos controlos não-atópicos	44
4.2 Avaliação dos pacientes com dermatite atópica	45
4.3 Complicações apresentadas pelos doentes com dermatite atópica durante o tratamento com metotrexato.....	48
4.4 Escores de gravidade nos pacientes com dermatite atópica	49
4.4.1 EASI	49
4.4.2 SCORAD	50
4.5 Avaliação do prurido nos pacientes com dermatite atópica	51
4.6 Apresentação fotográfica do quadro clínico dos pacientes com dermatite atópica.....	52
4.7 Avaliação da IgE sérica nos pacientes com dermatite atópica	55
4.8 Análise da espessura epidérmica	56
4.8.1 Comparação entre a pele com lesão do paciente com dermatite atópica pré-tratamento com metotrexato e a pele controle não-atópica.....	56
4.8.2 Comparação entre a pele sem lesão do paciente com dermatite atópica pré-tratamento com metotrexato e a pele com lesão do paciente com dermatite atópica pré-tratamento com metotrexato	57

4.8.3	Comparação entre a pele sem lesão do paciente com dermatite atópica pós-tratamento com metotrexato e a pele com lesão do paciente com dermatite atópica pós-tratamento com metotrexato	58
4.8.4	Comparação entre a pele com lesão do paciente com dermatite atópica pré-tratamento com metotrexato e a pele com lesão do paciente com dermatite atópica pós-tratamento com metotrexato	59
4.9	Análise pela técnica de imunoistoquímica	60
4.9.1	Pele com lesão do paciente com dermatite atópica pré-tratamento com metotrexato e pele controle não-atópica	60
4.9.1.1	Avaliação de IL-31	61
4.9.1.2	Avaliação de IL-31RA	62
4.9.1.3	Avaliação de OSMR.....	63
4.9.1.4	Avaliação de TSLP	64
4.9.1.5	Avaliação de Ki-67	65
4.9.2	Pele com lesão do paciente com dermatite atópica pré-tratamento com metotrexato e pele com lesão do paciente com dermatite atópica pós-tratamento com metotrexato	66
4.9.2.1	Avaliação de IL-31	67
4.9.2.2	Avaliação de IL-31RA	68
4.9.2.3	Avaliação de OSMR.....	69
4.9.2.4	Avaliação de TSLP	70
4.9.2.5	Avaliação de Ki-67	71
4.9.3	Outras comparações realizadas pela técnica de imunoistoquímica	72
4.10	Análise pela técnica de <i>Real Time</i> -PCR	76
4.10.1	Pele com lesão pré-tratamento com metotrexato e pele controle não-atópica	76
4.10.2	Pele com lesão pré-tratamento com metotrexato e pele com lesão pós-tratamento com metotrexato	78
4.10.3	Outras comparações pela técnica de <i>Real Time</i> -PCR.....	80
5	DISCUSSÃO	83
6	CONCLUSÕES	90
7	REFERÊNCIAS.....	93
8	ANEXOS	118
	Anexo 1: Carta de aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq do HC-FMUSP.....	119

Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	120
Anexo 3: Escore de gravidade EASI (<i>Eczema Area and Severity Index</i>).....	125
Anexo 4: Escore de gravidade SCORAD (<i>SCOring Atopic Dermatitis</i>)..	126
Anexo 5: Tabela 2.....	127
Anexo 6: Tabela 3.....	128
Anexo 7: Tabela 4.....	129
Anexo 8: Tabela 5.....	130
Anexo 9: Tabela 6.....	131
Anexo 10: Tabela 7	132
9 APÊNDICES	133
Apêndice 1: Publicação: Samorano LP, Takaoka R, Zaniboni MC, Aoki V. Methotrexate for atopic dermatites in adults: a prospective study from a reference center in Brazil. J Dtsch Dermatol Ges. 2021 Feb;19(2):294-296	134

Listas

Abreviaturas

AICAR:	5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo
AKT/PI3K:	<i>Protein kinase B / phosphoinositide 3-kinase</i>
AMPs:	Peptídeos antimicrobianos
APC:	Célula apresentadora de antígeno
AT:	Área total do tecido
BC:	Barreira cutânea
CCR:	<i>Chemokine receptor</i>
CD:	<i>Cluster differentiation</i>
CDLQI:	<i>Children's Dermatology Life Quality Index</i>
CTACK:	<i>Cutaneous T cell-attracting chemokine</i>
Cya:	Ciclosporina
DA:	Dermatite atópica
DC:	Célula dendrítica
DHFR:	Dihidrofolato redutase
DIQ:	Diferença interquartil
DLQI:	<i>Dermatology Life Quality Index</i>
DP:	Desvio padrão
EASI:	<i>Eczema Area and Severity Index</i>
EC:	Estrato córneo
GWAS:	<i>Genome-wide association study</i>
HC-FMUSP:	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HIV:	Vírus da imunodeficiência humana
HSV:	Vírus do herpes simples
IC:	Intervalo de confiança
IDEC:	Células dendríticas epidérmicas inflamatórias

IFN- γ :	Interferon gama
IGA:	<i>Investigator Global Assessment</i>
IgE:	Imunoglobulina da classe E
IL:	Interleucina
IL-31 RA:	Subunidade do receptor alfa de IL-31
IOD:	<i>Integrated optic density</i>
ISSAC:	<i>International Study of Asthma and Allergies in Children</i>
JAK-STAT:	<i>Janus kinase / signal transducer and activator transcription</i>
MAPK:	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MB:	Membrana basal da epiderme
mDC:	Célula dendrítica mieloide
MDC:	<i>Macrophage-derived chemokine</i>
mRNA:	RNA mensageiro
MTX:	Metotrexato
NF- κ B:	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NGF:	Fator de crescimento neural
NK:	<i>Natural killer</i>
NOD:	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein</i>
OSMR:	Receptor oncostatina M
PBMC:	Células mononucleares do sangue periférico
PBS:	Solução salina tamponada
pDC:	Célula dendrítica plasmocitoide
pH:	Potencial hidrogeniônico
PPD:	<i>Purified protein derivative</i>
Real Time-PCR:	<i>Real-time polymerase chain reaction</i>
RNA:	<i>ribonucleic acid</i>
<i>S. aureus</i> :	<i>Staphylococcus aureus</i>
SASSAD:	<i>Six Area, Six Sign Atopic Dermatitis</i>
SCORAD:	<i>SCORing Atopic Dermatitis</i>
STAT:	<i>Signal transducer and activator transcription</i>

TARC:	<i>Thymus and activation-regulated chemokine</i>
TCLE:	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEWL:	<i>Transepidermal water loss</i>
TGO:	Transglutaminase glutâmica oxalacética
TGP:	Transaminase glutâmica pirúvica
Th:	Células T auxiliadoras
TJ:	<i>Tight junctions</i>
TLRs:	<i>Toll-like receptors</i>
TNF- α :	Fator de necrose tumoral alfa
Treg:	Célula T reguladora
TSLP:	Linfopoietina estromal tímica
VAS:	Visual Analogue Scale
VEGF:	<i>Vascular endotelial growth factor</i>
B-hCG:	Gonadotrofina coriônica humana beta

Símbolos

%	Por cento
<	Menor que
>	Maior que
=	Igual a
↓	Diminuição
↑	Aumento
°C	Graus Celsius
n	Tamanho da amostra
+	Positivo
-	Negativo
mL	Mililitro
mm	Milímetro
UI	Unidade internacional
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro

Figuras

Figura 1 -	Ilustração esquemática das principais alterações observadas na fisiopatogenia da dermatite atópica, com foco nas alterações imunológicas	11
Figura 2 -	Principais mecanismos de ação propostos para o metotrexato	16
Figura 3 -	Ilustração da escala analógica e visual de prurido, utilizada para avaliar o prurido dos pacientes com dermatite atópica ...	34
Figura 4 -	Fluxograma das análises laboratoriais do estudo	41
Figura 5 -	Padrões de lesão predominantes observados entre os pacientes com dermatite atópica incluídos no estudo. A. Padrão prurigoide, em que se observam lesões pápulo-nodulares e liquenificação intensa. B. Padrão eritrodérmico, em que há eritema e descamação em mais de 90% da superfície corpórea do paciente, de evolução crônica. C. Padrão numular, em que se observam, sobretudo, placas arredondadas com eritema, crostas e liquenificação	45
Figura 6 -	Evolução do escore EASI nos pacientes com dermatite atópica durante o tratamento com metotrexato, avaliado na semana inicial, semana 12 e semana 24. Houve redução significativa do EASI após 12 semanas e após 24 semanas de tratamento, em relação à semana inicial.....	49
Figura 7 -	Evolução do escore SCORAD nos pacientes com dermatite atópica durante o tratamento com metotrexato, avaliado na semana inicial, semana 12 e semana 24. Houve redução significativa do SCORAD após 12 semanas e após 24 semanas de tratamento, em relação à semana inicial	50
Figura 8 -	Evolução do prurido (VAS – <i>visual analogue scale</i>) nos pacientes com dermatite atópica durante o tratamento com metotrexato, avaliado na semana inicial, semana 12 e semana 24. Houve redução significativa do prurido após 12 semanas e após 24 semanas de tratamento, em relação à semana inicial	51

- Figura 9 -** Paciente do protocolo com dermatite atópica, com lesões de padrão numular e prurigoide. A. Fotos da semana inicial; EASI (*Eczema Area and Severity Index*) = 18,7 e SCORAD (*SCORing Atopic Dermatitis*) = 47,1. B. Fotos da semana 12 de tratamento com metotrexato; EASI = 7,2 e SCORAD = 32,6. C. Fotos da semana 24 de tratamento com metotrexato; EASI = 6,8 e SCORAD = 31,7..... 52
- Figura 10 -** Paciente do protocolo com dermatite atópica, com quadro de eritrodermia. A. Fotos da semana inicial; EASI (*Eczema Area and Severity Index*) = 32,4 e SCORAD (*SCORing Atopic Dermatitis*) = 56,2. B. Fotos da semana 12 de tratamento com metotrexato; EASI = 12,2 e SCORAD = 45,1. C. Fotos da semana 24 de tratamento com metotrexato; EASI = 14,3 e SCORAD = 40,9..... 53
- Figura 11 -** Paciente do protocolo com dermatite atópica, com lesões de padrão prurigoide. A. Fotos da semana inicial; EASI (*Eczema Area and Severity Index*) = 18,4 e SCORAD (*SCORing Atopic Dermatitis*) = 49,6. B. Fotos da semana 12 de tratamento com metotrexato; EASI = 9,8 e SCORAD = 34,3. C. Fotos da semana 24 de tratamento com metotrexato; EASI = 6,0 e SCORAD = 21,9..... 53
- Figura 12 -** Paciente do protocolo com dermatite atópica, com lesões de padrão numular. A. Fotos da semana inicial; EASI (*Eczema Area and Severity Index*) = 14,7 e SCORAD (*SCORing Atopic Dermatitis*) = 53,8. B. Fotos da semana 12 de tratamento com metotrexato; EASI = 11,4 e SCORAD = 38,5. C. Fotos da semana 24 de tratamento com metotrexato; EASI = 7,4 e SCORAD = 37,4..... 54
- Figura 13 -** Evolução da IgE sérica nos pacientes com dermatite atópica durante o tratamento com metotrexato, avaliada na semana inicial e semana 24. Houve redução significativa da IgE sérica após 24 semanas de tratamento..... 55
- Figura 14 -** Espessura epidérmica média (μm), comparando-se a pele dos controles não-atópicos com a pele com lesão dos pacientes com dermatite atópica (DA) pré-tratamento com metotrexato (MTX). A espessura epidérmica média foi significativamente menor no grupo controle..... 56
- Figura 15 -** Espessura epidérmica média (μm), comparando-se a pele dos pacientes com dermatite atópica (DA) sem lesão pré-tratamento com metotrexato (MTX) com a pele com lesão dos pacientes com dermatite atópica pré-tratamento. A espessura epidérmica média foi significativamente menor na pele sem lesão..... 57

- Figura 16 -** Espessura epidérmica média (μm), comparando-se a pele sem lesão do paciente com dermatite atópica (DA) pós-tratamento com metotrexato (MTX) e a pele com lesão do paciente com dermatite atópica pós-tratamento com metotrexato. A espessura epidérmica média foi significativamente menor na pele sem lesão 58
- Figura 17 -** Espessura epidérmica média (μm), comparando-se a pele com lesão do paciente com dermatite atópica (DA) pré-tratamento com metotrexato (MTX) e a pele com lesão do paciente com dermatite atópica pós-tratamento com metotrexato. A espessura epidérmica média foi significativamente menor na pele lesada pós-tratamento. 59
- Figura 18 -** Imunoistoquímica com marcação para IL-31 na pele com lesão de doente com dermatite atópica (DA) pré-tratamento com metotrexato (MTX), com foco na epiderme (A) e na derme superficial (B); e na pele controle, com foco na epiderme (C) e na derme superficial (D). Aumento de 200 x. Expressão da IL-31, comparando-se a pele com lesão de doente com DA pré-tratamento com MTX e a pele controle, não evidenciou alteração estatisticamente significativa na expressão do marcador na epiderme (E) e na derme superficial (F). 61
- Figura 19 -** Imunoistoquímica com marcação para IL-31RA na pele com lesão de doente com dermatite atópica (DA) pré-tratamento com metotrexato (MTX), com foco na epiderme (A) e na derme superficial (B); e na pele controle, com foco na epiderme (C) e na derme superficial (D). Aumento de 200 x. Expressão da IL-31RA, comparando-se a pele DA com lesão pré-tratamento com MTX e a pele controle, evidenciou alteração estatisticamente significativa na expressão do marcador na epiderme (E), sem diferença significativa na derme superficial (F)..... 62
- Figura 20 -** Imunoistoquímica com marcação para OSMR na pele com lesão de doente com dermatite atópica (DA) pré-tratamento com metotrexato (MTX), com foco na epiderme (A) e na derme superficial (B); e na pele controle, com foco na epiderme (C) e na derme superficial (D). Aumento de 200 x. Expressão da OSMR, comparando-se a pele DA com lesão pré-tratamento com MTX e a pele controle, não evidenciou alteração estatisticamente significativa na expressão do marcador na epiderme (E) e na derme superficial (F)..... 63

- Figura 21 -** Imunoistoquímica com marcação para TSLP na pele com lesão de doente com dermatite atópica (DA) pré-tratamento com metotrexato (MTX), com foco na epiderme (A) e na derme superficial (B); e na pele controle, com foco na epiderme (C) e na derme superficial (D). Aumento de 200 x. Expressão da TSLP, comparando-se a pele DA com lesão pré-tratamento com MTX e a pele controle, não evidenciou alteração estatisticamente significativa na expressão do marcador na epiderme (E) e na derme superficial (F)..... 64
- Figura 22 -** Imunoistoquímica com marcação para Ki-67 na pele com lesão de doente com dermatite atópica (DA) pré-tratamento com metotrexato (MTX), com foco na epiderme (A) e na derme superficial (B); e na pele controle, com foco na epiderme (C) e na derme superficial (D). Aumento de 200 x. Expressão da Ki-67, comparando-se a pele DA com lesão pré-tratamento com MTX e a pele controle, evidenciou alteração estatisticamente significativa na expressão do marcador na epiderme (E) e na derme superficial (F)..... 65
- Figura 23 -** Imunoistoquímica com marcação para IL-31 na pele com lesão de doente com dermatite atópica (DA), com foco na epiderme (A) e na derme superficial (B), A e B: pré-tratamento com metotrexato (MTX); e na pele com lesão de doente com DA, com foco na epiderme (C) e na derme superficial (D), C e D: pós-tratamento com MTX. Aumento de 200 x. Expressão da IL-31, comparando-se a pele DA com lesão pré e pós-tratamento com MTX, não evidenciou alteração estatisticamente significativa na expressão do marcador na epiderme (E) e na derme superficial (F)..... 67
- Figura 24 -** Imunoistoquímica com marcação para IL-31RA na pele com lesão de doente com dermatite atópica (DA), com foco na epiderme (A) e na derme superficial (B), A e B: pré-tratamento com metotrexato (MTX); e na pele com lesão de doente com DA, com foco na epiderme (C) e na derme superficial (D), C e D: pós-tratamento com MTX. Aumento de 200 x. Expressão da IL-31RA, comparando-se a pele DA com lesão pré e pós-tratamento com MTX, evidenciou alteração estatisticamente significativa na expressão do marcador na epiderme (E), sem diferença significativa na derme superficial (F). 68

- Figura 25 -** Imunoistoquímica com marcação para OSMR na pele com lesão de doente com dermatite atópica (DA), com foco na epiderme (A) e na derme superficial (B), A e B: pré-tratamento com metotrexato (MTX); e na pele com lesão de doente com DA, com foco na epiderme (C) e na derme superficial (D), C e D: pós-tratamento com MTX. Aumento de 200 x. Expressão da OSMR, comparando-se a pele DA com lesão pré e pós-tratamento com MTX, não evidenciou alteração estatisticamente significativa na expressão do marcador na epiderme (E) e na derme superficial (F)..... 69
- Figura 26 -** Imunoistoquímica com marcação para TSLP na pele com lesão de doente com dermatite atópica (DA), com foco na epiderme (A) e na derme superficial (B), A e B: pré-tratamento com metotrexato (MTX); e na pele com lesão de doente com DA, com foco na epiderme (C) e na derme superficial (D), C e D: pós-tratamento com MTX. Aumento de 200 x. Expressão da TSLP, comparando-se a pele DA com lesão pré e pós-tratamento com MTX, não evidenciou alteração estatisticamente significativa na expressão do marcador na epiderme (E) e na derme superficial (F)..... 70
- Figura 27 -** Imunoistoquímica com marcação para Ki-67 na pele com lesão de doente com dermatite atópica (DA), com foco na epiderme (A) e na derme superficial (B), A e B: pré-tratamento com metotrexato (MTX); e na pele com lesão de doente com DA, com foco na epiderme (C) e na derme superficial (D), C e D: pós-tratamento com MTX. Aumento de 200 x. Expressão de Ki-67, comparando-se a pele DA com lesão pré e pós-tratamento com MTX, não evidenciou alteração estatisticamente significativa na expressão do marcador na epiderme (E) e na derme superficial (F)..... 71
- Figura 28 -** Painel com os gráficos apresentando a expressão dos marcadores avaliados na epiderme (epid) e na derme superficial (DS) dos doentes com dermatite atópica (DA), pela técnica de imunoistoquímica, comparando-se a pele sem lesão e a pele com lesão pré-tratamento com metotrexato (MTX). Observou-se, na pele lesada, maior expressão de IL-31 na derme superficial, menor expressão de IL-31RA na epiderme e maior expressão de ki-67 na derme superficial..... 73

- Figura 29 -** Painel com os gráficos apresentando a expressão dos marcadores avaliados na epiderme (epid) e na derme superficial (DS), pela técnica de imunoistoquímica, comparando-se a pele sem lesão e a pele com lesão pós-tratamento com metotrexato (MTX). Observou-se, na pele lesada, maior expressão de IL-31RA na derme superficial e maior expressão de ki-67 na epiderme e na derme superficial. 75
- Figura 30 -** Perfil de expressão de IL-4, IL-6, IL-10, IL-31, IL-31RA, TNF- α , IFN- γ , TARC e CCL-22, comparando-se a pele com lesão de paciente com dermatite atópica (DA) pré-tratamento com metotrexato (MTX) e pele controle, por *Real Time*-PCR. Observou-se maior expressão de IL-6, IL-31, IL-31RA e TARC na pele lesada pré-tratamento.....77
- Figura 31 -** Perfil de expressão de IL-4, IL-6, IL-10, IL-31, IL-31RA, TNF- α , IFN- γ , TARC e CCL-22, comparando-se a pele com lesão de paciente com dermatite atópica (DA) pré-tratamento com metotrexato (MTX) e pós-tratamento com metotrexato, por *Real Time*-PCR. Houve diminuição estatisticamente significativa na expressão de IL-31 na pele lesada após o tratamento.79
- Figura 32 -** Perfil de expressão de IL-4, IL-6, IL-10, IL-31, IL-31RA, TNF- α , IFN- γ , TARC e CCL-22, comparando-se a pele sem lesão e a pele com lesão de pacientes com dermatite atópica (DA) pré-tratamento com metotrexato (MTX), por *Real Time*-PCR. Não houve significância estatística nestas comparações realizadas. 81
- Figura 33 -** Perfil de expressão de IL-4, IL-6, IL-10, IL-31, IL-31RA, TNF- α , IFN- γ , TARC e CCL-22, comparando-se a pele sem lesão e a pele com lesão de pacientes com dermatite atópica pós-tratamento com metotrexato, por *Real Time*-PCR. Observou-se maior expressão de IFN- γ na pele com lesão..... 82

Quadros

Quadro 1 -	Estudos principais sobre o uso do metotrexato em doentes com dermatite atópica	24
Quadro 2 -	Cronograma de visitas e procedimentos para os pacientes com dermatite atópica participantes do estudo	35
Quadro 3 -	Especificações dos anticorpos utilizados para reação imunoistoquímica, incluindo informações sobre diluição e controle positivo utilizados	38
Quadro 4 -	Painel de iniciadores utilizados para <i>Real Time</i> -PCR	40

Tabelas

Tabela 1 -	Dados demográficos, padrão de lesão, antecedentes pessoais, história de infecções prévias, comorbidades e hospitalização prévia dos doentes com dermatite atópica	47
Tabela 2 -	Distribuição dos pacientes com dermatite atópica conforme dados demográficos, antecedentes pessoais de doenças atópicas respiratórias, escores de gravidade segundo a semana inicial, semana 12 e semana 24 do tratamento com metotrexato e IgE sérica inicial e na semana 24 de tratamento	127
Tabela 3 -	Dados demográficos do grupo controle não-atópico.....	128
Tabela 4 -	Comparação dos marcadores IL-31, IL-31RA, OSMR, TSLP e Ki-67, pela técnica de imunoistoquímica, entre pele com lesão de pacientes com dermatite atópica (DA) antes do tratamento com metotrexato (MTX) e o grupo controle	129
Tabela 5 -	Comparação dos marcadores IL-31, IL-31RA, OSMR, TSLP e Ki-67, pela técnica de imunoistoquímica, entre pele lesada dos pacientes com dermatite atópica (DA) antes e após o tratamento com metotrexato (MTX).....	130
Tabela 6 -	Comparação dos marcadores IL-31, IL-31RA, OSMR, TSLP e Ki-67, pela técnica de imunoistoquímica, entre pele com lesão e sem lesão nos pacientes com dermatite atópica (DA) antes do tratamento com metotrexato (MTX)...	131
Tabela 7 -	Comparação dos marcadores IL-31, IL-31RA, OSMR, TSLP e Ki-67, pela técnica de imunoistoquímica, entre pele com lesão e sem lesão nos pacientes com dermatite atópica (DA) após o tratamento com metotrexato (MTX).....	132

Resumo

Lima LPS. *Avaliação do efeito do metotrexato nas manifestações clínicas e no perfil da expressão cutânea de citocinas e quimiocinas envolvidas na resposta inflamatória da dermatite atópica do adulto* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

Introdução: A dermatite atópica (DA) é doença inflamatória cutânea crônica de prevalência elevada e etiopatogenia multifatorial. Defeitos na barreira cutânea e disfunção imune, gerando inflamação, são os fatores de relevância na imunopatogenia desta enfermidade. O tratamento da DA baseia-se no reparo da barreira cutânea e no controle da inflamação; em pacientes com DA refratária à terapêutica tradicional, o metotrexato (MTX) pode ser uma alternativa de tratamento. Entretanto, há poucos relatos que analisam a ação do MTX sobre o perfil de citocinas envolvidas no processo inflamatório da DA. **Objetivos:** O objetivo geral do estudo foi avaliar o efeito do MTX nas manifestações clínicas e no perfil da expressão cutânea de citocinas e quimiocinas envolvidas no processo inflamatório da DA nos pacientes adultos tratados com metotrexato por 24 semanas. Como objetivos específicos, visamos avaliar nos pacientes supracitados: a evolução dos escores de gravidade EASI (*Eczema Area and Severity Index*) e SCORAD (*SCOring Atopic Dermatitis*), do prurido, dos níveis séricos de IgE e da espessura epidérmica média; e o perfil evolutivo da expressão de citocinas inflamatórias, tais como a IL-31, a subunidade do receptor alfa de IL-31 (IL-31RA), o receptor oncostatina M (OSMR), TSLP e Ki67 por imunoistoquímica e de IL-4, IL-6, IL-10, IL-31, IL-31RA, TNF- α , IFN- γ , TARC e CCL-22 por *Real Time*-PCR. **Métodos:** Foi realizado estudo prospectivo aberto, com 12 adultos com diagnóstico de DA (segundo critérios de Hanifin & Rajka) moderada a grave. MTX na dose semanal de 15 mg foi prescrito por via oral por período de 24 semanas. Ácido fólico foi indicado na dose de 5 mg/semana 48 a 72 horas após a ingestão do MTX. Foram realizadas visitas nas semanas inicial, 2, 4, 8, 12, 16 e 24 e possíveis efeitos colaterais foram monitorados. Os pacientes foram avaliados na semana inicial, semana 12 e semana 24 quanto aos escores de gravidade EASI e SCORAD, quanto ao prurido (escala analógica visual – VAS) e por fotografias clínicas; e na semana inicial e semana 24 do estudo, quanto aos níveis séricos de IgE (nefelometria). Eles foram ainda biopsiados em dois pontos (pele com lesão e pele sem lesão) na semana inicial e após 24 semanas de uso do MTX. Foram selecionados dez controles não-atópicos, pareados por gênero e idade, para fins de padronização das análises laboratoriais. O material obtido foi utilizado para se avaliar a espessura epidérmica média, a marcação por imunoistoquímica de IL-31, IL-31RA, OSMR, TSLP e Ki67 e a expressão de RNAm de IL-4, IL-6, IL-10, IL-31, IL-31RA, TNF- α , IFN- γ , TARC e CCL-22 por *Real Time*-PCR. **Resultados:** Após 24 semanas de tratamento com MTX,

observou-se, nos doentes com DA, redução estatisticamente significativa do EASI ($p = 0,006$), do SCORAD ($p < 0,001$), do prurido ($p = 0,028$) e da IgE sérica ($p = 0,034$). Houve aumento transitório da transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) sérica ($n = 3 / 12$), náuseas no dia do uso da medicação ($n = 2 / 12$) e epigastria ($n = 1 / 12$), sem necessidade de suspensão do MTX nos doentes atópicos. Observou-se também redução significativa da espessura epidérmica média na pele lesada ($p = 0,021$). Na avaliação imunoistoquímica, comparando-se a pele dos doentes com DA com lesão antes e depois de 24 semanas de MTX, houve aumento da expressão de IL-31RA na epiderme ($p = 0,016$). Pela técnica de Real Time-PCR, observou-se diminuição da expressão gênica de IL-31 ($p = 0,019$) na pele com lesão de DA. Não se observou alteração significativa na expressão cutânea das demais citocinas e quimiocinas inflamatórias analisadas. **Conclusão:** Este estudo evidencia a eficácia e segurança do metotrexato no tratamento de doentes adultos com DA grave e refratária. Nossos dados evidenciaram redução da expressão gênica de IL-31 e aumento da expressão proteica epidérmica de IL-31RA após 24 semanas de uso do MTX por via oral. Estes achados contribuem para a compreensão dos possíveis mecanismos de ação desta medicação na resposta inflamatória da DA, sobretudo sobre o prurido, sintoma principal e sempre presente nesta dermatose.

Descritores: Dermatite atópica; Prurido; Inflamação; Metotrexato; Interleucinas; Quimiocinas; Interleucina-31; Subunidade alfa do receptor de IL-31; Adulto.

Abstract

Lima LPS. *Effect of methotrexate on clinical manifestations and on the profile of cutaneous expression of cytokines and chemokines involved in the inflammatory response of adult atopic dermatitis* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2021.

Introduction: Atopic dermatitis (AD) is a chronic inflammatory skin disease with a high prevalence and multifactorial etiopathogenesis. Defects in the skin barrier and immune dysfunction, generating inflammation, are key factors to the immunopathogenesis of the disease. The treatment of AD is based on the repair of the skin barrier and control of inflammation; in patients with AD refractory to traditional therapy, methotrexate (MTX) may be an alternative treatment. There are few reports that analyze the action of MTX on the profile of cytokines involved in the inflammatory process of AD.

Objectives: The general objective of the study was to evaluate the effect of MTX on the clinical manifestations and on the cutaneous expression profile of cytokines and chemokines involved in the inflammatory response of AD in adult patients treated with methotrexate for 24 weeks. As specific objectives, we aimed to evaluate in the aforementioned patients: the follow-up of EASI (Eczema Area and Severity Index), SCORAD (SCORing Atopic Dermatitis), pruritus, circulating IgE levels, and mean epidermal thickness. We also evaluated the profile of the expression of IL-31, IL-31 alpha receptor subunit (IL-31RA), oncostatin receptor M (OSMR), TSLP and Ki67 by immunohistochemistry and of IL-4, IL-6, IL-10, IL-31, IL-31RA, TNF- α , IFN- γ , TARC, and CCL-22 by Real Time PCR. **Methods:** An open prospective study was conducted with 12 adult patients with moderate to severe AD (according to Hanifin & Rajka criteria). MTX in weekly dose of 15 mg was administered orally for 24 weeks. Folic acid was indicated at a 5-mg dose once a week 48 to 72 hours after MTX intake. Visits were performed at baseline and at week 2, 4, 8, 12, 16 and 24, and possible side effects were monitored. The patients were evaluated for EASI, SCORAD, pruritus (visual analogue scale – VAS), and photographs at initial week, week 12 and week 24, and for serum IgE levels (nephelometry) at initial week and week 24. They were also biopsied in two points (non-lesional and lesional skin). Ten non-atopic controls, matched by gender and age, were selected for standardizing laboratory analysis. Evaluations were performed on pre-treatment and after 24 weeks of use of MTX. The obtained material was used to evaluate the mean epidermal thickness, immunohistochemistry staining of IL-31, IL-31RA, OSMR, TSLP and Ki67, and the expression of IL-4 mRNA, IL-6, IL-10, IL-31, IL-31RA, TNF- α , IFN- γ , TARC, and CCL-22 by real time PCR. **Results:** After 24 weeks of treatment with MTX, there was a statistically significant reduction of EASI ($p = 0.006$), SCORAD ($p < 0.001$), pruritus ($p = 0.028$), and serum IgE ($p = 0.034$). There were transient increases in serum glutamic-pyruvic

transaminase (n = 3 / 12), nausea on the day of medication uptake (n = 2 / 12) and epigastric pain (n = 1 / 12), with no need to discontinue MTX in atopic patients. There was also a significant reduction in the mean epidermal thickness of the lesional skin in AD patients (p = 0.021). Immunohistochemistry revealed higher IL-31RA expression in epidermis (p = 0.016) when comparing lesional skin of the AD patients pre-and post-treatment with MTX. There was a decrease on the genic expression of IL-31 (p = 0.019) on the lesional AD skin after 24 weeks of therapy detected by Real time PCR. There were no significant changes in the cutaneous expression of the other evaluated cytokines and chemokines. **Conclusion:** This study highlights the efficacy and safety of methotrexate in the treatment of patients with severe and refractory AD. Our findings revealed reduction of IL-31 gene expression and an increase in IL-31RA epidermal protein expression after 24 weeks of MTX in AD skin. These data are helpful to clarify the possible mechanisms of action of MTX in the inflammatory response of AD, especially on the control of pruritus, the major and always present symptom of AD.

Descriptors: Atopic dermatitis; Pruritus; Inflammation; Methotrexate; Interleukins; Chemokines; Interleukin-31; Interleukin-31 receptor subunit alpha; Adult.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A dermatite atópica (DA) é doença inflamatória cutânea crônica, pruriginosa e de curso recidivante. É frequentemente associada a níveis de imunoglobulina E (IgE) elevados e história pessoal e/ou familiar de atopia, como rinoconjuntivite alérgica e asma ⁽¹⁻³⁾.

Segundo revisão sistemática sobre a prevalência e incidência da doença em todos os continentes, incluindo 378 estudos, a prevalência da dermatite atópica ao longo da vida variou de 4,4 a 17,7% em crianças e 3,0 a 17,7% em adultos. Além disso, observa-se tendência de aumento da sua prevalência nos últimos anos, sobretudo em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento ⁽⁴⁾. No Brasil, de acordo com a terceira fase do Estudo Internacional de Asma e Alergias na Infância (ISAAC, *International Study of Asthma and Allergies in Children*), observou-se prevalência de 5 a 10% de DA na população estudada ⁽⁵⁾.

O início da doença é comumente observado entre três e seis meses de idade, estimando-se que 80% dos doentes desenvolvam esta dermatose até os seis anos de vida ⁽⁶⁾. Embora se acreditasse que a maioria dos doentes apresentasse resolução espontânea da DA ao longo da infância, evidências têm demonstrado maior persistência da doença na idade adulta, com novas exacerbações após longos períodos de remissão ⁽⁷⁾. Observa-se, ainda, que em aproximadamente 25% dos pacientes adultos com dermatite atópica, as primeiras manifestações da doença ocorrem após os 16 anos de idade ⁽⁸⁾. Dados sobre a gravidade da doença são escassos na literatura. Estudo internacional sobre a dermatite atópica em adultos, que incluiu dados de pacientes dos EUA, Canadá, França, Alemanha, Itália, Espanha, Reino Unido e Japão, mostrou que 10 a 20% dos pacientes adultos com DA reportaram doença grave ⁽⁹⁾.

Quanto ao aspecto clínico, Yew *et al.* apresentam dados de revisão sistemática e meta-análise das características clínicas da DA, com a inclusão de 38 estudos em crianças e 36 em adultos. Na DA em adultos,

manifestam-se com mais frequência eritrodermia, sinal de Hertoghe (rarefação de pelos no terço lateral das sobrancelhas), dermatite de mãos, eczema de mamilo, lesões papulosas liquenoides, curso influenciado por fatores ambientais e/ou emocionais, lesões prurigoides, liquenificação, lesões numulares e envolvimento ungueal ⁽¹⁰⁾.

Além da associação com doenças atópicas e alérgicas, como rinite alérgica, asma e alergia alimentar, evidências crescentes têm demonstrado maior incidência de outras comorbidades em pacientes com DA, favorecendo a hipótese da natureza sistêmica desta doença ^(6, 11, 12). Algumas das associações positivas identificadas são distúrbios neuropsiquiátricos (alterações do sono, depressão, transtorno de ansiedade generalizada, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade) ⁽¹³⁾, obesidade ⁽¹⁴⁾, doenças cardiovasculares ⁽¹⁵⁾ e autoimunes (doença inflamatória intestinal, alopecia areata) ⁽¹⁶⁾ e linfoma ⁽¹⁷⁾.

A DA pode ser classificada em dois tipos: extrínseca e intrínseca. A forma extrínseca é observada em 70 a 80% dos pacientes e está associada a níveis elevados de IgE sérica; já na forma intrínseca, que acomete cerca de 20 a 30 % dos pacientes, os níveis de IgE encontram-se normais ⁽¹⁸⁾.

Ainda não existem marcadores laboratoriais específicos para a doença, sendo o diagnóstico de DA embasado em critérios clínicos e laboratoriais, como os estabelecidos por Hanifin e Rajka ^(2, 19).

1.1 Dermatite atópica e fisiopatogenia

A DA é uma doença de fisiopatogenia complexa, em que estão envolvidos múltiplos fatores, incluindo mutações genéticas, efeitos epigenéticos sobre os genes, alterações da barreira cutânea, alterações imunológicas, alterações do microbioma, fatores ambientais e psicológicos ^(2, 6, 20-23).

1.1.1 Fatores genéticos

O fator de risco principal para o desenvolvimento da dermatite atópica é a presença de história familiar de atopia, sobretudo de DA ⁽²⁴⁾.

A doença é hereditária e multifatorial, com vários genes não alélicos e fatores ambientais envolvidos na sua patogênese ⁽²⁵⁾.

Mutações no gene da filagrina, que codifica a proteína epidérmica filagrina, diminuindo sua expressão, foram descritas em cerca de 60% dos indivíduos caucasianos com DA, especialmente as variantes R510X e 2282del4 ⁽²⁶⁾. Entretanto, observou-se que somente cerca de 20% dos pacientes com DA leve a moderada apresentam mutações no gene da filagrina e que a maioria dos indivíduos portadores de mutações neste gene não desenvolvem atopia ⁽²⁷⁾.

Estudos de associação genômica ampla (*genome-wide association study* - GWAS) e de sequenciamento genético têm evidenciado vários outros genes relacionados à doença. Estes genes estão envolvidos, principalmente, com: 1) função da barreira cutânea; 2) mecanismos do sistema imune inato; 3) mecanismos do sistema imune adaptativo; 4) codificação de alarminas (interleucinas produzidas em resposta ao estresse, radiação ultravioleta e trauma mecânico) produzidas pelos queratinócitos (IL-25, IL-33, TSLP); 5) regulação da metilação do DNA; 6) metabolismo da vitamina D e síntese de seus receptores ^(25, 28).

Além disso, alterações epigenéticas, isto é, mudanças reversíveis e herdáveis no genoma funcional que não alteram a sequência de nucleotídeos do DNA, parecem ser importantes no desenvolvimento da DA. Vários mecanismos têm sido identificados pelos quais alterações epigenéticas podem regular a expressão gênica, incluindo modificações pós-traducionais das proteínas histonas, as quais impactam na arquitetura da cromatina e afetam sua densidade e disponibilidade para complexos enzimáticos; metilação do DNA e mecanismos dependentes de RNA não-codificadores ⁽²⁵⁾. Rodríguez *et al.* observam modificações na metilação do DNA na pele lesada com DA, não identificadas na pele de controle saudável ⁽²⁹⁾.

1.1.2 Alterações da barreira cutânea e da imunidade inata

A pele, entre outros, constitui barreira física contra desidratação, micróbios, irritantes e alérgenos, compondo o que se denomina de barreira cutânea (BC). A BC está alterada nos pacientes com DA, observando-se susceptibilidade aumentada para sensibilização alérgica, bem como colonização microbiana e infecções ^(20, 22, 30). Acredita-se que a BC alterada na DA contribua para o início do processo inflamatório observado na doença, reforçando a hipótese fisiopatogênica *outside-inside*, em que se postula que a barreira cutânea disfuncional é o processo patogênico primário na DA ^(31, 32). A camada mais externa da pele, o estrato córneo (EC), é o primeiro mediador desta função de barreira epidérmica. Sua alteração na DA leva ao aumento da perda de água transepidérmica (*transepidermal water loss* - TEWL) e à diminuição da capacidade de ligação da água, sobretudo pelos níveis alterados de componentes inter e intracelulares do EC ^(33, 34). Há menor expressão de proteínas da barreira epidérmica, como filagrina, loricrina e involucrina, secundária ao processo inflamatório observado nas lesões de DA, sobretudo expressão aumentada de citocinas do perfil Th2 ^(35, 36). Além dessas alterações, observa-se redução na matriz lipídica extracelular de ceramidas e, conseqüentemente, redução da produção de esfingosina (produzida a partir da ceramida pela ação da ceramidase no EC) em pacientes com DA. A esfingosina é conhecida por sua atividade antimicrobiana e sua deficiência pode contribuir para a maior suscetibilidade dos indivíduos com DA para a colonização pelo *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ⁽³⁷⁾.

Outra estrutura alterada na DA são as *tight junctions* (TJ) epidérmicas. Trata-se de complexa rede de proteínas transmembranosas que controla a passagem intercelular de água, íons e solutos, localizada no estrato granuloso da epiderme. Estudos têm evidenciado menor expressão de proteínas constituintes das TJ, como claudinas 1 e 23, alterando a integridade da barreira cutânea ^(32, 38).

Com relação à imunidade inata, sabe-se que os queratinócitos expressam receptores de reconhecimento de padrão, como receptores da

família dos TLRs (*Toll-like receptors*), do tipo NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein*), RIG-1 (*retinoic acid-inducible gene 1*) e CLR (*C-type lectin receptors*)^(30, 39). A ativação destes receptores leva à produção de fatores de transcrição que promovem a expressão gênica de citocinas necessárias para a proteção contra patógenos⁽³⁹⁾.

Outra função dos queratinócitos é a produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs, *antimicrobial peptides*), como defensinas, catelicidinas e calprotectinas. A interação dos AMPs com patógenos resulta na ruptura da integridade da membrana microbiana⁽⁴⁰⁾. AMPs também induzem a produção de citocinas e quimiocinas, as quais contribuem para o recrutamento de neutrófilos, monócitos e células T na epiderme⁽⁴¹⁾.

Indivíduos com DA apresentam redução da função dos TLRs⁽⁴²⁾, receptores NOD2⁽⁴³⁾ e AMPs⁽⁴⁴⁾, havendo maior predisposição às infecções cutâneas bacterianas, especialmente pelo *S. aureus*, virais e fúngicas.

Evidências crescentes têm demonstrado haver alterações das células *natural killer* (NK) nos pacientes com DA. Pele lesada de DA mostra acúmulo de células NK e aumento da expressão gênica relacionada a essas células, bem como desbalanço entre células NK em repouso e ativadas⁽⁴⁵⁾. Mack *et al.* observam níveis séricos de células NK bastante reduzidos e alteração da composição dos subtipos dessas células em pacientes adultos com DA moderada a grave, comparando-os com controles. Identificam ainda aumento de células NK ativadas na pele lesada dos pacientes atópicos⁽⁴⁶⁾.

1.1.3 Alterações da imunidade adaptativa

A pele lesada de pacientes com DA apresenta infiltrado inflamatório sobretudo composto por células T CD4+. A pele sem lesão destes pacientes também apresenta alterações inflamatórias, porém de forma menos expressiva^(6, 23, 47-49).

Durante a fase aguda da doença, ocorre aumento da produção de citocinas do padrão Th2 (IL-4, IL-10, IL-13) e Th22 (IL-22). Estas citocinas reduzem a diferenciação de células da epiderme e podem contribuir para a redução da expressão da filagrina, como também dos peptídeos

antimicrobianos ^(47, 50). A importância das citocinas IL-4 e IL-13 na patogênese da DA ficou ainda mais evidente após demonstração da resposta terapêutica satisfatória pelo uso de dupilumabe, anticorpo monoclonal anti-receptor alfa de IL-4, em pacientes com DA moderada a grave ⁽⁵¹⁻⁵⁴⁾. A presença de células Th1 (citocinas IL-12, IFN- γ) e Th17 (IL-17) foi observada nas lesões crônicas de DA, principalmente em estudos realizados em crianças ^(55, 56) e na população asiática ⁽⁵⁷⁾. Mesmo com estes achados, o papel destas vias na patogênese da DA ainda é incerto.

Tsoi *et al.* analisaram alterações no transcriptoma na pele de pacientes com DA sem lesão, com lesão aguda e com lesão crônica. A pele sem lesão exibiu aumento na expressão de genes relacionados a TNF, Th1, Th2 e Th17. Nas lesões agudas, houve maior expressão de genes relacionados às células dendríticas e respostas Th1, Th2 e Th17, além de expressão aumentada de linfopoietina estromal tímica (TSLP – *thymic stromal lymphopoietin*) e IL-36. Nas lesões crônicas, observou-se aumento da expressão de genes relacionados a Th1, Th2, Th17, IL-36 e de mecanismos de reparo da barreira cutânea. Observou-se ainda expressão aumentada de IL-22 nas fases aguda e crônica da doença, além de outras citocinas da família IL-20. Os autores concluíram que as modificações observadas comparativamente entre a pele sem lesão e o processo inflamatório agudo e crônico da doença são mais quantitativas que qualitativas ⁽⁵⁸⁾.

Outras citocinas têm sido identificadas na inflamação da DA. Queratinócitos epidérmicos na doença expressam TSLP, a qual induz a ativação de células dendríticas mieloides, mastócitos, células NK, células Th2 e Th22 ^(59, 60). Evidencia-se expressão proteica aumentada de TSLP em queratinócitos de pacientes com dermatite atópica, comparando-os com pele normal e pele de pacientes com dermatite de contato alérgica por níquel e lúpus eritematoso cutâneo ⁽⁶¹⁾. Alysandratos *et al.* observam maior expressão gênica de TSLP em amostras de pele lesada de pacientes com dermatite atópica e maior nível sérico de TSLP nesses pacientes em relação a amostras de controles saudáveis ⁽⁶²⁾. IL-25 e IL-33 (membro da família da

citocina IL-1) são liberadas por vários tipos celulares, incluindo queratinócitos e células linfoides inatas tipo 2, e são promotoras da resposta imune Th2, além de ativarem mastócitos e eosinófilos. Injúrias mecânicas, exposição a alérgenos e infecção por microrganismos aumentam os níveis de TSLP, IL-25 e IL-33 e a inflamação mediada por células Th2 ^(63, 64). Foi demonstrado aumento de IL-33 no soro de pacientes com DA, correlacionando-o com a gravidade da doença e observando-se sua redução após tratamento ⁽⁶⁵⁾.

Outra citocina de relevância descrita na DA é a IL-31 (membro da família da citocina IL-6), secretada principalmente por células T (Th2), mas também eosinófilos, células dendríticas e macrófagos. Sua sinalização ocorre por meio de receptor heterodimérico, composto por duas subunidades, o receptor oncostatina M (OSMR) e o receptor alfa de IL-31 (IL-31RA) ⁽⁶⁶⁻⁶⁸⁾. IL-31RA é expresso por células imunes, como macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, neutrófilos, basófilos, células T, bem como por queratinócitos epidérmicos e nervos periféricos cutâneos ^(67, 69, 70). OSMR também é expresso em vários tipos celulares, incluindo queratinócitos, nervos cutâneos e neurônios nociceptivos do gânglio da raiz dorsal ⁽⁷¹⁾. Bilsborough *et al.* observam que os níveis de IL-31RA expressos nos queratinócitos da pele lesada de pacientes com DA são mais elevados do que os níveis observados na pele de pacientes controles não-atópicos, enquanto os níveis da expressão de OSMR são semelhantes entre pele controle e pele de pacientes com DA ⁽⁷²⁾. Nobbe *et al.* evidenciam que expressão de IL-31 na pele de doentes com DA foi maior que nos controles pela técnica de imunoistoquímica. Para IL-31RA e OSMR, observam imunoreatividade moderada na epiderme e inferior a 5% no infiltrado celular dérmico (sem diferença com a pele controle) ⁽⁷³⁾. Kato *et al.* também demonstram detecção de IL-31 no infiltrado celular da pele de pacientes com DA grave e de IL-31RA nos queratinócitos e em fibras neurais da derme desses pacientes pela técnica de imunoistoquímica ⁽⁷⁴⁾. Células mononucleares do sangue periférico (PBMCs - *peripheral blood mononuclear cells*) de doentes com DA secretam IL-31, sob estímulo com

exotoxina estafilocócica, em quantidades significativamente maiores que os controles ⁽⁷⁵⁾.

A expressão de IL-31 parece estar associada, na DA, à inflamação crônica e ao prurido ⁽⁷⁴⁻⁷⁶⁾ e parece promover a inflamação mediada por células Th2 ^(77, 78). Estudos demonstram níveis séricos de IL-31 aumentados em doentes com DA, quando comparados aos controles, tanto em adultos quanto em crianças, bem como associação com intensidade do prurido ⁽⁷⁹⁻⁸¹⁾. Correlação com a gravidade da doença e com os níveis séricos de IgE é menos clara, uma vez que alguns estudos evidenciam correlação positiva, enquanto outros não ^(77, 79-81). Cevikbas *et al.* demonstram que IL-31 derivada de células Th2 ativa IL-31RA nos nervos sensoriais TRPV1 (*transient receptor potential cation channel vanilloid subtype 1*) e TRPA1 (*transient receptor channel potential cation channel ankyrin subtype 1*) na pele, promovendo prurido na DA ⁽⁶⁸⁾ (Figura 1). Ruzicka *et al.* mostram que o tratamento com anticorpo anti-receptor alfa de IL31 (nemolizumabe) resultou em melhora significativa do prurido em pacientes com DA moderada a grave, contribuindo, subsequentemente, para a melhora da doença, com redução nos escores de gravidade ⁽⁸²⁾.

1.1.4 Alterações das células dendríticas e células T reguladoras

Células dendríticas (DC, *dendritic cells*) são uma classe de células derivadas da medula óssea que formam interface fundamental entre a detecção de patógenos e outros sinais associados a “perigo” pelo sistema imune inato e a ativação da imunidade adaptativa. Elas pertencem à família de células apresentadoras de antígenos e existem dois subtipos principais de DC humanas: DC clássicas ou mieloides (mDC) e DC linfoides ou plasmocitoides (pDC) ⁽⁸³⁾. O número de células dendríticas plasmocitoides é bastante reduzido nos pacientes com DA, devido à apoptose induzida por citocinas Th2, o que contribui para a maior susceptibilidade ao eczema herpético observado nestes indivíduos ⁽⁸⁴⁾. Células dendríticas epidérmicas inflamatórias (IDECs), um subtipo de mDC, são encontradas nas lesões de DA e são importantes contribuintes para a ativação de células T ^(30, 85).

Células de Langerhans epidérmicas e células dendríticas dérmicas produzem TARC (*thymus and activation-regulated chemokine*) / CCL17 e MDC (*macrophage-derived chemokin*) / CCL-22, os quais auxiliam na promoção da resposta Th2⁽⁷⁸⁾.

Em pacientes com DA, observa-se aumento das células T reguladoras (Treg) na pele e no sangue periférico, sendo os níveis séricos positivamente correlacionados com a gravidade da doença. Todavia, seu papel na patogênese da DA ainda não é bem definido^(21, 86) (Figura 1).

1.1.5 Alterações do microbioma cutâneo

A pele de pacientes com dermatite atópica é comumente colonizada por *S. aureus* e apresenta menor diversidade microbiana, sendo estas alterações observadas, sobretudo, durante a exacerbação da doença⁽⁸⁷⁾. Baurecht *et al.* identifica aumento de *S. aureus* e menor diversidade microbiana nas lesões crônicas de DA, havendo alteração progressiva entre a pele sem lesão, pele com lesões agudas e pele com lesões crônicas de DA⁽⁸⁸⁾ (Figura 1). Segundo meta-análise que incluiu 95 estudos observacionais, a prevalência de *S. aureus* encontrada em pacientes com DA foi superior à encontrada nos controles saudáveis, sendo de 70% na pele lesada, 62% na região nasal e de 39% na pele não lesada⁽⁸⁹⁾.

A penetração do *S.aureus* na epiderme correlaciona-se com o aumento de IL-4, IL-13, IL-22 e TSLP e com a menor expressão de catelicidinas. Os superantígenos desta bactéria aumentam a inflamação Th2⁽⁹⁰⁾.

Colonização da pele por bactérias do gênero *Staphylococcus*, exceto *S. aureus*, aos dois meses de idade parece proteger crianças de desenvolverem DA em avaliação posterior, aos 12 meses de vida⁽⁹¹⁾.

Outros organismos, como os fungos do gênero *Malassezia*, também parecem estimular a inflamação cutânea em indivíduos com DA⁽⁹²⁾. *Malassezia spp* parece contribuir na patogênese da dermatite atópica localizada sobretudo na região cefálica, região cervical e tronco superior (*head and neck dermatitis*), a qual se trata de uma variante de DA.

Guglielmo *et al.* demonstram que, neste subtipo de DA, o uso do antifúngico itraconazol por via oral, associado ao tratamento tópico, é benéfico no manejo da dermatite ⁽⁹³⁾.

FONTE: Adaptado de Weidinger et al., 2018 ⁽⁶⁾.

Cél: células; Th: célula T auxiliadora; ILC: célula linfóide inata; Treg: célula T reguladora; IDEC: célula dendrítica epidérmica inflamatória.

Figura 1 - Ilustração esquemática das principais alterações observadas na fisiopatogenia da dermatite atópica, com foco nas alterações imunológicas

1.2 Dermatite atópica e prurido

A maioria dos pacientes com dermatite atópica apresenta prurido crônico, com prevalência descrita entre 87 a 100% ⁽⁹⁴⁾. O prurido constante pode desencadear alterações do sono, baixa autoestima, transtornos do humor e dificuldade de concentração, impactando na qualidade de vida e no bem-estar psicossocial dos indivíduos ^(95, 96).

O prurido também está diretamente associado à patogênese da doença, uma vez que promove o ciclo “prurido-liquenificação”. Nesta reação

em cadeia, a sensação de coceira evoca o reflexo da coçadura, induzindo danos na pele, com exacerbação da disfunção de barreira e da inflamação. Além disso, o ato de coçar estimula a liberação de fatores pruridogênicos, promovendo sensação adicional de coceira, ao atuarem nos neurônios sensoriais, perpetuando o ciclo ⁽⁹⁷⁾.

Na DA, sabe-se que o prurido é mediado por vários fatores que interagem entre si, como queratinócitos, fibras nervosas cutâneas, moléculas pruridogênicas e o sistema nervoso central e periférico ⁽⁹⁸⁻¹⁰⁰⁾.

O prurido ocorre por duas vias independentes: fibras nervosas sensíveis à histamina e fibras nervosas não histaminérgicas do tipo C ⁽¹⁰¹⁾. Na DA, o prurido parece ser mediado por fibras não histaminérgicas do tipo C, o que, em parte, explica a pouca resposta no uso de anti-histamínicos anti-H1 no controle deste sintoma nos atópicos ⁽¹⁰²⁾.

O surgimento de fibras nervosas epidérmicas que estão associadas ao prurido é observado na DA (hiperinervação da pele), tanto em humanos quanto em animais ^(103, 104). Os queratinócitos são os responsáveis pela produção do fator de crescimento neural (NGF - *nerve growth factor*). A inervação epidérmica é regulada pelo ajuste fino entre os fatores de crescimento neural (NGF, anfirregulina, galatinase) e os fatores de inibição neural (semaforina 3A, anosmina-1) ⁽¹⁰⁵⁾. O aumento das concentrações plasmáticas de NGF em pacientes com DA parece se correlacionar com a gravidade da doença ⁽¹⁰⁶⁾.

Na pele atópica, observa-se expressão aumentada de neuropeptídeos pró-inflamatórios, como substância P, peptídeo intestinal vasoativo e calcitonina, alterando a interface entre a pele e as fibras nervosas e atuando na indução do prurido ⁽¹⁰⁷⁾.

Peptídeo natriurético cerebral (*brain-derived natriuretic peptide* – BNP) é considerado neuropeptídeo importante na transmissão da sensação de prurido. Meng *et al.* demonstram que IL-31 induz síntese e liberação de BNP nos nervos sensoriais. BNP, por sua vez, aumenta a liberação de citocinas relacionadas à DA pelos queratinócitos e células dendríticas ⁽¹⁰⁸⁾.

Barreira cutânea disfuncional propicia maior permeabilidade da pele a agentes irritantes e associados a prurido, como proteases bacterianas, alérgenos, sabonetes alcalinos e tecidos de roupas ⁽⁹⁹⁾. Evidenciou-se que a aplicação de acetona sobre pele de camundongo, simulando pele xerótica, ocasiona aumento de fibras nervosas intraepidérmicas, por meio do aumento dos níveis de NGF e anfirregulina, sugerindo que alterações da barreira cutânea podem desencadear prurido ⁽¹⁰⁴⁾.

O prurido nesta doença também é regulado na derme. Fibroblastos dérmicos secretam artemina em resposta à substância P, levando à inervação periférica anormal e à hiperalgesia térmica. Acredita-se que a artemina diminua o limiar do prurido dependente da temperatura nas doenças de pele pruriginosas, incluindo a DA ⁽¹⁰⁹⁾.

Receptores ativados por protease (PAR – *protease activated receptors*) são ativados por proteases endógenas e exógenas, incluindo triptase, ácaros e bactérias, resultando na indução de prurido (100). Na pele lesada de pacientes com DA, identificou-se aumento de triptase e seu receptor, PAR2. PAR2 e PAR4 são expressos em vários tipos celulares, incluindo queratinócitos e neurônios pruriceptivos no gânglio da raiz dorsal. A expressão de PAR 2 nos queratinócitos de pacientes com DA é aumentada, sobretudo na pele lesada ⁽¹¹⁰⁾.

A endotelina-1, um peptídeo expresso por vários tipos celulares, como células endoteliais, células do sistema imune e neurônios, parece evocar sensação de dor e prurido ⁽¹⁰⁰⁾. Foi demonstrado aumento deste peptídeo na epiderme de lesões de pacientes com DA e em modelos murinos de DA e postula-se que este peptídeo tenha ação na indução do prurido na doença ⁽¹¹¹⁾.

Há evidências sobre a correlação entre o prurido e as disfunções imunes na DA. Estudo utilizando a remoção de fita adesiva da pele, que possui efeito semelhante à coçadura, demonstra infiltração de eosinófilos na pele, indução de TARC pelos queratinócitos e de CCL22, propiciando a atração de células Th2, via CCR4 (*C-C chemokine receptor*) ⁽¹¹²⁾.

IL-4 e IL-13 também parecem ter papel importante na indução do prurido na DA. Após injeção via intradérmica de IL-4 e IL-13 em camundongos, observou-se aumento significativo de episódios de coceira em comparação à injeção de placebo ⁽¹¹³⁾. A diminuição do prurido observada pelo uso de dupilumabe também respalda a ação de IL-4 e IL-13 na indução desse sintoma na DA ^(51, 52).

Quanto ao efeito da resposta imune sobre o prurido, sabe-se que a ciclosporina A (Cya) suprime o prurido em pacientes com DA mais rapidamente do que se observa a melhora das lesões cutâneas, sugerindo a existência de mediadores do prurido derivados de células T. Um dos potenciais candidatos envolvidos é a IL-31, cujos níveis séricos estão suprimidos na vigência de Cya ^(76, 114). Além de induzir diretamente a coceira, a hiperinervação da pele lesionada observada em pacientes com DA pode ser promovida pela IL-31 ⁽¹¹⁵⁾.

Outra citocina envolvida no prurido da DA é TSLP, amplamente expressa nas células epiteliais humanas nesta doença e células epiteliais brônquicas na asma ^(59, 61, 62, 116, 117). Foi evidenciado que células epiteliais comunicam-se com neurônios sensoriais cutâneos, via TSLP, para promover prurido ⁽¹¹⁶⁾. Entretanto, tezepelumabe, um anticorpo monoclonal anti-TLSP, em estudo clínico de fase II, apresentou eficácia limitada e redução de prurido não significativa em pacientes com DA moderada a grave ⁽¹¹⁸⁾.

1.3 Dermatite atópica e tratamento

O tratamento clássico e de primeira linha da dermatite atópica inclui o uso de hidratantes com função de restauração da barreira cutânea e de corticoides sobre as lesões, nas exacerbações da doença (tratamento reativo). Como tratamento de segunda linha, podem ser indicados os inibidores da calcineurina tópicos (tacrolimo e pimecrolimo). A aplicação tópica de inibidores da calcineurina (tacrolimo) e/ou corticoides também pode ser feita de forma intermitente, após período de uso intensivo destes medicamentos nas lesões e clareamento completo ou quase completo das

mesmas. Esta abordagem, conhecida como tratamento pró-ativo, auxilia na prevenção de novas exacerbações da doença ^(2, 3, 119).

Nos casos de maior gravidade e refratariedade ao tratamento tópico, medicações sistêmicas e/ou fototerapia estão indicadas. Os imunossupressores mais utilizados para o tratamento da DA são ciclosporina, metotrexato, azatioprina e micofenolato de mofetila ^(3, 120, 121).

Diversas terapias alvo, tanto sob a forma de moléculas pequenas quanto medicações biológicas, estão sob investigação para o tratamento da doença, sobretudo as formas mais graves. Dupilumabe é a primeira destas medicações já aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) para uso em adultos e crianças maiores de seis anos com DA moderada a grave, refratária aos tratamentos de primeira linha. Trata-se de anticorpo monoclonal humano, contra a subunidade alfa do receptor da interleucina 4 (IL-4), o qual modifica a sinalização de IL-4 e IL-13, induzindo bloqueio efetivo da resposta imune Th2 ^(3, 122). Embora seja medicação de eficácia e segurança comprovadas ⁽¹²³⁾, ainda não é amplamente acessível.

Diante de tantas novas perspectivas de tratamento, sobretudo sistêmicas, segundo Simpson e colaboradores, a decisão de iniciar medicação sistêmica para o tratamento da DA deve, idealmente, incluir avaliações de gravidade e qualidade de vida, além de fatores individuais do paciente. Alguns desses fatores individuais principais são preferências do paciente, impacto da doença em sua vida pessoal, terapia tópica prévia, implicações financeiras e comorbidades associadas. A decisão final dependerá da avaliação conjunta destas questões pelo paciente, cuidadores e equipe médica ⁽¹²⁴⁾.

1.4 Dermatite atópica e metotrexato

O metotrexato (MTX) é medicamento sintético, derivado da aminopterina, desenvolvido na década de 40 e utilizado no tratamento de neoplasias, doenças autoimunes, gravidez ectópica, indução de aborto e em

diversas doenças inflamatórias (artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal, psoríase e DA) ⁽¹²⁵⁻¹²⁸⁾.

É um análogo do ácido fólico, que se liga irreversivelmente à enzima dihidrofolato redutase (DHFR), inibindo a formação de folatos reduzidos, os quais são cofatores essenciais de diversas enzimas. Desta forma, ocorre diminuição das purinas, ácido timidílico, metionina e serina, levando a alterações na síntese proteica, de DNA e de RNA, sendo os efeitos citotóxicos máximos específicos da fase S da multiplicação celular ^(126, 129, 130).

O MTX apresenta, ainda, propriedades anti-inflamatórias, provavelmente relacionadas ao acúmulo intracelular de 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo (AICAR), pela inibição da enzima AICAR transformilase, que leva ao aumento intra e extracelular de adenosina. A adenosina em excesso liga-se ao receptor A2A nas células endoteliais, inibindo a apoptose, quimiotaxia de neutrófilos e liberação de TNF- α , IFN- γ , IL-12 e IL-6 ^(126, 130, 131) (Figura 2).

FONTE: Adaptado e modificado de Chan *et al.*, 2013 ⁽⁸⁶⁾.

MTX: metotrexato; AICAR: 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo; AMP: adenosina monofosfato. Setas em vermelho são inibitórias.

Figura 2 - Principais mecanismos de ação propostos para o metotrexato

Na psoríase, além dos mecanismos acima propostos, acredita-se que o MTX promova a inibição de linfócitos T e B e a quimiotaxia de monócitos⁽¹³²⁾, além de reduzir significativamente os níveis séricos de IL-22⁽¹³³⁾.

A distribuição e captação celulares do MTX estão completas após uma hora, a partir da sua ingestão. Uma vez na circulação, cerca de 50% do MTX encontra-se ligado a proteínas. A medicação possui afinidade por hepatócitos, precursores mielóides, eritrócitos e fibroblastos. No meio intracelular, formam-se metabólitos do MTX, sendo a forma ativa a poliglutaminada, que persiste por meses e permite a posologia semanal. Sua excreção é predominantemente renal, ocorrendo em menor grau pela via biliar^(130, 131).

Quanto à segurança e aos efeitos colaterais no uso desta medicação, as principais evidências são identificadas nos estudos de pacientes com psoríase. Os principais efeitos colaterais são efeitos teratogênicos e mutagênicos (categoria X de risco na gestação), efeitos agudos e crônicos (tardios). Dentre os efeitos colaterais agudos, o mais comum é intolerância gastrointestinal, que inclui dor abdominal, náuseas, diarreia, perda do apetite e úlceras orais. Mielotoxicidade, cefaleia, sonolência, vertigem, convulsão, pericardite e efusão pericárdica também podem ocorrer. Quanto aos efeitos colaterais tardios, os principais são hepatotoxicidade e toxicidade pulmonar crônica (pneumonite intersticial e fibrose pulmonar)⁽¹³⁴⁾. Fibrose hepática pode se desenvolver em até 25% dos doentes que utilizaram metotrexato por cinco anos e pode evoluir para cirrose. A incidência de cirrose hepática é muito baixa em pacientes com dose cumulativa inferior a quatro gramas⁽¹³⁵⁾. Entretanto, evidências mais recentes sugerem que a fibrose hepática não estaria relacionada a qualquer dose cumulativa de metotrexato e ocorreria mais provavelmente em pacientes com outros fatores de risco concomitantes, como ingestão excessiva de bebida alcoólica, obesidade e diabetes melitus⁽¹³⁶⁾.

Na DA, o uso do MTX é sugerido como opção de medicação sistêmica para o tratamento da doença refratária à terapêutica tradicional e de primeira linha^(3, 120, 121, 124, 137), embora seja de uso *off-label*. A primeira publicação

citando o interesse do uso de imunossupressores na DA ocorreu em 1993⁽¹³⁸⁾. A seguir, são apresentados os principais estudos relacionados ao uso do MTX no tratamento da doença.

1.4.1 Estudos sobre o uso do metotrexato na dermatite atópica

Em 2006, Goujon *et al.* realizam estudo aberto retrospectivo com 20 pacientes adultos com DA em uso de MTX e concluem que a medicação é eficaz e segura no tratamento da doença⁽¹³⁹⁾. A medicação foi utilizada por período de 3 meses a 2 anos e meio, com a dose semanal de 7,5 a 25 mg. Esta foi a primeira publicação identificada a reportar o uso do metotrexato na DA.

Em 2007, Weatherhead *et al.* demonstram redução na atividade da DA em 52% (escore SASSAD, *Six Area, Six Sign Atopic Dermatitis*), em estudo aberto e prospectivo com 12 adultos com DA moderada a grave em uso de MTX oral por 24 semanas⁽¹⁴⁰⁾.

Em 2008, Zoller *et al.* evidenciam a eficácia do tratamento com MTX oral, na dose de 10 a 20 mg/semana, para pacientes refratários ao tratamento convencional, com DA de início tardio e com eczema idiopático. A duração do tratamento variou de 14 a 114 semanas⁽¹⁴¹⁾.

Em 2010, Lyakhovitsky *et al.* observam boa resposta pelo uso de MTX (10-25 mg/semana) na maioria dos 20 adultos com DA tratados por 8 a 12 semanas. Houve redução significativa tanto do escore de gravidade SCORAD (*SCOring Atopic Dermatitis*) quanto do DLQI (*Dermatology Life Quality Index*, índice de qualidade de vida para doenças de pele), questionário validado para avaliar qualidade de vida de pacientes adultos que apresentam doença de pele⁽¹⁴²⁾.

Em 2014, o uso de MTX em crianças e adolescentes com DA foi analisado através de estudo retrospectivo em 31 pacientes com DA, menores de 18 anos de idade. Evidenciou-se que esta medicação foi efetiva em 75% dos doentes, demonstrando bom perfil de segurança e tolerabilidade. A duração média do tratamento entre os pacientes com boa resposta foi de 14 meses⁽¹⁴³⁾.

Em 2017, Dvorakova *et al.* observam, em estudo retrospectivo com 47 crianças em uso de MTX para DA grave, diminuição do escore de gravidade utilizado (IGA – *Investigator Global Assessment*, Avaliação Global do Investigador) e melhora da qualidade de vida, mensurada pelo CDLQI (*Children's Dermatology Life Quality Index*, índice de qualidade de vida para doenças de pele em crianças). A duração média do tratamento foi de 17,2 meses ⁽¹⁴⁴⁾.

Em 2017, Roekevisch *et al.* evidenciam que pacientes com dermatite atópica grave com mutações de perda de função da filagrina apresentam boa resposta ao uso de imunossupressor, porém inferior aos pacientes sem estas mutações identificadas ($p=0,02$). Foi utilizado metotrexato ou azatioprina por período de 24 semanas em estudo prospectivo controlado e randomizado. Foram identificadas mutações de perda de função da filagrina em 13 de 36 pacientes ⁽¹⁴⁵⁾.

Em 2018, em estudo retrospectivo realizado em hospital terciário em Toronto, Canadá, com 41 doentes adultos com DA moderada à grave, demonstra-se que o tratamento foi efetivo, com mais de 90% dos doentes com melhora superior a 75%. Evidencia-se, ainda, bom perfil de segurança com o uso prolongado do medicamento (duração média de 26 meses, com 80% dos doentes ainda em tratamento na última revisão para a publicação do estudo) ⁽¹⁴⁶⁾.

Em 2018, Delcasso *et al.* realizam estudo retrospectivo com 20 pacientes adultos com DA moderada a grave (85% com DA grave) em uso de metotrexato, com 94% deles já tendo feito tratamento prévio com fototerapia e/ou ciclosporina sistêmica. A dose inicial média de MTX foi de 21 ± 4 mg/semana, pela via subcutânea em 15 pacientes e pela via oral nos demais, combinado com tratamento tópico. MTX foi considerado efetivo e a melhora foi progressiva, com 50%, 63% e 75% dos pacientes com SCORAD 50 (50% de redução no escore SCORAD) após três, seis e 12 meses de tratamento. Quanto aos efeitos adversos observados, cinco pacientes relataram alterações clínicas, como náusea, fraqueza e cefaleia, e três pacientes apresentaram alterações laboratoriais, como linfopenia e alteração

hepática. A medicação foi suspensa em três dos 20 pacientes após um tempo médio de 26 meses de tratamento; em dois deles por náusea e/ou cefaleia associada à linfopenia e em um caso por alteração hepática grave ⁽¹⁴⁷⁾.

Em 2019, Taieb *et al.* demonstram que o metotrexato é efetivo e bem tolerado para o tratamento de crianças com dermatite atópica moderada a grave e refratária. Todos os pacientes apresentavam pouca resposta ao tratamento de primeira linha para DA e já haviam utilizado, pelo menos, uma opção de tratamento de segunda linha, como fototerapia ou imunossupressor sistêmico (ciclosporina, azatioprina ou micofenolato de mofetila). Foi realizado estudo multicêntrico e retrospectivo com 26 crianças e em 14 delas (53,85%) houve melhora clínica significativa. A mediana da duração do tratamento foi de 14 meses e a mediana do tempo de seguimento dos doentes foi de 25 meses ⁽¹⁴⁸⁾.

Em 2019, avaliou-se a resposta ao uso de metotrexato em 55 crianças com DA grave em estudo retrospectivo realizado na Filadélfia, nos EUA. 76,4% dos pacientes apresentaram melhora com o tratamento, demonstrada por redução significativa do escore de gravidade IGA após 6 a 9 meses de tratamento, com melhora adicional com manutenção do tratamento por 12 a 15 meses. Houve efeitos adversos leves em aproximadamente 50% dos pacientes ⁽¹⁴⁹⁾ (Quadro 1).

Em 2020, Drucker *et al.* publicam revisão sistemática e meta-análise, com o objetivo de avaliar a eficácia e a segurança dos tratamentos sistêmicos imunomoduladores para DA moderada a grave. Foram incluídos 39 estudos com 6.360 pacientes, avaliando 20 medicações e placebo. Observou-se que dupilumabe e ciclosporina parecem ser mais efetivos por período de até 16 semanas de tratamento, em comparação com metotrexato e azatioprina para pacientes adultos com dermatite atópica, porém com baixo nível de evidência para esta comparação. Os autores sugerem que mais estudos comparando diretamente estas medicações e por período de tempo mais prolongado são necessários ⁽¹⁵⁰⁾.

Em 2020, avaliou-se o efeito do tratamento de pacientes adultos com DA em biomarcadores possivelmente associados à resposta terapêutica. Participaram do estudo 38 pacientes com DA grave tratados com metotrexato (n=18) ou azatioprina (n=18). Avaliou-se o nível sérico, por meio da técnica de ELISA e Luminex, pré e após 12 semanas de tratamento, de: ligante indutor de proliferação, fator ativador de células B da família TNF, TARC, antagonista de receptor de IL-1 (IL1-RA), interleucina-1 Beta, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18, IL-31, TNF- α , IFN- γ , VEGF (*vascular endothelial growth fator*), monocina induzida por IFN- γ (*chemokine (C-X-C motif) ligand 9 – CXCL9*), proteína 10 induzida por IFN- γ (*chemokine ligand 10 – CXCL10*), proteína quimiotática de monócitos-1 (*chemokine (C-C Motif) ligand 2 – CCL2*) proteína inflamatória de macrófagos-1 β ou CCL4 (*chemokine (C-C motif) ligand 4*), CCL5 (*chemokine (C-C motif) ligand 5*), CTACK (*cutaneous T cell-attracting chemokine* ou *chemokine (C-C motif) ligand 27 – CCL27*), TSLP, IL-1 α e fator estimulador de colônias de granulócitos. Foram considerados respondedores pacientes com redução de pelo menos 50% no SCORAD. Houve redução significativa de TARC, CTACK, IL-13 e VEGF após o tratamento com as duas medicações, sendo estes considerados potenciais biomarcadores de resposta ao tratamento ⁽¹⁵¹⁾.

1.4.2 Estudos comparando o uso do metotrexato e da azatioprina na dermatite atópica

Em 2011, Schram *et al.* randomizam pacientes com DA para uso de MTX (10 a 22,5 mg/semana) ou azatioprina (1,5 a 2,5 mg/Kg/dia) por período de 12 semanas e posterior seguimento por mais 12 semanas, e observam eficácia semelhante de ambas as medicações no tratamento da doença. Houve redução do nível sérico de TARC após 12 semanas de tratamento nos dois grupos, sem diferença estatisticamente significativa entre eles. Não se observou diferença significativa de efeitos colaterais entre as medicações ⁽¹⁵²⁾.

Em 2018, Roekevisch *et al.* apresentam resultados sobre 35 pacientes adultos com DA grave, tratados com MTX ou azatioprina, em seguimento por dois anos, com dez pacientes ainda em uso de MTX e 11 de azatioprina ao final deste período. Observam que ambas as medicações são seguras e apresentam eficácia semelhante ⁽¹⁵³⁾.

Em 2018, Gerbens *et al.* avaliam o uso do metotrexato e da azatioprina para doentes adultos com DA moderada à grave, em fase aberta de ensaio clínico (estudo pragmático), a cada três meses, por cinco anos. Vinte e sete doentes completaram o estudo, com redução média do SCORAD semelhante entre os dois grupos no período (52,8% no grupo MTX e 53,8% no grupo azatioprina). Ambas as medicações demonstraram bom perfil de segurança ⁽¹⁵⁴⁾.

1.4.3 Estudos comparando o uso do metotrexato e da ciclosporina na dermatite atópica

Em 2013, publica-se comparação do uso de doses baixas de MTX e de ciclosporina em 40 crianças com DA grave e observa-se que ambas medicações são efetivas e seguras após 12 semanas de tratamento ⁽¹⁵⁵⁾. Entretanto, Tsakok e Flohr, em publicação posterior, ressaltam a falta de informações no estudo sobre cegamento dos pesquisadores e dos doentes e sobre se a análise foi feita por intenção de tratar, bem como a possibilidade de o estudo ter apresentado pouco poder estatístico pela amostra envolvida ser pequena ⁽¹⁵⁶⁾.

Em 2018, publicação apresenta estudo retrospectivo comparando MTX e ciclosporina para tratamento de pacientes com DA moderada a grave. O tempo de uso de MTX foi significativamente maior (23 meses) que o de ciclosporina (8 meses). Após a suspensão das medicações, a manutenção do controle da doença foi significativamente mais duradoura no grupo metotrexato (12 meses no grupo MTX versus dois meses no grupo ciclosporina) ⁽¹⁵⁷⁾.

Em 2018, Goujon *et al.* comparam, em estudo controlado e randomizado, uso de metotrexato e ciclosporina para adultos com DA

moderada a grave. Os autores concluem que metotrexato 15 mg/semana foi inferior à ciclosporina 2,5 mg/kg/dia na semana 8 do estudo. O aumento das doses de metotrexato para 25 mg/semana induziu melhora significativa em relação à ciclosporina 5 mg/Kg/dia na semana 20 ⁽¹⁵⁸⁾ (Quadro 1).

Quadro 1 - Estudos principais sobre o uso do metotrexato em doentes com dermatite atópica

Autor / ano	N de pacientes	Desenho do estudo	Achados
Goujon <i>et al.</i> / 2006 ⁽¹³⁹⁾	20	Retrospectivo, aberto	MTX 7,5 a 25 mg/semana eficaz e seguro no tratamento de pacientes adultos com DA
Weatherhead <i>et al.</i> / 2007 ⁽¹⁴⁰⁾	12	Prospectivo, aberto	Redução na atividade da DA em adultos em uso de MTX 10 a 22,5 mg/semana (dose média de 15mg/semana)
Zoller <i>et al.</i> / 2008 ⁽¹⁴¹⁾	9 6: DA 3: eczema idiopático	Retrospectivo	MTX 10 a 20 mg/semana eficaz no tratamento de adultos com DA refratária e doentes com eczema idiopático
Lyakhovitsky <i>et al.</i> / 2010 ⁽¹⁴²⁾	20	Retrospectivo	MTX 10 a 25 mg/semana para adultos com DA diminuiu atividade da doença e melhorou qualidade de vida
Schram <i>et al.</i> / 2011 ⁽¹⁵²⁾	42 20: MTX 22: azatioprina	Prospectivo, randomizado	MTX 10 a 22,5 mg/semana e azatioprina 1,5 a 2,5 mg/Kg/dia com eficácia semelhante para o tratamento da DA do adulto
El-Khalawany <i>et al.</i> / 2013 ⁽¹⁵⁵⁾	40 20: MTX 20: ciclosporina	Prospectivo, randomizado	MTX 7,5 mg/semana e ciclosporina 2,5 mg/Kg/dia com eficácia e segurança semelhantes no tratamento de crianças com DA
Deo <i>et al.</i> / 2014 ⁽¹⁴³⁾	31	Retrospectivo	MTX 5 a 15 mg/semana eficaz e seguro em crianças e adolescentes com DA
Dvorakova <i>et al.</i> / 2017 ⁽¹⁴⁴⁾	47	Retrospectivo	MTX na dose média de 0,34 mg/Kg foi efetivo e seguro no tratamento de DA grave em crianças, com melhoras no escore de gravidade e no índice de qualidade de vida
Roekevisch <i>et al.</i> / 2018 ⁽¹⁵³⁾	35 17: MTX 18: azatioprina	Prospectivo, observacional	MTX 22,5 mg/semana (dose máxima) e azatioprina 2,5 mg/Kg/dia (dose máxima) em adultos com DA grave demonstram efetividade e segurança semelhantes, em seguimento por dois anos
Law Ping Man <i>et al.</i> / 2018 ⁽¹⁵⁷⁾	56 31: MTX 25: ciclosporina	Retrospectivo	MTX (dose média máxima de $16 \pm 4,59$ mg/semana) e ciclosporina (dose média máxima de $3,6 \pm 1,25$ mg/Kg/dia) para adultos e adolescentes com DA moderada a grave. MTX utilizado por mais tempo e com efeito mais duradouro após suspensão

Continua

Quadro 1 - Estudos principais sobre o uso do metotrexato em doentes com dermatite atópica (conclusão)

Autor / ano	N de pacientes	Desenho do estudo	Achados
Goujon <i>et al.</i> / 2018 ⁽¹⁵⁸⁾	97 50: MTX (23 na semana 24) 47: ciclosporina (31 na semana 24)	Prospectivo, de não inferioridade, randomizado	MTX e ciclosporina para adultos com DA moderada a grave. MTX 15 mg/semana foi inferior à ciclosporina 2,5 mg/kg/dia na semana 8 do estudo. MTX 25 mg/semana induziu melhora clínica semelhante em relação à ciclosporina 5 mg/Kg/dia na semana 20
Shah <i>et al.</i> / 2018 ⁽¹⁴⁶⁾	41	Retrospectivo	MTX 10 a 25 mg/semana eficaz e seguro em adultos com DA moderada a grave, com uso prolongado (duração média do tratamento de 26 meses)
Gerbens <i>et al.</i> / 2018 ⁽¹⁵⁴⁾	27 (seguimento por cinco anos)	Prospectivo, observacional	MTX 10 a 22,5 mg/semana e azatioprina 2,5 mg/Kg/dia (dose máxima) com eficácia semelhante para o tratamento da DA do adulto, em estudo de cinco anos de seguimento
Delcasso <i>et al.</i> / 2018 ⁽¹⁴⁷⁾	20	Retrospectivo	MTX 21 ± 4 mg/semana (dose média inicial) foi efetivo para adultos com DA e observou-se melhora progressiva do escore SCORAD ao longo de 12 meses de tratamento. Três pacientes necessitaram suspender a medicação por efeitos adversos após tempo médio de 26 meses de tratamento
Taieb <i>et al.</i> / 2019 ⁽¹⁴⁸⁾	26	Retrospectivo e multicêntrico	MTX 0,25 a 0,6 mg/Kg/semana foi efetivo em 53,85% dos pacientes pediátricos com DA refratária aos tratamentos de primeira linha e a pelo menos um tratamento de segunda linha, como fototerapia ou imunossupressor
Anderson <i>et al.</i> / 2019 ⁽¹⁴⁹⁾	55	Retrospectivo	MTX 0,37 a 0,5 mg/Kg/semana (dose média) foi efetivo na maioria das crianças com DA grave tratadas. 50% delas apresentaram efeitos adversos leves à medicação

MTX: metotrexato; DA: dermatite atópica. SCORAD: SCOring Atopic Dermatitis.

Este estudo se justifica pela escassez de publicações evidenciando a ação do MTX nas manifestações clínicas dos pacientes com DA, sobretudo em estudos prospectivos, e no perfil de citocinas e quimiocinas envolvidas na resposta inflamatória observada nos doentes.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar o efeito do metotrexato nas manifestações clínicas e no perfil da expressão cutânea de citocinas e quimiocinas envolvidas no processo inflamatório da dermatite atópica nos pacientes adultos tratados com metotrexato por 24 semanas.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar nos pacientes com dermatite atópica em tratamento com metotrexato e, nos fragmentos de pele obtidos por biópsia, nos pacientes com dermatite atópica e nos controles:

- Escores de gravidade EASI (*Eczema Area and Severity Index*) e SCORAD (*SCORing Atopic Dermatitis*) na semana inicial, semana 12 e semana 24;
- Prurido, por meio de escala analógica visual de prurido na semana inicial, semana 12 e semana 24;
- Níveis séricos de IgE na semana inicial e semana 24 do estudo;
- Espessura epidérmica média nos fragmentos de pele obtidos por biópsia na semana inicial e na semana 24;
- Expressão de IL-31, IL-31RA, OSMR, TSLP e Ki67 nos fragmentos de pele obtidos por biópsia, pela técnica de imunoistoquímica, na semana inicial e na semana 24;

- Expressão de RNAm de IL-4, IL-6, IL-10, IL-31, IL-31RA, TNF- α , IFN- γ , TARC e CCL-22 nos fragmentos de pele obtidos por biópsia, pela técnica de reação de polimerase em cadeia em tempo real (*Real Time-PCR*, *Real-time polymerase chain reaction*), na semana inicial e na semana 24 do estudo.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Seleção de indivíduos

Os doentes de dermatite atópica foram selecionados a partir do ambulatório especializado em Dermatite Atópica da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HC-FMUSP). Após aprovação do estudo pela Comissão de Ética em Pesquisa do HC-FMUSP, foram selecionados doze doentes de DA (segundo os critérios maiores e menores de Hanifin e Rajka) ⁽¹⁹⁾, moderada ou grave, em uso de terapêutica convencional, sem medicação sistêmica e/ou tratamento com fototerapia e dez controles não-atópicos para análise da pele. Os controles não-atópicos foram selecionados entre indivíduos sem doenças inflamatórias e/ou imunossupressoras, sendo considerados aparentemente saudáveis. Os doentes forneceram consentimento livre e esclarecido documentado, ao assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), antes de qualquer procedimento relacionado ao estudo. O estudo foi registrado no *Clinical Trials.gov*, com a seguinte identificação: NCT03327116.

3.1.1 Critérios de inclusão de doentes com dermatite atópica

Os critérios de inclusão foram: a) pacientes com DA moderada a grave pelos escores EASI ($\geq 7,1$) e SCORAD (≥ 25); b) pacientes com idade mínima de 18 anos, quaisquer raça, gênero ou etnia; c) mulheres: sem potencial para engravidar, ou seja, na pós-menopausa ou com história clínica confirmada de esterilidade (ex.: uma mulher que não possui útero), ou com potencial para engravidar, contanto que haja teste de gravidez de sangue com resultado negativo confirmado, antes do tratamento do estudo, para descartar gravidez; d) mulheres com potencial para engravidar devem estar dispostas a utilizar método de contracepção eficaz desde a entrada no estudo até quatro meses após a suspensão do MTX. Método de contracepção eficaz é definido como: contraceptivos orais / implantáveis /

injetáveis / transdérmicos / anel vaginal estrogênico, dispositivo intrauterino, preservativo com espermicida, diafragma com espermicida. Abstinência ou vasectomia do parceiro é aceitável, caso a mulher concorde em utilizar um dos outros métodos aceitáveis de contracepção, caso seu parceiro mude; e) homens com atividade sexual durante o tratamento devem ser orientados a utilizar preservativo, se com atividade sexual durante o tratamento com MTX e até três meses após a suspensão da medicação.

3.1.2 Critérios de exclusão de doentes

Os critérios de exclusão foram: a) mulher grávida ou em período de amamentação; b) homens com desejo de engravidar sua parceira no período do estudo; c) paciente com insuficiência hepática e/ou renal; d) paciente com úlcera péptica em atividade; e) paciente com leucopenia, plaquetopenia e/ou anemia; f) paciente com infecção ativa; g) paciente em uso de medicação hepatotóxica concomitante; h) infecção pelo HIV ou outra condição de imunossupressão; i) paciente com ingestão excessiva de álcool; j) paciente com dificuldade de compreensão para uso da medicação; k) sensibilidade ou alergia conhecida ao MTX; l) tratamento/terapia com luz ultravioleta A (UVA) ou luz ultravioleta B (UVB), corticosteroide por via sistêmica, ciclosporina, imunobiológico, azatioprina ou outra medicação imunossupressora em até 12 semanas antes da introdução do MTX.

3.2 Desenho do estudo

Foi realizado estudo prospectivo aberto. Uma vez selecionados, os pacientes iniciaram o tratamento com MTX, segundo o protocolo. Antes de iniciar o tratamento, foram solicitados os seguintes exames: hemograma completo, ureia, creatinina, TGO (transglutaminase glutâmica oxalacética), TGP (transglutaminase glutâmica pirúvica), fosfatase alcalina, gama-GT, bilirrubinas totais e frações, proteínas totais e frações, sorologias para hepatites A, B e C, HIV (vírus da imunodeficiência humana), IgE sérica, urina tipo I, β hCG (gonadotrofina coriônica humana beta) se mulher em idade fértil

e radiografia de tórax. Foi também realizada anamnese detalhada para afastar a possibilidade de tuberculose, uma vez que o exame de PPD (*purified protein derivative*, teste tuberculínico) estava, em âmbito mundial, indisponível no período de recrutamento de doentes para o estudo.

Durante todo o tratamento, os pacientes mantiveram as medicações tópicas em uso para o tratamento da DA, como corticoides tópicos, inibidores da calcineurina tópicos e emolientes, e os anti-histamínicos por via oral, da mesma forma que foi realizado em outros estudos prospectivos que avaliaram o uso do metotrexato em pacientes com DA ^(140, 148, 152-154).

Foram utilizados, como controles não-atópicos, amostras de pele de indivíduos voluntários e aparentemente saudáveis, pareados por gênero e idade.

3.3 Regime de administração do metotrexato

Foi realizada introdução de 7,5 mg/semana, por via oral, à noite, na semana inicial de tratamento e posterior coleta de hemograma completo após 5 a 7 dias (semana 2). Se o resultado do exame fosse normal, a dose era aumentada para 15 mg/semana, por via oral, dividida em duas tomadas, sendo 7,5 mg a cada 12 horas.

Após o primeiro mês de uso, na semana 4, foram realizados hemograma completo, TGO, TGP, fosfatase alcalina, gama-GT, bilirrubinas totais e frações. Na semana 8, semana 16 e semana 24, foram solicitados hemograma completo, TGO, TGP, fosfatase alcalina, gama-GT, bilirrubinas totais e frações, ureia e creatinina. Na semana 24, foram também solicitadas proteínas totais e frações e IgE sérica. Foi realizada dosagem de β hCG em todas as visitas, sempre que indicado (mulher em idade fértil).

Foi associado ácido fólico 5 mg/dia 1 x semana, 48 a 72 horas após a ingestão do metotrexato.

Ambas as medicações são padronizadas pela Divisão de Farmácia do HC-FMUSP.

3.4 Avaliação dos escores de gravidade

A avaliação dos escores de gravidade EASI (Anexo 3) e SCORAD (Anexo 4) foi realizada na semana inicial, semana 12 e semana 24 do estudo, sempre pelo mesmo avaliador.

3.5 Avaliação do prurido

O prurido foi avaliado por meio da aplicação de escala analógica visual (VAS – *visual analogue scale*) para prurido ⁽¹⁵⁹⁾, constituída por uma linha de 10 cm, marcada com os números 0 e 10 (Figura 3), em que o paciente assinala a sua nota para o prurido. Esta escala foi aplicada na semana inicial, semana 12 e na semana 24 do protocolo, sempre pelo mesmo avaliador.

Figura 3 - Ilustração da escala analógica e visual de prurido, utilizada para avaliar o prurido dos pacientes com dermatite atópica

3.6 Fotografias do quadro clínico dos pacientes com dermatite atópica

Foram realizadas fotografias dos doentes na semana inicial, semana 12 e semana 24 do protocolo, de forma padronizada.

3.7 Cronograma de visitas dos pacientes

Os pacientes em uso de metotrexato compareceram a sete visitas, ao longo de 24 semanas, nas semanas inicial, 2, 4, 8, 12, 16 e 24. Em todas as

visitas, exceto na semana 12, foi realizada coleta de sangue para análises do estudo e/ou para monitorização dos possíveis efeitos colaterais relacionados ao tratamento. Na semana inicial e semana 24, foram coletadas biópsias de pele para o estudo (Quadro 2).

Quadro 2 - Cronograma de visitas e procedimentos para os pacientes com dermatite atópica participantes do estudo

	Dose do MTX (mg/sem)	Avaliação dos escores de gravidade e prurido	Fotografia clínica	Coleta de sangue	Biópsia de pele
Semana inicial	7,5	x	x	x	x
Semana 2	15			x	
Semana 4	15			x	
Semana 8	15			x	
Semana 12	15	x	x		
Semana 16	15			x	
Semana 24	15	x	x	x	x

MTX: metotrexato.

Em todas as visitas, os pacientes foram questionados sobre possíveis complicações e/ou intercorrências desde a visita anterior. Foi considerada complicação qualquer alteração que o paciente apresentasse, clínica ou laboratorial, relacionadas ou não à dermatite atópica e possivelmente relacionadas ou não ao uso do metotrexato.

Durante o protocolo, os pacientes foram orientados a não utilizar, se possível, outras medicações que pudessem interferir nas avaliações do estudo, como corticosteroide por via sistêmica (oral ou injetável).

3.8 Dosagem sérica de IgE

A dosagem de IgE foi realizada na Divisão de Laboratório Central – HC-FMUSP, utilizando-se o método de nefelometria. Foi avaliada nos

indivíduos em uso de MTX na semana inicial e semana 24 do estudo. Foram considerados níveis normais até 100 UI/mL.

3.9 Cronograma e obtenção dos fragmentos de pele

Os fragmentos cutâneos dos doentes atópicos foram coletados através de biópsias por *punch* quatro milímetros na semana inicial e biópsias por *punch* quatro milímetros na semana 24, sob anestesia local com lidocaína 1% com vasoconstritor e, posteriormente, suturadas com fio mononylon 4-0. As biópsias foram realizadas em área com lesão e em área sem lesão clínica aparente, com pelo menos cinco centímetros de distância da lesão clínica mais próxima. Para a biópsia da área com lesão, foi selecionada região corporal não foto-exposta, sobretudo no dorso inferior, e lesão com maior atividade da doença no local.

Amostras de pele de controles não-atópicos foram coletadas de voluntários para fins de padronização das análises laboratoriais e foram obtidas pela mesma técnica realizada nos doentes atópicos e em região corporal semelhante, tendo sido feita a biópsia em pele sã.

As amostras coletadas foram divididas ao meio, sendo uma metade fixada em formol a 10% e processada segundo a rotina, embebida em parafina e analisada por imunoistoquímica para determinar a expressão de IL-31, IL-31RA, OSMR, TSLP e Ki67 (marcador de proliferação celular); a outra metade foi armazenada em RNA*later* e congelada a -80° para realização de *Real Time*-PCR.

3.10 Reação imunoistoquímica

Para demonstração da expressão de IL-31, IL-31RA, OSMR, TSLP e Ki67 nos espécimes de pacientes com DA e no grupo controle, foi utilizada a técnica de imunoistoquímica.

Cortes histológicos de quatro micrômetros de espessura foram obtidos a partir de material embebido em parafina e coletados em lâminas

previamente preparadas com solução adesiva de 3-amino-propyltriethoxy-silane (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO/USA, cód. A3648) a 2%.

A seguir, os cortes histológicos foram desparafinizados em dois banhos de xilol de 20 e 10 minutos, respectivamente, à temperatura ambiente. Posteriormente, foram hidratados em bateria decrescente de etanol (100%, 95% e 70%) e foi realizada lavagem em água corrente, durante cinco minutos cada.

O bloqueio de peroxidase endógena foi feito em câmara escura com três incubações em água oxigenada a 3% por dez minutos cada.

Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente durante cinco minutos e submetidas a tratamento para exposição dos sítios antigênicos em calor úmido. A exposição foi feita em banho-maria a 95°C. As lâminas utilizadas para identificação de IL-31, Ki-67, OSMR e TSLP foram imersas na solução *Target Retrieval Solution* pH 9,0 (cód. S2367, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA), por 20 minutos. Da mesma maneira, as lâminas separadas para a IL-31RA também foram colocadas na mesma solução, mas por período de 25 minutos.

As lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada por cinco minutos cada e submersas em solução salina tamponada (PBS) pH 7,4. A seguir, foi feito bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido com incubação em solução de leite desnatado (Molico, Nestlé®) a 10%, durante 30 minutos, à temperatura ambiente.

As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários (Quadro 3) diluídos em BSA fração V (SERVA 1930) 1%, acrescida de azida sódica 0,1% em tampão PBS pH 7,4, *overnight* a 4°C.

Quadro 3 - Especificações dos anticorpos utilizados para reação imunoistoquímica, incluindo informações sobre diluição e controle positivo utilizados

Anticorpo	Diluição	Código	Marca	Controle positivo
IL-31	1:6	MAB28241	R&D Systems	DA
IL-31RA	1:10	AF-2769	R&D Systems	DA
OSMR	1:50	10982-1-AP	Proteintech	DA
TSLP	1:200	sc-33791	Santa Cruz	Próstata
Ki-67	1:200	275R-15	Cell Marque	Amígdala

DA: dermatite atópica.

Após o procedimento de lavagem das lâminas por duas vezes em tampão PBS pH 7,4 durante cinco minutos cada, procedeu-se à incubação com o anticorpo pós-primário (*Novolink Max Polymer Detection System*, cód. K0690, Leica Microsystems, Newcastle Upon Tine, UK) pronto para uso, em câmara úmida, durante 30 minutos, à temperatura ambiente.

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

As lâminas foram lavadas em água corrente por cinco minutos, contra-coradas com Hematoxilina de Carazzi por 20 segundos. A seguir, foram lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente.

A montagem das lâminas foi feita com resina *Permount* (FISHER Scientific, Fair Lawn, NJ/USA, cód. SP15-100).

3.10.1 Análise das lâminas

Depois de coradas, as lâminas foram escaneadas, através do escâner de lâminas *Pannoramic Scan – 3Dhistech* (3DHistech Ltd., Budapest, Hungary).

As fotos foram analisadas com a utilização do programa *Image-Pro Plus*, versão 4.5.0.29 para Windows (Media Cybernetics Inc., Bethesda,

Maryland, USA) ⁽¹⁶⁰⁾, tanto para avaliar as marcações imunoistoquímicas, quanto para avaliar a espessura epidérmica média.

Para a identificação da espessura epidérmica média, foram traçadas duas linhas, uma na parte superior da epiderme e outra na parte inferior da epiderme, acompanhando a membrana basal, e, a partir destas duas marcações, foi obtida a distância média entre estas duas linhas, por meio da função *average distance* do programa *Image-Pro-Plus*. Esta função mede a distância ponto a ponto entre duas linhas, a cada variação de ângulo, gerando um valor médio (*average distance*) entre elas, caracterizando, desta forma, a espessura epidérmica média.

Considerando o padrão da expressão dos marcadores selecionados na pele dos atópicos, foram avaliadas, individualmente, duas regiões: epiderme e derme superficial. Foi definida como derme superficial a região 500 µm abaixo das cristas epidérmicas.

O parâmetro avaliado na epiderme foi a relação entre a área positiva (marcada pelo anticorpo) e o comprimento da membrana basal. Na derme superficial, foi avaliada a relação entre a área positiva e a área total. No caso do anticorpo anti-Ki-67, avaliou-se o número de células positivas e não a área positiva.

3.11 Expressão de RNAm de citocinas por *Real Time-PCR*

A análise da expressão de RNAm por *Real Time-PCR* foi realizada com amostras de pele que foram obtidas dos doentes e dos controles, armazenadas em solução de RNA*later* (Sigma, Steinheim, Alemanha) e congeladas a -80°C. O RNA total dos fragmentos de pele mantidos em solução de RNA*later* (Sigma, Steinheim, Alemanha) foi extraído com o *RNeasy Plus Mini Kit* (Qiagen, Valencia, CA, EUA), seguindo as orientações fornecidas pelo fabricante. O cDNA foi sintetizado, utilizando-se o *kit cDNA ISCRIP*T (Bio-rad, Hercules, CA, EUA).

Para a realização da reação de amplificação em tempo real, foi utilizada, no termociclador *Applied Biosystem 7500* (Qiagen, Valencia, CA,

EUA), para cada amostra: 5 µL de cDNA (30 ng/µL), 7 µL da solução SYBR®Green (Applied Biosystem) e 2µL (10 µM) dos *primers sense* e *anti-sense*. A síntese dos iniciadores *sense* e *anti-sense* para IL-4, IL-6, IL-10, IL-31, IL-31RA, TNF-α, IFN-γ, TARC, CCL-22 e dos controles internos GAPDH (*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*) foi realizada pela Invitrogen (Carlsbad, CA).

Os dados obtidos foram interpretados com o programa 7500 e os resultados foram normalizados.

As sequências dos iniciadores utilizados estão descritas no Quadro 4.

Quadro 4 - Pannel de iniciadores utilizados para *Real Time-PCR*

Primer	Sequência
IL-4	F (5'-CCAACGTACTCTGGTTGGCT-3') R (5'-GCACCGAGTTGACCGTAACA-3')
IL-6	F (5'-CCTGAGAAAGGAGACATGTAA-3') R (5'-GGC AAG TCT CCTCATTGAATCC-3')
IL-10	F (5'-GGCAAGTCTCCTCATTGAATCC-3') R (5'-ACATCAAGGCGCATGTGAAC-3')
IL-31	F (5'-GCAATGGCAGCATGGTATGG-3') R (5'-CTGCACAGTACATGCCAGCT-3')
IL-31RA	F (5'-CTCCCCAGCCTTCATGTGTT-3') R (5'-ATTTGCAGAGTGAGGGGAGC-3')
TNF-α	F (5'-CCCAGGCAGTCAGATCATCTTC-3') R (5'-GCTTGAGGGTTTGCTACAACAT-3')
IFN-γ	F (5'-TGTCGCCAGCAGCTAAAACA-3') R (5'-TGCAGGCAGGACAACCATTA-3')
TARC	F (5'-TCCCCTTAGAAAGCTGAAGAC-3') R (5'-ACTGCATTCTTCACTCTCTTG-3')
CCL-22	F (5'-TTGGAGGAGGCCATT TCA-3') R (5'-CACTCCCCACACTTTCAAC-3')
GAPDH	F (5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGT-3') R (5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3')

Os resultados foram expressos como expressão relativa ($2^{-\Delta CT}$)⁽¹⁶¹⁾.

3.12 Fluxograma das análises laboratoriais do estudo

DA: dermatite atópica; IHQ: técnica de imunoistoquímica.

Figura 4 - Fluxograma das análises laboratoriais do estudo

3.13 Análise e correlação dos parâmetros

Os dados foram armazenados e organizados no software *Excel® for Windows* e, posteriormente, importados para o software *SPSS®23 for MAC*.

Os dados categóricos foram descritos pela sua frequência de ocorrência e sua respectiva proporção (%). Quando submetidos à inferência na comparação de grupos, foram utilizados os testes qui-quadrado ou teste de Spearman.

Os dados contínuos foram descritos pela sua média e seu respectivo desvio padrão. Para estatística inferencial, todos os dados foram submetidos

a teste de distribuição pelo teste de Shapiro-Wilk. Para dados pareados, na comparação pré-tratamento com metotrexato versus pós-tratamento, foi utilizado o teste não-paramétrico de Wilcoxon e, para dados independentes, foi utilizado o teste de Mann-Whitney ou o teste t de Student paramétrico.

Todas as correlações gráficas foram executadas com o auxílio do software *GraphPad Prisma versão 6.0*.

Foi aceito como diferença estatisticamente significativa quando o erro do tipo I foi menor ou igual a 5%.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Características demográficas dos pacientes e dos controles não-atópicos

Dos 12 adultos com DA, seis eram mulheres. A média de idade dos doentes foi de 26,8 anos (intervalo de 18 a 39 anos), com desvio padrão de $\pm 6,5$.

Dos dez controles não-atópicos, cinco eram mulheres. A média de idade dos controles foi de 30,0 anos (intervalo de 27 a 39 anos), com desvio padrão de $\pm 3,5$.

Análise estatística demonstrou que os grupos eram semelhantes entre si, considerando a idade dos indivíduos ($p = 0,273$). Os grupos também eram semelhantes, comparando-se o gênero dos indivíduos, uma vez que possuíam igual número de ambos os gêneros.

4.2 Avaliação dos pacientes com dermatite atópica

Referente ao padrão de lesão, alguns pacientes apresentavam mais de um tipo associado e classificamos os padrões em prurigoide, eritrodérmico e numular. Observamos 75% ($n = 9 / 12$) com lesões prurigoides, 25% ($n = 3 / 12$) eritrodérmicos e 33,3% ($n = 4 / 12$) apresentavam lesões numulares (Figura 5).

Figura 5 - Padrões de lesão predominantes observados entre os pacientes com dermatite atópica incluídos no estudo. **A.** Padrão prurigoide, em que se observam lesões pápulo-nodulares e liquenificação intensa. **B.** Padrão eritrodérmico, em que há eritema e descamação em mais de 90% da superfície corpórea do paciente, de evolução crônica. **C.** Padrão numular, em que se observam, sobretudo, placas arredondadas com eritema, crostas e liquenificação

Sobre os antecedentes pessoais de doenças atópicas, incluindo asma e rinite alérgica, 75% ($n = 9 / 12$) apresentavam história de asma e 83,3% ($n = 10 / 12$) de rinite alérgica.

Como antecedentes familiares de atopia em familiares de primeiro grau, 33,3% ($n = 4 / 12$) apresentavam familiares com asma, 75% ($n = 9 / 12$) com rinite alérgica e 33,3% ($n = 4 / 12$) com dermatite atópica.

A média de idade de início da DA entre os doentes foi de 5,9 anos (mínima de 0,3 e máxima de 19 anos), com desvio padrão de $\pm 7,6$.

Sobre a história de infecções prévias, 100% (n = 12 / 12) dos pacientes informavam infecções bacterianas cutâneas prévias, com necessidade de uso de antibiótico por via sistêmica, 58,3% (n = 7 / 12) informavam história positiva para infecções virais, com antecedente de infecção por HSV (vírus do herpes simples) – herpes simples / erupção variceliforme de Kaposi (n = 6 / 12), condiloma acuminado (n = 1 / 12), verruga vulgar (n = 1 / 12) e molusco contagioso (n = 2 / 12).

Um doente (8,33%, n = 1 / 12) apresentava outra comorbidade, além das doenças atópicas, sendo esta o transtorno de ansiedade generalizada (n = 1 / 12).

Oito doentes (66,7%, n = 8 / 12) foram internados previamente por exacerbação da DA, com média de internações de 1,4 (mínimo de 0 e máximo de 5), com desvio padrão de $\pm 1,5$ (Tabela 1).

Quanto às medicações em uso, 100% (n = 12 / 12) utilizavam valerato de betametasona tópico nas lesões do corpo, 41,7% (n = 5 / 12) utilizavam acetato de hidrocortisona tópico nas lesões da face, 25% (n = 3 / 12) aplicavam tacrolimo tópico nas lesões da face, 100% (n = 12 / 12) utilizavam cremes emolientes (*cold cream* e/ou creme lanette), 83,3% (n = 10 / 12) faziam uso de clorfeniramina por via oral, nas doses de 4 a 12 mg por dia e 66,7% (n = 8 / 12) de hidroxizine por via oral, nas doses de 10 a 60 mg por dia.

Tabela 1 - Dados demográficos, padrão de lesão, antecedentes pessoais, história de infecções prévias, comorbidades e hospitalização prévia dos doentes com dermatite atópica

Pacientes	n = 12
Gênero (homens/mulheres)	6/6
Idade (anos)	18-39
Média de idade ($\pm$ DP)	26,8 ($\pm$ 6,5)
Média da idade de início da DA, anos ($\pm$ DP)	5,9 ($\pm$ 7,6)
Padrão de lesão	Prurigoide – n = 9 Eritrodermia – n = 3 Numular – n = 4
Somente DA	n = 0
DA e asma	n = 2
DA e rinite alérgica	n = 3
DA, asma e rinite alérgica	n = 7
História de infecção bacteriana	n = 12
História de infecção viral	n = 7
Comorbidades não-atópicas	n = 1
Internações - n, média de internações ($\pm$ DP)	n = 8, 1,4 ($\pm$ 1,5)

N: tamanho da amostra. DA: dermatite atópica. DP: desvio padrão.

4.3 Complicações apresentadas pelos doentes com dermatite atópica durante o tratamento com metotrexato

Onze pacientes (91,7%, $n = 11 / 12$) apresentaram complicações durante o tratamento com MTX, com média de 1,7 (mínimo de 0 e máximo de 4) e desvio padrão de $\pm 1,3$. Nenhuma delas foi considerada grave e nenhum paciente precisou interromper o tratamento.

Dentre as complicações possivelmente relacionadas ao uso do MTX, foram observados, em três pacientes ($n = 3 / 12$), aumento transitório de transaminase glutâmica pirúvica (TGP), sendo $< 30\%$ em dois pacientes ($n = 2 / 12$) e $< 50\%$ em uma paciente ($n = 1 / 12$), náuseas no dia do uso do MTX em dois pacientes ($n = 2 / 12$), com melhora após orientação de ingestão da medicação junto aos alimentos, e epigastralgia transitória ($n = 1 / 12$).

Outras complicações reportadas e/ou observadas foram: faringite de origem bacteriana ($n = 1 / 12$); candidíase vaginal ($n = 1 / 12$); furunculose ($n = 1 / 12$); infecção bacteriana na ferida operatória após a realização da biópsia cutânea na semana inicial ($n = 1 / 12$); piodermite ($n = 3 / 12$) - incluindo impetiginização das lesões cutâneas ($n = 2 / 12$) e erisipela ($n = 1 / 12$); broncopneumonia não complicada ($n = 2 / 12$); herpes simples ($n = 1 / 12$); infecção viral de vias áreas superiores ($n = 1 / 12$); exacerbação de asma ($n = 1 / 12$), tratada somente com inalações; plaquetose ($n = 1 / 12$) e problemas emocionais ($n = 2 / 12$).

4.4 Escores de gravidade nos pacientes com dermatite atópica

Foram analisados os escores EASI e SCORAD.

4.4.1 EASI

A média de EASI inicial dos pacientes foi de 28,9 (mínimo de 14,7 e máximo de 46,0), com desvio padrão de $\pm 9,9$. A média de EASI na semana 12 do protocolo foi de 16,5 (mínimo de 3,2 e máximo de 36,4), com desvio padrão de $\pm 10,9$. A média de EASI na semana 24 do protocolo foi de 15,4 (mínimo de 6,0 e máximo de 33,1), com desvio padrão de $\pm 10,5$.

Análise estatística demonstrou que a diferença foi estatisticamente significativa entre o EASI na semana 12 e na semana inicial ($p = 0,006$) e entre o EASI na semana 24 e na semana inicial ($p = 0,006$), mas não houve diferença significativa entre o EASI na semana 24 e na semana 12 ($p = 1,0$) (Figura 6).

A média de redução do EASI, após 24 semanas de uso da medicação, foi de 46,7%.

EASI: Eczema Area Severity Index. ** $p < 0,01$.

Figura 6 - Evolução do escore EASI nos pacientes com dermatite atópica durante o tratamento com metotrexato, avaliado na semana inicial, semana 12 e semana 24. Houve redução significativa do EASI após 12 semanas e após 24 semanas de tratamento, em relação à semana inicial

4.4.2 SCORAD

A média de SCORAD inicial dos pacientes foi de 57,2 (mínimo de 47,1 e máximo de 68,8), com desvio padrão de $\pm 7,8$. A média de SCORAD na semana 12 do protocolo foi de 39,5 (mínimo de 24,0 e máximo de 65,8), com desvio padrão de $\pm 12,1$. A média de SCORAD na semana 24 do protocolo foi de 38,0 (mínimo de 19,6 e máximo de 57,7), com desvio padrão de $\pm 12,7$.

Análise estatística demonstrou que a diferença foi estatisticamente significativa entre o SCORAD na semana 12 e na semana inicial ($p < 0,001$) e entre o SCORAD na semana 24 e na semana inicial ($p < 0,001$), mas não houve diferença significativa entre o SCORAD na semana 24 e na semana 12 ($p = 1,0$) (Figura 7).

A média de redução do SCORAD, após 24 semanas de uso da medicação, foi de 33,6%.

SCORAD (SCORing Atopic Dermatitis). *** $p < 0,001$.

Figura 7 - Evolução do escore SCORAD nos pacientes com dermatite atópica durante o tratamento com metotrexato, avaliado na semana inicial, semana 12 e semana 24. Houve redução significativa do SCORAD após 12 semanas e após 24 semanas de tratamento, em relação à semana inicial

4.5 Avaliação do prurido nos pacientes com dermatite atópica

A média do prurido inicial dos pacientes foi de 6,9 (mínimo de 4,0 e máximo de 10,0), com desvio padrão de $\pm 2,2$. A média de prurido na semana 12 do protocolo foi de 4,4 (mínimo de 0,0 e máximo de 8,0), com desvio padrão de $\pm 2,1$. A média do prurido na semana 24 do protocolo foi de 4,2 (mínimo de 0,0 e máximo de 8,0), com desvio padrão de $\pm 2,1$.

Análise estatística demonstrou que a diferença foi estatisticamente significativa entre o prurido na semana 12 e na semana inicial ($p = 0,006$) e entre o prurido na semana 24 e na semana inicial ($p = 0,028$), mas não houve diferença significativa entre o prurido na semana 24 e na semana 12 ($p = 1,0$) (Figura 8).

A média de redução do prurido, após 24 semanas de uso do MTX, foi de 39,1%.

* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Figura 8 - Evolução do prurido (VAS – *visual analogue scale*) nos pacientes com dermatite atópica durante o tratamento com metotrexato, avaliado na semana inicial, semana 12 e semana 24. Houve redução significativa do prurido após 12 semanas e após 24 semanas de tratamento, em relação à semana inicial

4.6 Apresentação fotográfica do quadro clínico dos pacientes com dermatite atópica

Todos os pacientes foram fotografados nas visitas da semana inicial, semana 12 e semana 24 do protocolo.

Algumas dessas fotografias, ilustrando a evolução dos pacientes ao longo do tratamento, são apresentadas a seguir, correlacionando-as com os achados de EASI e SCORAD de cada doente (Figuras 9 a 12).

Figura 9 - Paciente do protocolo com dermatite atópica, com lesões de padrão numular e prurigoide. **A.** Fotos da semana inicial; EASI (*Eczema Area and Severity Index*) = 18,7 e SCORAD (*SCORing Atopic Dermatitis*) = 47,1. **B.** Fotos da semana 12 de tratamento com metotrexato; EASI = 7,2 e SCORAD = 32,6. **C.** Fotos da semana 24 de tratamento com metotrexato; EASI = 6,8 e SCORAD = 31,7

Figura 10 - Paciente do protocolo com dermatite atópica, com quadro de eritrodermia. **A.** Fotos da semana inicial; EASI (*Eczema Area and Severity Index*) = 32,4 e SCORAD (*SCOring Atopic Dermatitis*) = 56,2. **B.** Fotos da semana 12 de tratamento com metotrexato; EASI = 12,2 e SCORAD = 45,1. **C.** Fotos da semana 24 de tratamento com metotrexato; EASI = 14,3 e SCORAD = 40,9

Figura 11 - Paciente do protocolo com dermatite atópica, com lesões de padrão prurigoide. **A.** Fotos da semana inicial; EASI (*Eczema Area and Severity Index*) = 18,4 e SCORAD (*SCOring Atopic Dermatitis*) = 49,6. **B.** Fotos da semana 12 de tratamento com metotrexato; EASI = 9,8 e SCORAD = 34,3. **C.** Fotos da semana 24 de tratamento com metotrexato; EASI = 6,0 e SCORAD = 21,9

Figura 12 - Paciente do protocolo com dermatite atópica, com lesões de padrão numular. **A.** Fotos da semana inicial; EASI (*Eczema Area and Severity Index*) = 14,7 e SCORAD (*SCOring Atopic Dermatitis*) = 53,8. **B.** Fotos da semana 12 de tratamento com metotrexato; EASI = 11,4 e SCORAD = 38,5. **C.** Fotos da semana 24 de tratamento com metotrexato; EASI = 7,4 e SCORAD = 37,4

4.7 Avaliação da IgE sérica nos pacientes com dermatite atópica

Entre os 12 pacientes com DA acompanhados e tratados com metotrexato, três não apresentaram redução nos níveis séricos de IgE. Trata-se de pacientes que apresentaram redução menos expressiva dos escores de gravidade ao longo do tratamento, sendo que dois deles relataram problemas emocionais mais relevantes durante o seguimento.

A média de IgE sérica inicial dos pacientes foi de 22.966,0 UI/ml (mínimo de 2.161 e máximo de 50.000 UI/ml), com desvio padrão de $\pm 16.060,9$. A média de IgE sérica na semana 24 do protocolo foi de 11.834,2 UI/ml (mínimo de 2.484 e máximo de 25.313 UI/ml), com desvio padrão de $\pm 10.150,9$.

Análise estatística demonstrou que a diferença foi estatisticamente significativa entre a IgE sérica na semana 24 e na semana inicial ($p = 0,034$) (Figura 9).

* $p < 0,05$.

Figura 13 - Evolução da IgE sérica nos pacientes com dermatite atópica durante o tratamento com metotrexato, avaliada na semana inicial e semana 24. Houve redução significativa da IgE sérica após 24 semanas de tratamento

4.8 Análise da espessura epidérmica

A análise da espessura epidérmica foi realizada, comparando-se diferentes situações, sendo apresentada a seguir:

4.8.1 Comparação entre a pele com lesão do paciente com dermatite atópica pré-tratamento com metotrexato e a pele controle não-atópica

A mediana da espessura epidérmica média na pele com lesão nos pacientes com dermatite atópica pré-tratamento com MTX foi de 127,6 μm ($n = 12$), com DIQ (diferença interquartil) = 194,3. A mediana da espessura epidérmica média na pele controle não-atópica foi de 48,3 μm ($n = 10$), com DIQ = 14,7. **A espessura epidérmica média foi significativamente menor no grupo controle** (diferença mediana = 79,4 μm , IC (intervalo de confiança) 95% = 49,5 a 233,5), com $p < 0,001$ (Figura 14).

*** $p < 0,001$.

Figura 14 - Espessura epidérmica média (μm), comparando-se a pele dos controles não-atópicos com a pele com lesão dos pacientes com dermatite atópica (DA) pré-tratamento com metotrexato (MTX). A espessura epidérmica média foi significativamente menor no grupo controle

4.8.2 Comparação entre a pele sem lesão do paciente com dermatite atópica pré-tratamento com metotrexato e a pele com lesão do paciente com dermatite atópica pré-tratamento com metotrexato

A mediana da espessura epidérmica média na pele sem lesão nos pacientes com dermatite atópica pré-tratamento com MTX foi de 48,9 μm ($n = 12$), com DIQ = 41,4. A mediana da espessura epidérmica média na pele com lesão nos pacientes com dermatite atópica pré-tratamento foi de 127,6 μm ($n = 12$), com DIQ = 98,0. **A espessura epidérmica média foi significativamente menor na pele sem lesão** (diferença mediana = 74,5 μm , IC 95% = 42,1 a 96,0), com $p < 0,001$ (Figura 15).

*** $p < 0,001$.

Figura 15 - Espessura epidérmica média (μm), comparando-se a pele dos pacientes com dermatite atópica (DA) sem lesão pré-tratamento com metotrexato (MTX) com a pele com lesão dos pacientes com dermatite atópica pré-tratamento. A espessura epidérmica média foi significativamente menor na pele sem lesão

4.8.3 Comparação entre a pele sem lesão do paciente com dermatite atópica pós-tratamento com metotrexato e a pele com lesão do paciente com dermatite atópica pós-tratamento com metotrexato

A mediana da espessura epidérmica média na pele sem lesão nos pacientes com dermatite atópica pós-tratamento com MTX foi de 44,4 μm ($n = 12$), com DIQ = 33,6. A mediana da espessura epidérmica média na pele com lesão nos pacientes com dermatite atópica pós-tratamento foi de 100,3 μm ($n = 12$), com DIQ = 80,7. **A espessura epidérmica média foi significativamente menor na pele sem lesão** (diferença mediana = 52,6 μm , IC 95% = 26,8 a 90,5), com $p = 0,021$ (Figura 16).

* $p < 0,05$.

Figura 16 - Espessura epidérmica média (μm), comparando-se a pele sem lesão do paciente com dermatite atópica (DA) pós-tratamento com metotrexato (MTX) e a pele com lesão do paciente com dermatite atópica pós-tratamento com metotrexato. A espessura epidérmica média foi significativamente menor na pele sem lesão

4.8.4 Comparação entre a pele com lesão do paciente com dermatite atópica pré-tratamento com metotrexato e a pele com lesão do paciente com dermatite atópica pós-tratamento com metotrexato

A mediana da espessura epidérmica média na pele com lesão nos pacientes com dermatite atópica pré-tratamento foi de 127,6 μm ($n = 12$), com DIQ = 194,3. A mediana da espessura epidérmica média na pele com lesão nos pacientes com dermatite atópica pós-tratamento com MTX foi de 100,3 μm ($n = 12$), com DIQ = 80,7. **A espessura epidérmica média foi significativamente menor na pele lesada pós-tratamento** (diferença mediana = 31,3 μm , IC 95% = 15,0 a 92,7), com $p = 0,021$ (Figura 17).

* $p < 0,05$.

Figura 17 - Espessura epidérmica média (μm), comparando-se a pele com lesão do paciente com dermatite atópica (DA) pré-tratamento com metotrexato (MTX) e a pele com lesão do paciente com dermatite atópica pós-tratamento com metotrexato. A espessura epidérmica média foi significativamente menor na pele lesada pós-tratamento

4.9 Análise pela técnica de imunoistoquímica

Para esta etapa do trabalho, foram analisadas as marcações com os anticorpos anti-IL-31, anti-IL31RA, anti-OSMR, anti-TSLP e anti-ki-67.

Foram avaliadas quatro comparações para análise: pele com lesão pré-tratamento com metotrexato versus pele controle não-atópica, pele com lesão pré-tratamento com metotrexato versus pele com lesão pós-tratamento com metotrexato, pele sem lesão pré-tratamento com metotrexato versus pele com lesão pré-tratamento com metotrexato e pele sem lesão pós-tratamento com metotrexato versus pele com lesão pós-tratamento com metotrexato.

4.9.1 Pele com lesão do paciente com dermatite atópica pré-tratamento com metotrexato e pele controle não-atópica

Esta comparação foi realizada para todos os anticorpos estudados (Anexo 7).

4.9.1.1 Avaliação de IL-31

Expressão de IL-31, comparando-se a pele com lesão de doente com DA pré-tratamento com MTX e a pele controle, não evidenciou alteração estatisticamente significativa na expressão do marcador na epiderme ($p = 0,346$) e na derme superficial ($p = 0,123$) (Figura 18).

Epid: epiderme; DS: derme superficial. Traço horizontal nos gráficos representa mediana.

Figura 18 - Imunoistoquímica com marcação para IL-31 na pele com lesão de doente com dermatite atópica (DA) pré-tratamento com metotrexato (MTX), com foco na epiderme (A) e na derme superficial (B); e na pele controle, com foco na epiderme (C) e na derme superficial (D). Aumento de 200 x. Expressão da IL-31, comparando-se a pele com lesão de doente com DA pré-tratamento com MTX e a pele controle, não evidenciou alteração estatisticamente significativa na expressão do marcador na epiderme (E) e na derme superficial (F)

4.9.1.2 Avaliação de IL-31RA

Expressão de IL-31RA, comparando-se a pele com lesão de doente com DA pré-tratamento com MTX e a pele controle, **evidenciou menor expressão de IL-31RA na pele com lesão na epiderme, com significância estatística ($p < 0,001$)**, sem diferença significativa na derme superficial ($p = 0,771$) (Figura 19).

Epid: epiderme; DS: derme superficial. Traço horizontal nos gráficos representa mediana. *** $p < 0,001$.

Figura 19 - Imunoistoquímica com marcação para IL-31RA na pele com lesão de doente com dermatite atópica (DA) pré-tratamento com metotrexato (MTX), com foco na epiderme (A) e na derme superficial (B); e na pele controle, com foco na epiderme (C) e na derme superficial (D). Aumento de 200 x. Expressão da IL-31RA, comparando-se a pele DA com lesão pré-tratamento com MTX e a pele controle, evidenciou alteração estatisticamente significativa na expressão do marcador na epiderme (E), sem diferença significativa na derme superficial (F)

4.9.1.3 Avaliação de OSMR

Expressão da OSMR, comparando-se a pele com lesão do paciente com DA pré-tratamento com MTX e a pele controle, não evidenciou alteração estatisticamente significativa na expressão do marcador na epiderme ($p = 0,254$) e na derme superficial ($p = 0,059$) (Figura 20).

Epid: epiderme; DS: derme superficial. Traço horizontal nos gráficos representa mediana.

Figura 20 - Imunoistoquímica com marcação para OSMR na pele com lesão de doente com dermatite atópica (DA) pré-tratamento com metotrexato (MTX), com foco na epiderme (A) e na derme superficial (B); e na pele controle, com foco na epiderme (C) e na derme superficial (D). Aumento de 200 x. Expressão da OSMR, comparando-se a pele DA com lesão pré-tratamento com MTX e a pele controle, não evidenciou alteração estatisticamente significativa na expressão do marcador na epiderme (E) e na derme superficial (F)

4.9.1.4 Avaliação de TSLP

Expressão da TSLP, comparando-se a pele com lesão de paciente com DA pré-tratamento com MTX e a pele controle, não evidenciou alteração estatisticamente significativa na expressão do marcador na epiderme ($p = 0,582$) e na derme superficial ($p = 0,228$) (Figura 21).

Epid: epiderme; DS: derme superficial. Traço horizontal nos gráficos representa mediana.

Figura 21 - Imunoistoquímica com marcação para TSLP na pele com lesão de doente com dermatite atópica (DA) pré-tratamento com metotrexato (MTX), com foco na epiderme (A) e na derme superficial (B); e na pele controle, com foco na epiderme (C) e na derme superficial (D). Aumento de 200 x. Expressão da TSLP, comparando-se a pele DA com lesão pré-tratamento com MTX e a pele controle, não evidenciou alteração estatisticamente significativa na expressão do marcador na epiderme (E) e na derme superficial (F)

4.9.1.5 Avaliação de Ki-67

Expressão da Ki-67, comparando-se a pele com lesão de doente com DA pré-tratamento com MTX e a pele controle, **evidenciou maior expressão de Ki-67 na pele com lesão, de forma estatisticamente significativa, na epiderme ($p < 0,001$) e na derme superficial ($p < 0,001$)** (Figura 22).

Epid: epiderme; DS: derme superficial. Traço horizontal nos gráficos representa mediana. *** $p < 0,001$.

Figura 22 - Imunoistoquímica com marcação para Ki-67 na pele com lesão de doente com dermatite atópica (DA) pré-tratamento com metotrexato (MTX), com foco na epiderme (A) e na derme superficial (B); e na pele controle, com foco na epiderme (C) e na derme superficial (D). Aumento de 200 x. Expressão da Ki-67, comparando-se a pele DA com lesão pré-tratamento com MTX e a pele controle, evidenciou alteração estatisticamente significativa na expressão do marcador na epiderme (E) e na derme superficial (F)

4.9.2 Pele com lesão do paciente com dermatite atópica pré-tratamento com metotrexato e pele com lesão do paciente com dermatite atópica pós-tratamento com metotrexato

Esta comparação foi realizada para todos os anticorpos estudados (Anexo 8).

4.9.2.1 Avaliação de IL-31

Expressão da IL-31, comparando-se a pele com lesão dos pacientes com DA pré e pós-tratamento com MTX, não evidenciou alteração estatisticamente significativa na expressão do marcador na epiderme ($p = 0,339$) e na derme superficial ($p = 0,301$) (Figura 23).

Epid: epiderme; DS: derme superficial. Traço horizontal nos gráficos representa mediana.

Figura 23 - Imunoistoquímica com marcação para IL-31 na pele com lesão de doente com dermatite atópica (DA), com foco na epiderme (A) e na derme superficial (B), A e B: pré-tratamento com metotrexato (MTX); e na pele com lesão de doente com DA, com foco na epiderme (C) e na derme superficial (D), C e D: pós-tratamento com MTX. Aumento de 200 x. Expressão da IL-31, comparando-se a pele DA com lesão pré e pós-tratamento com MTX, não evidenciou alteração estatisticamente significativa na expressão do marcador na epiderme (E) e na derme superficial (F)

4.9.2.2 Avaliação de IL-31RA

Expressão da IL-31RA, comparando-se a pele com lesão de doentes com DA pré e pós-tratamento com MTX, **evidenciou aumento da expressão de IL-31RA na pele pós-tratamento com MTX na epiderme ($p = 0,016$)**, sem diferença significativa na derme superficial ($p = 0,151$) (Figura 24).

Epid: epiderme; DS: derme superficial. Traço horizontal nos gráficos representa mediana. * $p < 0,05$.

Figura 24 - Imunoistoquímica com marcação para IL-31RA na pele com lesão de doente com dermatite atópica (DA), com foco na epiderme (A) e na derme superficial (B), A e B: pré-tratamento com metotrexato (MTX); e na pele com lesão de doente com DA, com foco na epiderme (C) e na derme superficial (D), C e D: pós-tratamento com MTX. Aumento de 200 x. Expressão da IL-31RA, comparando-se a pele DA com lesão pré e pós-tratamento com MTX, evidenciou alteração estatisticamente significativa na expressão do marcador na epiderme (E), sem diferença significativa na derme superficial (F)

4.9.2.3 Avaliação de OSMR

Expressão da OSMR, comparando-se a pele com lesão de doentes com DA pré e pós-tratamento com MTX, não evidenciou alteração estatisticamente significativa na expressão do marcador na epiderme ($p = 0,569$) e na derme superficial ($p = 0,110$) (Figura 25).

Epid: epiderme; DS: derme superficial. Traço horizontal nos gráficos representa mediana.

Figura 25 - Imunoistoquímica com marcação para OSMR na pele com lesão de doente com dermatite atópica (DA), com foco na epiderme (A) e na derme superficial (B), A e B: pré-tratamento com metotrexato (MTX); e na pele com lesão de doente com DA, com foco na epiderme (C) e na derme superficial (D), C e D: pós-tratamento com MTX. Aumento de 200 x. Expressão da OSMR, comparando-se a pele DA com lesão pré e pós-tratamento com MTX, não evidenciou alteração estatisticamente significativa na expressão do marcador na epiderme (E) e na derme superficial (F)

4.9.2.4 Avaliação de TSLP

Expressão da TSLP, comparando-se a pele com lesão de pacientes com DA pré e pós-tratamento com MTX, não evidenciou alteração estatisticamente significativa na expressão do marcador na epiderme ($p = 0,470$) e na derme superficial ($p = 0,850$) (Figura 26).

Epid: epiderme; DS: derme superficial. Traço horizontal nos gráficos representa mediana.

Figura 26 - Imunoistoquímica com marcação para TSLP na pele com lesão de doente com dermatite atópica (DA), com foco na epiderme (A) e na derme superficial (B), A e B: pré-tratamento com metotrexato (MTX); e na pele com lesão de doente com DA, com foco na epiderme (C) e na derme superficial (D), C e D: pós-tratamento com MTX. Aumento de 200 x. Expressão da TSLP, comparando-se a pele DA com lesão pré e pós-tratamento com MTX, não evidenciou alteração estatisticamente significativa na expressão do marcador na epiderme (E) e na derme superficial (F)

4.9.2.5 Avaliação de Ki-67

Expressão de Ki-67, comparando-se a pele com lesão de doentes com DA pré e pós-tratamento com MTX, não evidenciou alteração estatisticamente significativa na expressão do marcador na epiderme ($p = 0,910$) e na derme superficial ($p = 0,110$) (Figura 27).

Epid: epiderme; DS: derme superficial. Traço horizontal nos gráficos representa mediana.

Figura 27 - Imunoistoquímica com marcação para Ki-67 na pele com lesão de doente com dermatite atópica (DA), com foco na epiderme (A) e na derme superficial (B), A e B: pré-tratamento com metotrexato (MTX); e na pele com lesão de doente com DA, com foco na epiderme (C) e na derme superficial (D), C e D: pós-tratamento com MTX. Aumento de 200 x. Expressão de Ki-67, comparando-se a pele DA com lesão pré e pós-tratamento com MTX, não evidenciou alteração estatisticamente significativa na expressão do marcador na epiderme (E) e na derme superficial (F)

4.9.3 Outras comparações realizadas pela técnica de imunoistoquímica

Foram realizadas comparações da expressão dos marcadores entre a pele sem lesão do paciente com dermatite atópica e a pele com lesão do paciente com DA pré-tratamento com MTX e pós-tratamento com MTX.

Na **pele pré-tratamento com MTX**, observou-se **maior expressão de IL-31 na pele com lesão na derme superficial ($p = 0,007$)**, **maior expressão de IL-31RA na pele sem lesão na epiderme ($p = 0,001$)** e **maior expressão de Ki-67 na pele com lesão na derme superficial ($p < 0,001$)** (Figura 28 e Anexo 9).

Traço horizontal nos gráficos representa mediana. **p < 0,01 e ***p < 0,001.

Figura 28 - Painele com os gráficos apresentando a expressão dos marcadores avaliados na epiderme (epid) e na derme superficial (DS) dos doentes com dermatite atópica (DA), pela técnica de imunoistoquímica, comparando-se a pele sem lesão e a pele com lesão pré-tratamento com metotrexato (MTX). Observou-se, na pele lesada, maior expressão de IL-31 na derme superficial, menor expressão de IL-31RA na epiderme e maior expressão de ki-67 na derme superficial

Na pele pós-tratamento com MTX, houve maior expressão de Ki-67 na pele com lesão na epiderme ($p < 0,001$) e na derme superficial ($p < 0,001$) e maior expressão de IL-31RA na pele com lesão na derme superficial ($p = 0,034$) (Figura 29 e Anexo 10).

Traço horizontal nos gráficos representa mediana. *p < 0,05 e ***p < 0,001.

Figura 29 - Painel com os gráficos apresentando a expressão dos marcadores avaliados na epiderme (epid) e na derme superficial (DS), pela técnica de imunoistoquímica, comparando-se a pele sem lesão e a pele com lesão pós-tratamento com metotrexato (MTX). Observou-se, na pele lesada, maior expressão de IL-31RA na derme superficial e maior expressão de ki-67 na epiderme e na derme superficial

4.10 Análise pela técnica de *Real Time*-PCR

Para esta etapa do trabalho, foram analisados os transcritos de: IL-4, IL-6, IL-10, IL-31, IL-31RA, TNF- α , IFN- γ , TARC e CCL-22.

4.10.1 Pele com lesão pré-tratamento com metotrexato e pele controle não-atópica

Comparando-se a expressão gênica dos marcadores entre a pele dos doentes de DA com lesão pré-tratamento com MTX e pele controle não-atópica, observou-se **maior expressão de IL-6 ($p = 0,013$), IL-31 ($p = 0,012$), IL-31RA ($p < 0,001$) e TARC ($p = 0,022$) na pele com lesão pré-tratamento com metotrexato**, como demonstra a Figura 30.

Traço horizontal nos gráficos representa mediana. *p < 0,05 e ***p < 0,001.

Figura 30 - Perfil de expressão de IL-4, IL-6, IL-10, IL-31, IL-31RA, TNF-α, IFN-γ, TARC e CCL-22, comparando-se a pele com lesão de paciente com dermatite atópica (DA) pré-tratamento com metotrexato (MTX) e pele controle, por *Real Time-PCR*. Observou-se maior expressão de IL-6, IL-31, IL-31RA e TARC na pele lesada pré-tratamento

4.10.2 Pele com lesão pré-tratamento com metotrexato e pele com lesão pós-tratamento com metotrexato

Comparando-se a expressão gênica dos marcadores entre a pele dos doentes de DA com lesão pré-tratamento e pós-tratamento com MTX, observou-se **diminuição estatisticamente significativa na expressão de IL-31** ($p=0,019$), como demonstra a Figura 31.

Traço horizontal nos gráficos representa mediana. * $p < 0,05$.

Figura 31 - Perfil de expressão de IL-4, IL-6, IL-10, IL-31, IL-31RA, TNF- α , IFN- γ , TARC e CCL-22, comparando-se a pele com lesão de paciente com dermatite atópica (DA) pré-tratamento com metotrexato (MTX) e pós-tratamento com metotrexato, por *Real Time-PCR*. Houve diminuição estatisticamente significativa na expressão de IL-31 na pele lesada após o tratamento

4.10.3 Outras comparações pela técnica de *Real Time*-PCR

Foram realizadas comparações para avaliar a expressão gênica dos marcadores IL-4, IL-6, IL-10, IL-31, IL-31RA, TNF- α , IFN- γ , TARC e CCL-22 entre a pele sem lesão dos pacientes com dermatite atópica e a pele com lesão dos pacientes com DA pré-tratamento com MTX e pós-tratamento com MTX.

Não houve significância estatística nas comparações na pele pré-tratamento com MTX (Figura 32).

Traço horizontal nos gráficos representa mediana.

Figura 32 - Perfil de expressão de IL-4, IL-6, IL-10, IL-31, IL-31RA, TNF- α , IFN- γ , TARC e CCL-22, comparando-se a pele sem lesão e a pele com lesão de pacientes com dermatite atópica (DA) pré-tratamento com metotrexato (MTX), por *Real Time*-PCR. Não houve significância estatística nestas comparações realizadas

Na pele pós-tratamento com MTX, observou-se maior expressão de IFN- γ na pele com lesão ($p = 0,047$) (Figura 33).

Traço horizontal nos gráficos representa mediana. * $p < 0,05$.

Figura 33 - Perfil de expressão de IL-4, IL-6, IL-10, IL-31, IL-31RA, TNF- α , IFN- γ , TARC e CCL-22, comparando-se a pele sem lesão e a pele com lesão de pacientes com dermatite atópica pós-tratamento com metotrexato, por *Real Time*-PCR. Observou-se maior expressão de IFN- γ na pele com lesão

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A dermatite atópica é doença cutânea crônica e sua persistência ou início na idade adulta pode ocorrer, sendo ambas as condições frequentes ^(162, 163). O tratamento de primeira linha para a doença inclui o uso de corticoides tópicos e emolientes. Em casos moderadas a graves e refratários ao tratamento convencional, pode ser indicado tratamento sistêmico, incluindo medicações como ciclosporina, metotrexato, azatioprina e, mais recentemente, o imunobiológico dupilumabe (medicação anti-IL4 e IL13) ^(120, 121, 124, 137).

O metotrexato é usado no tratamento da dermatite atópica moderada a grave há pelo menos 15 anos, com redução média do SCORAD estimada de pouco mais de 40% após 12 semanas de tratamento. Trata-se de medicação segura, sendo os potenciais efeitos colaterais mais relevantes a hepatotoxicidade e a teratogenicidade ^(124, 164). No ambulatório de Dermatite Atópica da Divisão de Dermatologia do HC-FMUSP, o MTX é medicamento utilizado nos doentes adultos com DA refratária aos tratamentos de primeira linha (corticoterapia tópica e hidratação) e/ou fototerapia, sendo importante este estudo para fundamentar o uso desta medicação entre os pacientes atendidos na unidade e na tentativa de ampliar os conhecimentos sobre os possíveis mecanismos de ação desta medicação na fisiopatogenia da doença.

Este estudo demonstra a eficácia clínica e segurança do MTX no tratamento de doentes adultos com dermatite atópica grave. A média de redução do EASI, do SCORAD e do prurido, após 24 semanas de uso da medicação, foi de 46,7%, 36,6% e 39,1%, respectivamente, semelhante ao observado em outros estudos ^(140, 141). Observou-se que a redução dos escores de gravidade e do prurido foi mais expressiva na comparação entre a semana 12 e a semana inicial do protocolo, não sendo estatisticamente significativa na comparação entre a semana 24 e a semana 12. Alguns estudos já demonstraram que o efeito terapêutico do metotrexato é

observado, sobretudo, nas primeiras 12 semanas de tratamento (140, 152, 153), embora outros autores tenham também observado melhora significativa após este período, com tratamento e seguimento por 10 a 14 meses ^(144, 147). Como efeitos colaterais possivelmente relacionados à medicação, houve, na minoria dos doentes, aumento da TGP, náuseas no dia do uso da medicação e epigastralgia, alterações previamente observadas pela maior parte dos pesquisadores que avaliaram o uso do metotrexato em pacientes com DA ^(139, 140, 142-144, 146-149, 152-155, 158). Neste estudo, estas alterações foram transitórias e não houve necessidade de redução da dose utilizada e/ou suspensão da medicação.

Quanto aos achados laboratoriais, evidenciou-se que a redução da IgE sérica média foi estatisticamente significativa, comparando-se a semana 24 com a semana inicial do estudo. Este achado corrobora a redução da gravidade da doença observada durante o período do protocolo, uma vez que a correlação dos níveis da IgE sérica com a gravidade da DA já foi previamente demonstrada ^(163, 165, 166).

Análise da espessura epidérmica média demonstrou menor espessura da pele no grupo controle não-atópico e da pele sem lesão dos doentes com DA pré-tratamento com MTX, comparando-os com a pele com lesão de DA pré-tratamento, com significância estatística. Observou-se ainda menor espessura epidérmica na pele sem lesão em relação à pele com lesão nas amostras dos pacientes pós-tratamento com MTX. Estes achados eram esperados, uma vez que as lesões de pacientes adultos com dermatite atópica costumam ser liquenificadas ^(167, 168); ainda, podem indicar efeito indireto sobre a redução da escoriação pelo paciente, com atenuação do prurido.

Após 24 semanas de tratamento com MTX, houve redução da espessura epidérmica média, comparando-se a pele com lesão de DA pré e pós-tratamento. Este achado é inédito e pode ser atribuído à melhora dos sinais e sintomas (prurido) observados nos doentes incluídos no estudo, com atenuação do espessamento da pele ao longo do tratamento com MTX. Alguns estudos já demonstraram redução da espessura epidérmica em

pacientes com DA após uso de outros tratamentos para a doença. Ogawa *et al.* evidenciaram redução da espessura epidérmica na pele de pacientes com DA grave e/ou refratários a outros tratamentos com o uso de PUVA tópica (fototerapia com radiação ultravioleta A e uso de psoralênico tópico), com pomada de 8-metoxipsoralênico a 3% ⁽¹⁶⁹⁾. Brenninkmeijer *et al.* observaram redução da espessura epidérmica em lesões prurigoides de pacientes com DA após 10 semanas de tratamento com *excimer laser* 308 nm (fototerapia com radiação ultravioleta B em comprimento de onda de 308 nm) ⁽¹⁷⁰⁾. Guttman-Yassky *et al.* demonstraram redução da espessura epidérmica na pele com lesão de pacientes com DA moderada a grave após quatro e após 16 semanas de uso de dupilumabe versus placebo ⁽¹⁷¹⁾. Bissonnette *et al.* observaram redução da espessura epidérmica em lesões de pacientes com DA após 15 dias de uso de crisaborole tópico em comparação ao uso de veículo ⁽¹⁷²⁾.

Quanto aos achados na avaliação imunoistoquímica, na comparação da pele com lesão de DA pré-tratamento com MTX e a pele controle não-atópica, evidenciou-se menor expressão de IL-31RA na epiderme e maior expressão de Ki-67 na epiderme e na derme superficial na pele com lesão do paciente com DA pré-tratamento. A expressão de IL-31RA, comparando-se pele de doente com DA e pele controle não-atópica, já foi previamente avaliada, porém há poucos estudos publicados e os achados não são uniformes. Bilsborough *et al.* evidenciaram maior expressão de IL-31RA nos queratinócitos epidérmicos nas amostras de pele de pacientes com DA em comparação às amostras de pele controle ⁽⁷²⁾. Nobbe *et al.* observaram não haver diferença na expressão de IL-31RA e OSMR na epiderme e na derme de pacientes com DA em relação aos controles ⁽⁷³⁾. Estes diferentes achados observados sugerem que a expressão cutânea de IL-31RA pela imunoistoquímica provavelmente não poderia ser considerada como um biomarcador adequado para dermatite atópica. Ainda, IL-31RA parece ser mais expresso em gânglios da raiz dorsal ^(68, 74).

A maior expressão de Ki-67 observada na pele com lesão pré-tratamento com MTX em comparação à pele controle não-atópica era

esperada, uma vez que Ki-67 reflete maior proliferação celular ⁽¹⁷³⁾, o que se observa nas lesões ativas de DA, associadas à hiperplasia epidérmica ⁽⁵⁵⁾.

Pela técnica de *Real Time*-PCR, observou-se maior expressão de IL-6, IL-31, IL-31RA e TARC na pele com lesão pré-tratamento com metotrexato em relação à pele controle. Outros pesquisadores já corroboraram estes achados de maior expressão de IL-6 ⁽¹⁷⁴⁾, IL-31 ^(68, 72, 76, 77) e TARC ⁽¹⁷⁵⁾ na pele lesada de doentes com DA em relação a controles saudáveis. Quanto à expressão de IL-31RA, há estudos que corroboram a maior expressão de RNA mensageiro na pele de DA ⁽⁶⁸⁾ enquanto outros não observaram diferença nessa expressão ⁽⁷⁷⁾ em relação à pele controle.

Na comparação da pele lesada pré-tratamento com a pele lesada após 24 semanas de tratamento com MTX, observou-se aumento da expressão de IL-31RA por imunoistoquímica na pele após o tratamento. Pela técnica de *Real Time*-PCR, comparando-se a expressão gênica dos marcadores analisados entre a pele dos doentes de DA com lesão pré-tratamento e pós-tratamento com MTX, observou-se diminuição estatisticamente significativa na expressão de IL-31. Estudos evidenciam que a IL-31 está envolvida na polarização imunológica para o perfil Th2 na fase aguda da dermatite atópica, bem como no prurido apresentado pelos doentes acometidos ^(76, 115, 176). A IL-31 é produzida, sobretudo, por macrófagos, monócitos, células T, mastócitos e células dendríticas e seus principais locais de ação são a pele, os pulmões, o intestino e o sistema nervoso central e periférico. Sugere-se que seu papel principal seja estimular a imunidade celular contra potenciais patógenos ⁽¹⁷⁷⁾. Sua sinalização ocorre por meio de receptor heterodimérico, sendo que a subunidade IL-31RA parece ter maior importância na patogênese da DA em relação à subunidade OSMR ^(68, 72).

Nossos achados demonstram haver menor expressão gênica de IL-31 na pele dos pacientes com DA após o tratamento com MTX. Desta forma, a redução do prurido observada nos doentes tratados parece, em parte, ser influenciada por esta redução na IL-31. Esta alteração não foi corroborada pela redução da expressão da IL-31 avaliada pela técnica de imunoistoquímica, possivelmente, pela dificuldade na coloração de citocinas,

associada à presença de fundo e pouca marcação, mesmo com recuperação otimizada do antígeno, bloqueio, incubação e concentrações adequadas do anticorpo.

O aumento da expressão de IL-31RA na epiderme, evidenciado pela técnica de imunoistoquímica, pode sugerir mecanismo compensatório, uma vez que houve redução da expressão gênica de IL-31. Alguns pesquisadores já evidenciaram que o receptor IL-31RA pode apresentar este tipo de resposta de expressão aumentada (*upregulation*) após alguns estímulos. Miake *et al.* demonstraram supra-regulação de IL-31RA após estímulo com IL-4 em células dendríticas derivadas de medula óssea murina ⁽⁷⁸⁾. Edukulla *et al.* observaram que as citocinas IL-4 e IL-13 são capazes de aumentar a expressão de IL-31RA em macrófagos peritoneais e derivados da medula óssea de camundongos ⁽¹⁷⁸⁾.

Na fisiopatogenia da DA, sabe-se que na fase aguda da doença há aumento de citocinas e quimiocinas sobretudo do padrão Th2 e Th22. Posteriormente, na fase crônica da doença, há também aumento da expressão de citocinas Th1 e Th17 ^(6, 23). Este estudo avaliou a expressão de RNAm de algumas citocinas e quimiocinas destes eixos, como IL-4 (Th2), IL-6 (Th2), IL-10 (Th2), TNF- α (Th1), IFN- γ (Th1), TARC (Th2) e CCL-22 (Th2), porém, não foi possível demonstrar alteração estatisticamente significativa na pele após o tratamento com MTX.

Na comparação da pele sem lesão com a pele lesada, tanto pré-tratamento quanto após o tratamento com MTX, foram poucas diferenças estatisticamente significativas na expressão dos marcadores inflamatórios cutâneos avaliados, refletindo, talvez, o estado inflamatório da pele não lesada na DA, a despeito da redução dos escores de gravidade e do prurido ^(23, 48).

Podem ser apontadas como limitações do estudo, sobretudo para as análises laboratoriais realizadas, o tamanho pequeno da amostra e o tempo de seguimento dos doentes. É possível que estudo em larga escala e com maior tempo de seguimento dos pacientes com DA em uso de metotrexato

possa demonstrar mudança no perfil de expressão dos marcadores inflamatórios cutâneos abordados neste estudo.

O metotrexato mostrou-se uma medicação eficaz e segura no tratamento de doentes com DA grave e refratária a outros tratamentos, com redução dos escores de gravidade, do prurido e do nível sérico de IgE, no seguimento por 24 semanas. Comparando-se a pele de doente com DA com lesão pré e pós-tratamento com MTX, evidenciou-se redução da espessura epidérmica média, redução da expressão gênica de IL-31 na pele após o tratamento pela técnica de *Real Time*-PCR e aumento da expressão de IL-31RA na epiderme pela técnica de imunoistoquímica.

Embora estes achados sejam relevantes, mais estudos são necessários para compreendermos os mecanismos de ação do metotrexato na melhora clínica e laboratorial observada nos pacientes com dermatite atópica grave.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

O uso de metotrexato por via oral em pacientes adultos com dermatite atópica grave por 24 semanas mostrou ser eficaz e seguro, com redução significativa dos escores de gravidade EASI (*Eczema Area and Severity Index*) e SCORAD (*SCOring Atopic Dermatitis*), bem como do prurido.

Houve redução dos níveis séricos de IgE após 24 semanas de tratamento com metotrexato nos pacientes adultos com dermatite atópica grave.

Um dos achados inéditos deste trabalho aponta redução da espessura epidérmica média da pele com lesão em pacientes adultos com dermatite atópica grave após tratamento com metotrexato por 24 semanas.

Com relação à expressão de citocinas inflamatórias, detectamos diminuição da expressão de RNAm de IL-31 na pele com lesão de dermatite atópica após tratamento com metotrexato por 24 semanas, e aumento da expressão de seu receptor IL-31RA na epiderme na pele com lesão de dermatite atópica após 24 semanas de tratamento com metotrexato.

Não se observou alteração significativa na expressão cutânea dos demais marcadores avaliados pela técnica de imunoistoquímica (IL-31, OSMR, TSLP e Ki67) e pela técnica de PCR (IL-4, IL-6, IL-10, IL-31RA, TNF- α , IFN- γ , TARC e CCL-22) nos pacientes com dermatite atópica na comparação pré versus pós tratamento com metotrexato.

Estes achados reforçam o benefício do uso do metotrexato no tratamento de doentes com dermatite atópica grave, e auxiliam na compreensão do mecanismo de ação desta medicação na melhora dos sinais e sintomas observados nos pacientes. Estudos futuros, com ênfase

nos mecanismos do prurido e seus mediadores, são necessários para melhor elucidação da participação da IL31 e seus receptores na resposta inflamatória da DA.

7 REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

- 1 Eichenfield LF, Tom WL, Chamlin SL, Feldman SR, Hanifin JM, Simpson EL, et al. Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: section 1. Diagnosis and assessment of atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*. 2014;70(2):338-51.
- 2 Wollenberg A, Barbarot S, Bieber T, Christen-Zaech S, Deleuran M, Fink-Wagner A, et al. Consensus-based European guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) in adults and children: part I. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2018;32(5):657-82.
- 3 Aoki V, Lorenzini D, Orfali RL, Zaniboni MC, Oliveira ZNP, Rivitti-Machado MC, et al. Consensus on the therapeutic management of atopic dermatitis - Brazilian Society of Dermatology. *An Bras Dermatol*. 2019;94(2 Suppl 1):67-75.
- 4 Bylund S, von Kobyletzki LB, Svalstedt M, Svensson Å. Prevalence and incidence of atopic dermatitis: a systematic review. *Acta Derm Venereol*. 2020;100(12):adv00160.
- 5 Odhiambo JA, Williams HC, Clayton TO, Robertson CF, Asher MI. Global variations in prevalence of eczema symptoms in children from ISAAC Phase Three. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(6):1251-8.e23.
- 6 Weidinger S, Beck LA, Bieber T, Kabashima K, Irvine AD. Atopic dermatitis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4(1):1.
- 7 Abuabara K, Yu AM, Okhovat JP, Allen IE, Langan SM. The prevalence of atopic dermatitis beyond childhood: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Allergy*. 2018;73(3):696-704.

- 8 Lee HH, Patel KR, Singam V, Rastogi S, Silverberg JI. A systematic review and meta-analysis of the prevalence and phenotype of adult-onset atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*. 2019;80(6):1526-32.e7.
- 9 Barbarot S, Auziere S, Gadkari A, Girolomoni G, Puig L, Simpson EL, et al. Epidemiology of atopic dermatitis in adults: Results from an international survey. *Allergy*. 2018;73(6):1284-93.
- 10 Yew YW, Thyssen JP, Silverberg JI. A systematic review and meta-analysis of the regional and age-related differences in atopic dermatitis clinical characteristics. *J Am Acad Dermatol*. 2019;80(2):390-401.
- 11 Paller A, Jaworski JC, Simpson EL, Boguniewicz M, Russell JJ, Block JK, et al. Major comorbidities of atopic dermatitis: beyond allergic disorders. *Am J Clin Dermatol*. 2018;19(6):821-38.
- 12 Ravnborg N, Ambikaibalan D, Agnihotri G, Price S, Rastogi S, Patel KR, et al. Prevalence of asthma in patients with atopic dermatitis: A systematic review and meta-analysis. *J Am Acad Dermatol*. 2021;84(2):471-8.
- 13 Kage P, Simon JC, Treudler R. Atopic dermatitis and psychosocial comorbidities. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2020;18(2):93-102.
- 14 Zhang A, Silverberg JI. Association of atopic dermatitis with being overweight and obese: a systematic review and metaanalysis. *J Am Acad Dermatol*. 2015;72(4):606-16.e4.
- 15 Standl M, Tesch F, Baurecht H, Rodríguez E, Müller-Nurasyid M, Gieger C, et al. Association of atopic dermatitis with cardiovascular risk factors and diseases. *J Invest Dermatol*. 2017;137(5):1074-81.

- 16 Andersen YM, Egeberg A, Gislason GH, Skov L, Thyssen JP. Autoimmune diseases in adults with atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*. 2017;76(2):274-80.e1.
- 17 Legendre L, Barnetche T, Mazereeuw-Hautier J, Meyer N, Murrell D, Paul C. Risk of lymphoma in patients with atopic dermatitis and the role of topical treatment: A systematic review and meta-analysis. *J Am Acad Dermatol*. 2015;72(6):992-1002.
- 18 Wuthrich B, Schmid-Grendelmeier P. The atopic eczema/dermatitis syndrome. Epidemiology, natural course, and immunology of the IgE-associated ("extrinsic") and the nonallergic ("intrinsic") AEDS. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2003;13(1):1-5.
- 19 Hanifin JM, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol*. 1980;92(Suppl):44-7.
- 20 Kim BE, Leung DYM. Significance of skin barrier dysfunction in atopic dermatitis. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2018;10(3):207-15.
- 21 Malik K, Heitmiller KD, Czarnowicki T. An update on the pathophysiology of atopic dermatitis. *Dermatol Clin*. 2017;35(3):317-26.
- 22 Tsakok T, Woolf R, Smith CH, Weidinger S, Flohr C. Atopic dermatitis: the skin barrier and beyond. *Br J Dermatol*. 2019;180(3):464-74.
- 23 Langan SM, Irvine AD, Weidinger S. Atopic dermatitis. *Lancet*. 2020;396(10247):345-60.
- 24 Apfelbacher CJ, Diepgen TL, Schmitt J. Determinants of eczema: population-based cross-sectional study in Germany. *Allergy*. 2011;66(2):206-13.

-
- 25 Nedoszytko B, Reszka E, Gutowska-Owsiak D, Trzeciak M, Lange M, Jarczak J, et al. Genetic and epigenetic aspects of atopic dermatitis. *Int J Mol Sci*. 2020;21(18):6484.
- 26 Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet*. 2006;38(4):441-6.
- 27 Weidinger S, O'Sullivan M, Illig T, Baurecht H, Depner M, Rodriguez E, et al. Filaggrin mutations, atopic eczema, hay fever, and asthma in children. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121(5):1203-9.e1.
- 28 Martin MJ, Estravís M, García-Sánchez A, Dávila I, Isidoro-García M, Sanz C. Genetics and epigenetics of atopic dermatitis: an updated systematic review. *Genes (Basel)*. 2020;11(4):442.
- 29 Rodriguez E, Baurecht H, Wahn AF, Kretschmer A, Hotze M, Zeilinger S, et al. An integrated epigenetic and transcriptomic analysis reveals distinct tissue-specific patterns of DNA methylation associated with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2014;134(7):1873-83.
- 30 Zaniboni MC, Samorano LP, Orfali RL, Aoki V. Skin barrier in atopic dermatitis: beyond filaggrin. *An Bras Dermatol*. 2016;91(4):472-8.
- 31 McAleer MA, Irvine AD. The multifunctional role of filaggrin in allergic skin disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(2):280-91.
- 32 Batista DI, Perez L, Orfali RL, Zaniboni MC, Samorano LP, Pereira NV, et al. Profile of skin barrier proteins (filaggrin, claudins 1 and 4) and Th1/Th2/Th17 cytokines in adults with atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015;29(6):1091-5.

-
- 33 Lee HJ, Lee SH. Epidermal permeability barrier defects and barrier repair therapy in atopic dermatitis. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2014;6(4):276-87.
- 34 Cork MJ, Danby SG, Vasilopoulos Y, Hadgraft J, Lane ME, Moustafa M, et al. Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2009;129(8):1892-908.
- 35 Pellerin L, Henry J, Hsu CY, Balica S, Jean-Decoster C, Méchin MC, et al. Defects of filaggrin-like proteins in both lesional and nonlesional atopic skin. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131(4):1094-102.
- 36 Kim BE, Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD. Loricrin and involucrin expression is down-regulated by Th2 cytokines through STAT-6. *Clin Immunol.* 2008;126(3):332-7.
- 37 Arikawa J, Ishibashi M, Kawashima M, Takagi Y, Ichikawa Y, Imokawa G. Decreased levels of sphingosine, a natural antimicrobial agent, may be associated with vulnerability of the stratum corneum from patients with atopic dermatitis to colonization by *Staphylococcus aureus*. *J Invest Dermatol.* 2002;119(2):433-9.
- 38 De Benedetto A, Rafaels NM, McGirt LY, Ivanov AI, Georas SN, Cheadle C, et al. Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(3):773-86.e1-7.
- 39 Gavrilova T. Immune dysregulation in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Dermatitis.* 2018;29(2):57-62.
- 40 Aoki W, Ueda M. Characterization of antimicrobial peptides toward the development of novel antibiotics. *Pharmaceuticals (Basel).* 2013;6(8):1055-81.

-
- 41 Marcinkiewicz M, Majewski S. The role of antimicrobial peptides in chronic inflammatory skin diseases. *Postepy Dermatol Alergol*. 2016;33(1):6-12.
- 42 Kuo IH, Carpenter-Mendini A, Yoshida T, McGirt LY, Ivanov AI, Barnes KC, et al. Activation of epidermal toll-like receptor 2 enhances tight junction function: implications for atopic dermatitis and skin barrier repair. *J Invest Dermatol*. 2013;133(4):988-98.
- 43 Wong CK, Chu IM, Hon KL, Tsang MS, Lam CW. Aberrant expression of bacterial pattern recognition receptor NOD2 of basophils and microbicidal peptides in atopic dermatitis. *Molecules*. 2016;21(4):471.
- 44 Clausen ML, Slotved HC, Krogfelt KA, Andersen PS, Agner T. In vivo expression of antimicrobial peptides in atopic dermatitis. *Exp Dermatol*. 2016;25(1):3-9.
- 45 Möbus L, Rodriguez E, Harder I, Schwarz A, Wehkamp U, Stölzl D, et al. Elevated NK-cell transcriptional signature and dysbalance of resting and activated NK cells in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;S0091-6749(20)31640-7.
- 46 Mack MR, Brestoff JR, Berrien-Elliott MM, Trier AM, Yang TB, McCullen M, et al. Blood natural killer cell deficiency reveals an immunotherapy strategy for atopic dermatitis. *Sci Transl Med*. 2020;12(532):eaay1005.
- 47 Gittler JK, Shemer A, Suarez-Farinas M, Fuentes-Duculan J, Gulewicz KJ, Wang CQ, et al. Progressive activation of T(H)2/T(H)22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(6):1344-54.

- 48 Suárez-Fariñas M, Tintle SJ, Shemer A, Chiricozzi A, Nograles K, Cardinale I, et al. Nonlesional atopic dermatitis skin is characterized by broad terminal differentiation defects and variable immune abnormalities. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(4):954-64.e1-4.
- 49 Pavel AB, Renert-Yuval Y, Wu J, Del Duca E, Diaz A, Lefferdink R, et al. Tape strips from early-onset pediatric atopic dermatitis highlight disease abnormalities in nonlesional skin. *Allergy*. 2021;76(1):314-25.
- 50 Niebuhr M, Scharonow H, Gathmann M, Mamerow D, Werfel T. Staphylococcal exotoxins are strong inducers of IL-22: A potential role in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(6):1176-83.e4.
- 51 Simpson EL, Gadkari A, Worm M, Soong W, Blauvelt A, Eckert L, et al. Dupilumab therapy provides clinically meaningful improvement in patient-reported outcomes (PROs): A phase IIb, randomized, placebo-controlled, clinical trial in adult patients with moderate to severe atopic dermatitis (AD). *J Am Acad Dermatol*. 2016;75(3):506-15.
- 52 de Bruin-Weller M, Thaçi D, Smith CH, Reich K, Cork MJ, Radin A, et al. Dupilumab with concomitant topical corticosteroid treatment in adults with atopic dermatitis with an inadequate response or intolerance to ciclosporin A or when this treatment is medically inadvisable: a placebo-controlled, randomized phase III clinical trial (LIBERTY AD CAFÉ). *Br J Dermatol*. 2018;178(5):1083-101.
- 53 Paller AS, Bansal A, Simpson EL, Boguniewicz M, Blauvelt A, Siegfried EC, et al. Clinically meaningful responses to Dupilumab in adolescents with uncontrolled moderate-to-severe atopic dermatitis: Post-hoc analyses from a randomized clinical trial. *Am J Clin Dermatol*. 2020;21(1):119-31.

- 54 Paller AS, Siegfried EC, Thaçi D, Wollenberg A, Cork MJ, Arkwright PD, et al. Efficacy and safety of dupilumab with concomitant topical corticosteroids in children 6 to 11 years old with severe atopic dermatitis: A randomized, double-blinded, placebo-controlled phase 3 trial. *J Am Acad Dermatol*. 2020;83(5):1282-93.
- 55 Esaki H, Brunner PM, Renert-Yuval Y, Czarnowicki T, Huynh T, Tran G, et al. Early-onset pediatric atopic dermatitis is TH2 but also TH17 polarized in skin. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(6):1639-51.
- 56 Brunner PM, Israel A, Zhang N, Leonard A, Wen HC, Huynh T, et al. Early-onset pediatric atopic dermatitis is characterized by T(H)2/T(H)17/T(H)22-centered inflammation and lipid alterations. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(6):2094-106.
- 57 Noda S, Suárez-Fariñas M, Ungar B, Kim SJ, de Guzman Strong C, Xu H, et al. The Asian atopic dermatitis phenotype combines features of atopic dermatitis and psoriasis with increased TH17 polarization. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136(5):1254-64.
- 58 Tsoi LC, Rodriguez E, Stölzl D, Wehkamp U, Sun J, Gerdes S, et al. Progression of acute-to-chronic atopic dermatitis is associated with quantitative rather than qualitative changes in cytokine responses. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;145(5):1406-15.
- 59 Jariwala SP, Abrams E, Benson A, Fodeman J, Zheng T. The role of thymic stromal lymphopoietin in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy*. 2011;41(11):1515-20.
- 60 Furue M, Chiba T, Tsuji G, Ulzii D, Kido-Nakahara M, Nakahara T, et al. Atopic dermatitis: immune deviation, barrier dysfunction, IgE autoreactivity and new therapies. *Allergol Int*. 2017;66(3):398-403.

-
- 61 Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, Yuan W, Edward G, Homey B, et al. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol*. 2002;3(7):673-80.
- 62 Alysandratos KD, Angelidou A, Vasiadi M, Zhang B, Kalogeromitros D, Katsarou-Katsari A, et al. Increased affected skin gene expression and serum levels of thymic stromal lymphopoietin in atopic dermatitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2010;105(5):403-4.
- 63 Leung DY. New insights into atopic dermatitis: role of skin barrier and immune dysregulation. *Allergol Int*. 2013;62(2):151-61.
- 64 Savinko T, Matikainen S, Saarialho-Kere U, Lehto M, Wang G, Lehtimäki S, et al. IL-33 and ST2 in atopic dermatitis: expression profiles and modulation by triggering factors. *J Invest Dermatol*. 2012;132(5):1392-400.
- 65 Tamagawa-Mineoka R, Okuzawa Y, Masuda K, Katoh N. Increased serum levels of interleukin 33 in patients with atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*. 2014;70(5):882-8.
- 66 Zhang Q, Putheti P, Zhou Q, Liu Q, Gao W. Structures and biological functions of IL-31 and IL-31 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2008;19(5-6):347-56.
- 67 Saleem MD, Oussedik E, D'Amber V, Feldman SR. Interleukin-31 pathway and its role in atopic dermatitis: a systematic review. *J Dermatolog Treat*. 2017;28(7):591-9.
- 68 Cevikbas F, Wang X, Akiyama T, Kempkes C, Savinko T, Antal A, et al. A sensory neuron-expressed IL-31 receptor mediates T helper cell-dependent itch: Involvement of TRPV1 and TRPA1. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(2):448-60.

- 69 Nakashima C, Otsuka A, Kabashima K. Interleukin-31 and interleukin-31 receptor: New therapeutic targets for atopic dermatitis. *Exp Dermatol*. 2018;27(4):327-31.
- 70 Ruppenstein A, Limberg MM, Loser K, Kremer AE, Homey B, Raap U. Involvement of neuro-immune interactions in pruritus with special focus on receptor expressions. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:627985.
- 71 Tanaka A, Arita K, Lai-Cheong JE, Palisson F, Hide M, McGrath JA. New insight into mechanisms of pruritus from molecular studies on familial primary localized cutaneous amyloidosis. *Br J Dermatol*. 2009;161(6):1217-24.
- 72 Bilsborough J, Leung DY, Maurer M, Howell M, Boguniewicz M, Yao L, et al. IL-31 is associated with cutaneous lymphocyte antigen-positive skin homing T cells in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(2):418-25.
- 73 Nobbe S, Dziunycz P, Muhleisen B, Bilsborough J, Dillon SR, French LE, et al. IL-31 expression by inflammatory cells is preferentially elevated in atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol*. 2012;92(1):24-8.
- 74 Kato A, Fujii E, Watanabe T, Takashima Y, Matsushita H, Furuhashi T, et al. Distribution of IL-31 and its receptor expressing cells in skin of atopic dermatitis. *J Dermatol Sci*. 2014;74(3):229-35.
- 75 Niebuhr M, Mamerow D, Heratizadeh A, Satzger I, Werfel T. Staphylococcal alpha-toxin induces a higher T cell proliferation and interleukin-31 in atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol*. 2011;156(4):412-5.

- 76 Sonkoly E, Muller A, Lauerma AI, Pivarcsi A, Soto H, Kemeny L, et al. IL-31: a new link between T cells and pruritus in atopic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(2):411-7.
- 77 Neis MM, Peters B, Dreuw A, Wenzel J, Bieber T, Mauch C, et al. Enhanced expression levels of IL-31 correlate with IL-4 and IL-13 in atopic and allergic contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118(4):930-7.
- 78 Miake S, Tsuji G, Takemura M, Hashimoto-Hachiya A, Vu YH, Furue M, et al. IL-4 augments IL-31/IL-31 receptor alpha interaction leading to enhanced Ccl 17 and Ccl 22 production in dendritic cells: implications for atopic dermatitis. *Int J Mol Sci*. 2019;20(16):4-53.
- 79 Kim S, Kim HJ, Yang HS, Kim E, Huh IS, Yang JM. IL-31 Serum protein and tissue mRNA levels in patients with atopic dermatitis. *Ann Dermatol*. 2011;23(4):468-73.
- 80 Raap U, Weissmantel S, Gehring M, Eisenberg AM, Kapp A, Folster-Holst R. IL-31 significantly correlates with disease activity and Th2 cytokine levels in children with atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol*. 2012;23(3):285-8.
- 81 Nygaard U, Hvid M, Johansen C, Buchner M, Folster-Holst R, Deleuran M, et al. TSLP, IL-31, IL-33 and sST2 are new biomarkers in endophenotypic profiling of adult and childhood atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2016;30(11):1930-8.
- 82 Ruzicka T, Hanifin JM, Furue M, Pulka G, Mlynarczyk I, Wollenberg A, et al. Anti-interleukin-31 receptor A antibody for atopic dermatitis. *N Engl J Med*. 2017;376(9):826-35.

- 83 Dos Santos VG, Orfali RL, de Oliveira Titz T, da Silva Duarte AJ, Sato MN, Aoki V. Evidence of regulatory myeloid dendritic cells and circulating inflammatory epidermal dendritic cells-like modulated by Toll-like receptors 2 and 7/8 in adults with atopic dermatitis. *Int J Dermatol*. 2017;56(6):630-5.
- 84 Wollenberg A, Wagner M, Gunther S, Towarowski A, Tuma E, Moderer M, et al. Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol*. 2002;119(5):1096-102.
- 85 Guttman-Yassky E, Lowes MA, Fuentes-Duculan J, Whynot J, Novitskaya I, Cardinale I, et al. Major differences in inflammatory dendritic cells and their products distinguish atopic dermatitis from psoriasis. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119(5):1210-7.
- 86 Moosbrugger-Martinz V, Tripp CH, Clausen BE, Schmuth M, Dubrac S. Atopic dermatitis induces the expansion of thymus-derived regulatory T cells exhibiting a Th2-like phenotype in mice. *J Cell Mol Med*. 2016;20(5):930-8.
- 87 Kong HH, Oh J, Deming C, Conlan S, Grice EA, Beatson MA, et al. Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. *Genome Res*. 2012;22(5):850-9.
- 88 Baurecht H, Rühlemann MC, Rodríguez E, Thielking F, Harder I, Erkens AS, et al. Epidermal lipid composition, barrier integrity, and eczematous inflammation are associated with skin microbiome configuration. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(5):1668-76.e16.
- 89 Totte JE, van der Feltz WT, Hennekam M, van Belkum A, van Zuuren EJ, Pasmans SG. Prevalence and odds of *Staphylococcus aureus* carriage in atopic dermatitis: a systematic review and meta-analysis. *Br J Dermatol*. 2016;175(4):687-95.

- 90 Nakatsuji T, Chen TH, Two AM, Chun KA, Narala S, Geha RS, et al. Staphylococcus aureus exploits epidermal barrier defects in atopic dermatitis to trigger cytokine expression. *J Invest Dermatol*. 2016;136(11):2192-200.
- 91 Kennedy EA, Connolly J, Hourihane JO, Fallon PG, McLean WHI, Murray D, et al. Skin microbiome before development of atopic dermatitis: Early colonization with commensal staphylococci at 2 months is associated with a lower risk of atopic dermatitis at 1 year. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(1):166-72.
- 92 Hiragun T, Ishii K, Hiragun M, Suzuki H, Kan T, Mihara S, et al. Fungal protein MGL_1304 in sweat is an allergen for atopic dermatitis patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(3):608-15.e4.
- 93 Guglielmo A, Sechi A, Patrizi A, Gurioli C, Neri I. Head and neck dermatitis, a subtype of atopic dermatitis induced by *Malassezia* spp: Clinical aspects and treatment outcomes in adolescent and adult patients. *Pediatr Dermatol*. 2021;38(1):109-14.
- 94 Dawn A, Papoiu AD, Chan YH, Rapp SR, Rassette N, Yosipovitch G. Itch characteristics in atopic dermatitis: results of a web-based questionnaire. *Br J Dermatol*. 2009;160(3):642-4.
- 95 Blome C, Radtke MA, Eissing L, Augustin M. Quality of life in patients with atopic dermatitis: disease burden, measurement, and treatment benefit. *Am J Clin Dermatol*. 2016;17(2):163-9.
- 96 Lifschitz C. The impact of atopic dermatitis on quality of life. *Ann Nutr Metab*. 2015;66 Suppl 1:34-40.
- 97 Trier AM, Kim BS. Cytokine modulation of atopic itch. *Curr Opin Immunol*. 2018;54:7-12.

- 98 Kabashima K. New concept of the pathogenesis of atopic dermatitis: interplay among the barrier, allergy, and pruritus as a trinity. *J Dermatol Sci.* 2013;70(1):3-11.
- 99 Pavlis J, Yosipovitch G. Management of itch in atopic dermatitis. *Am J Clin Dermatol.* 2018;19(3):319-32.
- 100 Nakahara T, Kido-Nakahara M, Tsuji G, Furue M. Basics and recent advances in the pathophysiology of atopic dermatitis. *J Dermatol.* 2021;48(2):130-9.
- 101 Schmelz M. Itch and pain. *Neurosci Biobehav Rev.* 2010;34(2):171-6.
- 102 Andersen HH, Elberling J, Solvsten H, Yosipovitch G, Arendt-Nielsen L. Nonhistaminergic and mechanical itch sensitization in atopic dermatitis. *Pain.* 2017;158(9):1780-91.
- 103 Tominaga M, Ozawa S, Ogawa H, Takamori K. A hypothetical mechanism of intraepidermal neurite formation in NC/Nga mice with atopic dermatitis. *J Dermatol Sci.* 2007;46(3):199-210.
- 104 Tominaga M, Ozawa S, Tengara S, Ogawa H, Takamori K. Intraepidermal nerve fibers increase in dry skin of acetone-treated mice. *J Dermatol Sci.* 2007;48(2):103-11.
- 105 Kamo A, Tominaga M, Tengara S, Ogawa H, Takamori K. Inhibitory effects of UV-based therapy on dry skin-inducible nerve growth in acetone-treated mice. *J Dermatol Sci.* 2011;62(2):91-7.
- 106 Tominaga M, Ogawa H, Takamori K. Decreased production of semaphorin 3A in the lesional skin of atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 2008;158(4):842-4.

- 107 Yosipovitch G, Fleischer A. Itch associated with skin disease: advances in pathophysiology and emerging therapies. *Am J Clin Dermatol*. 2003;4(9):617-22.
- 108 Meng J, Moriyama M, Feld M, Buddenkotte J, Buhl T, Szöllösi A, et al. New mechanism underlying IL-31-induced atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(5):1677-89.e8.
- 109 Murota H, Izumi M, Abd El-Latif MI, Nishioka M, Terao M, Tani M, et al. Artemin causes hypersensitivity to warm sensation, mimicking warmth-provoked pruritus in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(3):671-82.e4.
- 110 Buddenkotte J, Stroh C, Engels IH, Moormann C, Shpacovitch VM, Seeliger S, et al. Agonists of proteinase-activated receptor-2 stimulate upregulation of intercellular cell adhesion molecule-1 in primary human keratinocytes via activation of NF-kappa B. *J Invest Dermatol*. 2005;124(1):38-45.
- 111 Aktar MK, Kido-Nakahara M, Furue M, Nakahara T. Mutual upregulation of endothelin-1 and IL-25 in atopic dermatitis. *Allergy*. 2015;70(7):846-54.
- 112 Onoue A, Kabashima K, Kobayashi M, Mori T, Tokura Y. Induction of eosinophil- and Th2-attracting epidermal chemokines and cutaneous late-phase reaction in tape-stripped skin. *Exp Dermatol*. 2009;18(12):1036-43.
- 113 Champion M, Smith L, Gatault S, Métais C, Buddenkotte J, Steinhoff M. Interleukin-4 and interleukin-13 evoke scratching behaviour in mice. *Exp Dermatol*. 2019;28(12):1501-4.

- 114 Otsuka A, Tanioka M, Nakagawa Y, Honda T, Ikoma A, Miyachi Y, et al. Effects of cyclosporine on pruritus and serum IL-31 levels in patients with atopic dermatitis. *Eur J Dermatol*. 2011;21(5):816-7.
- 115 Feld M, Garcia R, Buddenkotte J, Katayama S, Lewis K, Muirhead G, et al. The pruritus- and TH2-associated cytokine IL-31 promotes growth of sensory nerves. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(2):500-8.e24.
- 116 Wilson SR, The L, Batia LM, Beattie K, Katibah GE, McClain SP, et al. The epithelial cell-derived atopic dermatitis cytokine TSLP activates neurons to induce itch. *Cell*. 2013;155(2):285-95.
- 117 Misery L. [TSLP, the key of pruritus in atopic dermatitis]. *Med Sci (Paris)*. 2014;30(2):142-4.
- 118 Simpson EL, Parnes JR, She D, Crouch S, Rees W, Mo M, et al. Tezepelumab, an anti-thymic stromal lymphopoietin monoclonal antibody, in the treatment of moderate to severe atopic dermatitis: A randomized phase 2a clinical trial. *J Am Acad Dermatol*. 2019;80(4):1013-21.
- 119 Eichenfield LF, Tom WL, Berger TG, Krol A, Paller AS, Schwarzenberger K, et al. Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: section 2. Management and treatment of atopic dermatitis with topical therapies. *J Am Acad Dermatol*. 2014;71(1):116-32.
- 120 Sidbury R, Davis DM, Cohen DE, Cordoro KM, Berger TG, Bergman JN, et al. Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: section 3. Management and treatment with phototherapy and systemic agents. *J Am Acad Dermatol*. 2014;71(2):327-49.

- 121 Wollenberg A, Barbarot S, Bieber T, Christen-Zaech S, Deleuran M, Fink-Wagner A, et al. Consensus-based European guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) in adults and children: part II. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2018;32(6):850-78.
- 122 Worm M, Francuzik W, Kraft M, Alexiou A. Modern therapies in atopic dermatitis: biologics and small molecule drugs. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2020;18(10):1085-92.
- 123 Blauvelt A, de Bruin-Weller M, Gooderham M, Cather JC, Weisman J, Pariser D, et al. Long-term management of moderate-to-severe atopic dermatitis with dupilumab and concomitant topical corticosteroids (LIBERTY AD CHRONOS): a 1-year, randomised, double-blinded, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2017;389(10086):2287-303.
- 124 Simpson EL, Bruin-Weller M, Flohr C, Arden-Jones MR, Barbarot S, Deleuran M, et al. When does atopic dermatitis warrant systemic therapy? Recommendations from an expert panel of the International Eczema Council. *J Am Acad Dermatol*. 2017;77(4):623-33.
- 125 Hashkes PJ, Becker ML, Cabral DA, Laxer RM, Paller AS, Rabinovich CE, et al. Methotrexate: new uses for an old drug. *J Pediatr*. 2014;164(2):231-6.
- 126 Holliday AC, Moody MN, Berlingeri-Ramos A. Methotrexate: role of treatment in skin disease. *Skin Therapy Lett*. 2013;18(3):4-9.
- 127 Cecchino GN, Araujo Junior E, Elito Junior J. Methotrexate for ectopic pregnancy: when and how. *Arch Gynecol Obstet*. 2014;290(3):417-23.
- 128 Kalb RE, Strober B, Weinstein G, Lebwohl M. Methotrexate and psoriasis: 2009 National Psoriasis Foundation Consensus Conference. *J Am Acad Dermatol*. 2009;60(5):824-37.

- 129 Bangert CA, Costner MI. Methotrexate in dermatology. *Dermatol Ther.* 2007;20(4):216-28.
- 130 Chan ES, Cronstein BN. Mechanisms of action of methotrexate. *Bull Hosp Jt Dis* (2013). 2013;71 Suppl 1:S5-8.
- 131 Bressan AL, Silva RS, Fontenelle E, Gripp AC. [Immunosuppressive agents in Dermatology]. *An Bras Dermatol.* 2010;85(1):9-22.
- 132 Dogra S, Mahajan R. Systemic methotrexate therapy for psoriasis: past, present and future. *Clin Exp Dermatol.* 2013;38(6):573-88.
- 133 Meephansan J, Ruchusatsawat K, Sindhupak W, Thorner PS, Wongpiyabovorn J. Effect of methotrexate on serum levels of IL-22 in patients with psoriasis. *Eur J Dermatol.* 2011;21(4):501-4.
- 134 Yelamos O, Puig L. Systemic methotrexate for the treatment of psoriasis. *Expert Rev Clin Immunol.* 2015;11(5):553-63.
- 135 Barker J, Horn EJ, Lebwohl M, Warren RB, Nast A, Rosenberg W, et al. Assessment and management of methotrexate hepatotoxicity in psoriasis patients: report from a consensus conference to evaluate current practice and identify key questions toward optimizing methotrexate use in the clinic. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2011;25(7):758-64.
- 136 Maybury CM, Jabbar-Lopez ZK, Wong T, Dhillon AP, Barker JN, Smith CH. Methotrexate and liver fibrosis in people with psoriasis: a systematic review of observational studies. *Br J Dermatol.* 2014;171(1):17-29.
- 137 Werfel T, Heratizadeh A, Aberer W, Ahrens F, Augustin M, Biedermann T, et al. Update "Systemic treatment of atopic dermatitis" of the S2k-guideline on atopic dermatitis. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2021;19(1):151-68.

- 138 Cooper KD. New therapeutic approaches in atopic dermatitis. *Clin Rev Allergy*. 1993;11(4):543-59.
- 139 Goujon C, Berard F, Dahel K, Guillot I, Hennino A, Nosbaum A, et al. Methotrexate for the treatment of adult atopic dermatitis. *Eur J Dermatol*. 2006;16(2):155-8.
- 140 Weatherhead SC, Wahie S, Reynolds NJ, Meggitt SJ. An open-label, dose-ranging study of methotrexate for moderate-to-severe adult atopic eczema. *Br J Dermatol*. 2007;156(2):346-51.
- 141 Zoller L, Ramon M, Bergman R. Low dose methotrexate therapy is effective in late-onset atopic dermatitis and idiopathic eczema. *Isr Med Assoc J*. 2008;10(6):413-4.
- 142 Lyakhovitsky A, Barzilai A, Heyman R, Baum S, Amichai B, Solomon M, et al. Low-dose methotrexate treatment for moderate-to-severe atopic dermatitis in adults. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010;24(1):43-9.
- 143 Deo M, Yung A, Hill S, Rademaker M. Methotrexate for treatment of atopic dermatitis in children and adolescents. *Int J Dermatol*. 2014;53(8):1037-41.
- 144 Dvorakova V, O'Regan GM, Irvine AD. Methotrexate for severe childhood atopic dermatitis: clinical experience in a tertiary center. *Pediatr Dermatol*. 2017;34(5):528-34.
- 145 Roekevisch E, Leeflang MMG, Schram ME, Campbell LE, Irwin McLean WH, Kezic S, et al. Patients with atopic dermatitis with filaggrin loss-of-function mutations show good but lower responses to immunosuppressive treatment. *Br J Dermatol*. 2017;177(6):1745-6.

- 146 Shah N, Alhusayen R, Walsh S, Shear NH. Methotrexate in the treatment of moderate to severe atopic dermatitis: a retrospective study. *J Cutan Med Surg*. 2018;22(5):484-7.
- 147 Delcasso B, Goujon C, Hacard F, Delcroix F, Grande S, Berard F, et al. Tolerance of methotrexate in a daily practice cohort of adults with atopic dermatitis. *Eur J Dermatol*. 2018;28(2):266-7.
- 148 Taieb Y, Baum S, Ben Amitai D, Barzilai A, Greenberger S. The use of methotrexate for treating childhood atopic dermatitis: a multicenter retrospective study. *J Dermatolog Treat*. 2019;30(3):240-4.
- 149 Anderson K, Putterman E, Rogers RS, Patel D, Treat JR, Castelo-Soccio L. Treatment of severe pediatric atopic dermatitis with methotrexate: A retrospective review. *Pediatr Dermatol*. 2019;36(3):298-302.
- 150 Drucker AM, Ellis AG, Bohdanowicz M, Mashayekhi S, Yiu ZZN, Rochweg B, et al. Systemic immunomodulatory treatments for patients with atopic dermatitis: a systematic review and network meta-analysis. *JAMA Dermatol*. 2020;156(6):659-67.
- 151 Roekevisch E, Szegedi K, Hack DP, Schram ME, Res P, Bos JD, et al. Effect of immunosuppressive treatment on biomarkers in adult atopic dermatitis patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020;34(7):1545-54.
- 152 Schram ME, Roekevisch E, Leeflang MM, Bos JD, Schmitt J, Spuls PI. A randomized trial of methotrexate versus azathioprine for severe atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128(2):353-9.
- 153 Gerbens LAA, Hamann SAS, Brouwer MWD, Roekevisch E, Leeflang MMG, Spuls PI. Methotrexate and azathioprine for severe atopic dermatitis: a 5-year follow-up study of a randomized controlled trial. *Br J Dermatol*. 2018;178(6):1288-96.

- 154 Roekevisch E, Schram ME, Leeflang MMG, Brouwer MWD, Gerbens LAA, Bos JD, et al. Methotrexate versus azathioprine in patients with atopic dermatitis: 2-year follow-up data. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(2):825-7.e10.
- 155 El-Khalawany MA, Hassan H, Shaaban D, Ghonaim N, Eassa B. Methotrexate versus cyclosporine in the treatment of severe atopic dermatitis in children: a multicenter experience from Egypt. *Eur J Pediatr*. 2013;172(3):351-6.
- 156 Tsakok T, Flohr C. Methotrexate vs. ciclosporin in the treatment of severe atopic dermatitis in children: a critical appraisal. *Br J Dermatol*. 2014;170(3):496-8; discussion 8-9.
- 157 Law Ping Man S, Bouzille G, Beneton N, Safa G, Dupuy A, Droitcourt C. Drug survival and postdrug survival of first-line immunosuppressive treatments for atopic dermatitis: comparison between methotrexate and cyclosporine. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2018;32(9):1327-35.
- 158 Goujon C, Viguier M, Staumont-Salle D, Bernier C, Guillet G, Lahfa M, et al. Methotrexate versus cyclosporine in adults with moderate-to-severe atopic dermatitis: A Phase III Randomized Noninferiority Trial. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2018;6(2):562-9.e3.
- 159 Reich A, Heisig M, Phan NQ, Taneda K, Takamori K, Takeuchi S, et al. Visual analogue scale: evaluation of the instrument for the assessment of pruritus. *Acta Derm Venereol*. 2012;92(5):497-501.
- 160 Prasad K, Prabhu GK. Image analysis tools for evaluation of microscopic views of immunohistochemically stained specimen in medical research-a review. *J Med Syst*. 2012;36(4):2621-31.

- 161 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
- 162 Mortz CG, Andersen KE, Dellgren C, Barington T, Bindslev-Jensen C. Atopic dermatitis from adolescence to adulthood in the TOACS cohort: prevalence, persistence and comorbidities. *Allergy*. 2015;70(7):836-45.
- 163 Orfali RL, Shimizu MM, Takaoka R, Zaniboni MC, Ishizaki AS, Costa AA, et al. Atopic dermatitis in adults: clinical and epidemiological considerations. *Rev Assoc Med Bras*. 2013;59(3):270-5.
- 164 Roekevisch E, Spuls PI, Kuester D, Limpens J, Schmitt J. Efficacy and safety of systemic treatments for moderate-to-severe atopic dermatitis: a systematic review. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(2):429-38.
- 165 Trzeciak M, Glen J, Bandurski T, Sokolowska-Wojdylo M, Wilkowska A, Roszkiewicz J. Relationship between serum levels of interleukin-18, IgE and disease severity in patients with atopic dermatitis. *Clin Exp Dermatol*. 2011;36(7):728-32.
- 166 Liu FT, Goodarzi H, Chen HY. IgE, mast cells, and eosinophils in atopic dermatitis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2011;41(3):298-310.
- 167 Kanwar AJ, Narang T. Adult onset atopic dermatitis: Under-recognized or under-reported? *Indian Dermatol Online J*. 2013;4(3):167-71.
- 168 Napolitano M, Megna M, Patruno C, Gisondi P, Ayala F, Balato N. Adult atopic dermatitis: a review. *G Ital Dermatol Venereol*. 2016;151(4):403-11.

- 169 Ogawa H, Yoshiike T. Atopic dermatitis: studies of skin permeability and effectiveness of topical PUVA treatment. *Pediatr Dermatol*. 1992;9(4):383-5.
- 170 Brenninkmeijer EE, Spuls PI, Lindeboom R, van der Wal AC, Bos JD, Wolkerstorfer A. Excimer laser vs. clobetasol propionate 0.05% ointment in prurigo form of atopic dermatitis: a randomized controlled trial, a pilot. *Br J Dermatol*. 2010;163(4):823-31.
- 171 Guttman-Yassky E, Bissonnette R, Ungar B, Suárez-Fariñas M, Ardeleanu M, Esaki H, et al. Dupilumab progressively improves systemic and cutaneous abnormalities in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;143(1):155-72.
- 172 Bissonnette R, Pavel AB, Diaz A, Werth JL, Zang C, Vranic I, et al. Crisaborole and atopic dermatitis skin biomarkers: An inpatient randomized trial. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;144(5):1274-89.
- 173 Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000;182(3):311-22.
- 174 Fedenko ES, Elisyutina OG, Filimonova TM, Boldyreva MN, Burmenskaya OV, Rebrova OY, et al. Cytokine gene expression in the skin and peripheral blood of atopic dermatitis patients and healthy individuals. *Self Nonself*. 2011;2(2):120-4.
- 175 Zheng X, Nakamura K, Furukawa H, Nishibu A, Takahashi M, Tojo M, et al. Demonstration of TARC and CCR4 mRNA expression and distribution using in situ RT-PCR in the lesional skin of atopic dermatitis. *J Dermatol*. 2003;30(1):26-32.

- 176 Furue M, Yamamura K, Kido-Nakahara M, Nakahara T, Fukui Y. Emerging role of interleukin-31 and interleukin-31 receptor in pruritus in atopic dermatitis. *Allergy*. 2018;73(1):29-36.
- 177 Hermanns HM. Oncostatin M and interleukin-31: Cytokines, receptors, signal transduction and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2015;26(5):545-58.
- 178 Edukulla R, Singh B, Jegga AG, Sontake V, Dillon SR, Madala SK. Th2 cytokines augment IL-31/IL-31RA interactions via STAT6-dependent IL-31RA expression. *J Biol Chem*. 2015;290(21):13510-20.

8 ANEXOS

8 ANEXOS

Anexo 1: Carta de aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq do HC-FMUSP.

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

PROJETO DE PESQUISA

Título: AVALIAÇÃO DO EFEITO DO METOTREXATO NA SECREÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS ENVOLVIDAS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DA DERMATITE ATÓPICA DO ADULTO

Pesquisador Responsável: Valéria Aoki **Versão:** 2

Pesquisador Executante: Luciana de Paula Samorano **CAAE:** 43715315.9.0000.0068

Coautores: Raquel Leão Orfali, Maria Notomi Sato

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Orientador: Valéria Aoki

Instituição: HCFMUSP

Departamento: DERMATOLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 13368

Número do Parecer: 1.076.644

Data da Relatoria: 20/05/2015

Apresentação do Projeto: Adequada.

Objetivo da Pesquisa: Avaliar o efeito do metotrexato no perfil da secreção de citocinas e quimiocinas envolvidas no processo inflamatório da dermatite atópica do adulto.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Considero que há riscos para o paciente porque o metotrexato não é o tratamento tradicional para a dermatite atópica, porém pode oferecer benefícios se o paciente for responsivo a esse tratamento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Não há.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: O pesquisador realizou as modificações no Termo de Consentimento.

Recomendações: Não há.

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE:.....SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

**AValiação DO EFEITO DO METOTREXATO NA SECREÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS
ENVOLVIDAS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DA DERMATITE ATÓPICA DO ADULTO**

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **“Avaliação do efeito do metotrexato na secreção de citocinas e quimiocinas envolvidas na resposta inflamatória da dermatite atópica do adulto”.**
PESQUISADOR: ..Valéria Aoki.....
CARGO/FUNÇÃO: Professor Doutor e Médica Associada.....
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº .. 60.080.....
UNIDADE DO HCFMUSP: Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.....
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
RISCO MÍNIMO ()	RISCO MÉDIO (x)
RISCO BAIXO ()	RISCO MAIOR ()
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : ..2 (dois) anos.....

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**1 – Desenho do estudo e objetivo(s)**

Este estudo tem como objetivo principal avaliar o efeito do metotrexato no tratamento de doentes adultos com dermatite atópica moderada à grave. A dermatite atópica ou eczema é uma doença crônica, que, frequentemente, começa na infância, e causa coceiras e feridas na pele. Geralmente está associada com asma e rinite alérgica. A maioria dos pacientes melhora com a idade, mas uma minoria continua a ter a dermatite durante a vida adulta.

O metotrexato é um remédio indicado no tratamento de pacientes com dermatite atópica com lesões mais extensas e com pouca melhora com o tratamento convencional, ou seja, corticoide e imunomoduladores tópicos (tacrolimo e pimecrolimo), hidratantes e anti-histamínicos por via oral. Trata-se de um medicamento usado desde a década de 40, o que faz com que os médicos atualmente já conheçam muito bem como ele deve ser utilizado e como monitorizar seus possíveis efeitos colaterais.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros:

O Sr(a) está sendo convidado a participar, voluntariamente, deste estudo que visa avaliar o efeito do metotrexato no tratamento da dermatite atópica.

Após sua seleção para este estudo e se o(a) senhor(a) concordar em participar dele, o(a) senhor(a) será abordado durante sua consulta de rotina no ambulatório, aonde o(a) senhor(a) será convidado(a) a responder um questionário sobre sua doença e suas comorbidades (outras doenças que possui). Será ainda feito um exame físico geral para verificar quais partes do corpo estão mais comprometidas.

Se for selecionado para utilizar o metotrexato, será necessário realizar radiografia de tórax (RX de tórax) e coleta de urina tipo I antes de iniciar o tratamento, e exames de sangue antes e durante o tratamento. Será solicitado seu comparecimento em sete visitas, com a seguinte periodicidade: semana inicial, semana 2, semana 4, semana 8, semana 12, semana 16 e semana 24. Em todas, será solicitada coleta de exames de sangue para monitorização dos possíveis efeitos colaterais do remédio.

Na primeira semana do estudo, será realizada introdução do remédio metotrexato, por via oral (por boca). Este remédio será mantido até o final do estudo, se não houver necessidade de retirada antes. Será, ainda, associado ácido fólico, por via oral, nos dias sem a ingestão do metotrexato.

Para participar do estudo:

O senhor concorda em realizar a coleta de exames de sangue para o estudo na semana inicial, na semana 12 e na semana 24?

O senhor concorda também em realizar biópsias de pele, que consistem em retirar um pequeno pedacinho da pele, do local aonde tem ferida e outro aonde não tem, no início e no final do estudo (semana 24)?

As regiões do corpo selecionadas para biópsia serão, preferencialmente, membros (braços, antebraços, coxas e pernas), nunca no rosto ou no colo. Serão usados “punchs” número 4 para a realização das mesmas. Os “punchs” são instrumentos próprios para biópsia, que retiram amostras arredondadas da pele com tamanho padrão, neste caso, com 4 mm de diâmetro.

Os exames serão feitos no Laboratório do LIM-56 (Faculdade de Medicina da USP) e na Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, sem nenhum custo para o paciente, que pode aproveitar o dia das consultas para colher os exames de sangue e realizar as biópsias de pele. Os pacientes continuarão a ser acompanhados no Ambulatório de Dermatite

Atópica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. Se houver a necessidade de mais algum exame, o paciente que concordar com o estudo poderá ser ainda convocado, via telefone ou carta, para vir a uma consulta, mesmo antes do seu retorno, e terá toda a informação e assistência que precisar. Todos os pacientes terão acesso aos resultados de seus exames no momento em que quiserem e com as explicações necessárias para seu entendimento.

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

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada a sua participação. Em caso de dano pessoal diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante terá direito a tratamento médico na Instituição.

Possíveis desconfortos e riscos esperados:

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

2. Biópsia de pele: Será realizada biópsia na pele sob anestesia local. Durante o procedimento, o paciente poderá sentir dor mínima no momento da aplicação da anestesia, parecida com uma picada de formiga. Algumas pessoas podem, às vezes, sentir tonturas ou até desmaio durante o procedimento e, mais raramente, pode haver infecção no local em que foi realizada a biópsia. Caso haja algum desconforto no local da biópsia, o voluntário deverá entrar em contato com a Dra. Luciana de Paula Samorano pelos telefones (11) 2661-6050 ou (11) 2661-6111.

3. Pelo uso do remédio metotrexato:

Alguns remédios podem interagir com o metotrexato e não devem ser utilizadas durante o seu tratamento com esse medicamento: ácido acetilsalicílico (AAS), anti-inflamatórios não hormonais, sulfonamidas, dipiridamol, probenecida, cloranfenicol, fenotiazinas, fenitoína, tetraciclina, dapsona, sulfametoxazol-trimetoprima, sulfonamídicos. Dessa forma, antes de iniciar o uso de qualquer outra medicação, consulte o médico do estudo.

O metotrexato possui possíveis efeitos colaterais, como náuseas, diarreia, aparecimento de espinhas, alterações no fígado, anemia, diminuição dos glóbulos brancos, diminuição das plaquetas, aparecimento de feridas na boca, e outros mais raros. Todos eles serão monitorizados durante o seu tratamento.

Além disso, o metotrexato é droga teratogênica (produz defeitos nos fetos) e abortiva (leva ao aborto), afetando ainda os processos de produção dos óvulos e de produção dos espermatozoides. Desta forma, quando há desejo de engravidar, a medicação deve ser suspensa, para mulheres, por pelo menos quatro meses antes de ela engravidar; e, para o homem, por pelo menos três meses antes.

Se você for mulher e tiver potencial para engravidar, mas não desejar engravidar, você poderá participar deste estudo. Porém, é muito importante observar sinais de que você possa estar grávida e é necessário que você tome precauções para não engravidar. A equipe médica do estudo aconselhará você sobre quais formas de contracepção (prevenção de gravidez) são aceitáveis para este estudo e quando e por quanto tempo você deve usar a contracepção. O médico do estudo exigirá também que as mulheres com potencial para engravidar que entrarem no estudo façam testes de gravidez durante o estudo. O teste de gravidez não evita que você engravide. Se você achar que está grávida durante o estudo, você deverá dizer ao médico do estudo imediatamente. Se você engravidar enquanto estiver no estudo, você receberá acompanhamento até o parto ou interrupção da gravidez. Sua gravidez será acompanhada até o fim, e para que isso aconteça, o médico do estudo poderá manter contato com seu obstetra (ou o médico apropriado) a fim de descobrir informações relevantes sobre sua gravidez e sobre o seu bebê.

Se você for homem, você também não poderá engravidar sua parceira durante o tratamento com metotrexato e por um período mínimo de três meses após a suspensão dessa medicação.

O médico do estudo poderá compartilhar essas informações com o Comitê de Ética que analisar esse estudo, com relação aos direitos e à segurança dos participantes.

3- Benefícios que poderão ser obtidos:

O paciente que participar do estudo poderá beneficiar-se ou não do estudo. O paciente que usar o metotrexato pode beneficiar-se, por meio da melhora da coceira e das suas lesões de pele. Pode ser que sejam obtidas respostas para algumas dúvidas que existem sobre o eczema atópico e o tratamento com metotrexato ou simplesmente descobriremos algum dado novo que possa contribuir com futuras pesquisas sobre este assunto.

4- Procedimentos alternativos:

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

5 - Garantia de acesso:

Em qualquer etapa do estudo, o(a) senhor(a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Valéria Aoki e a pesquisadora executante a Dra. Luciana de Paula Samorano, que podem ser encontradas no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255, 3º. Andar – Dermatologia, CEP: 05403-000, Telefone(s) (11) 2661-7936 ou 2661-8036. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442, ramais 16, 17 e 18, e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br.

6 - Confidencialidade e liberação dos registros médicos:

Apenas os médicos envolvidos no estudo terão, além do próprio paciente, acesso aos resultados dos exames, bem como à identificação dos mesmos. Em nenhum momento do estudo, o paciente será identificado pelo nome e também em nenhuma publicação resultante do estudo em questão. Os dados e materiais obtidos nessa pesquisa poderão ser utilizados em futuros estudos do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo apenas se vinculados ao mesmo assunto dessa pesquisa.

7 - Participação:

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

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: **“Avaliação do efeito do metotrexato na secreção de citocinas e quimiocinas envolvidas na resposta inflamatória da dermatite atópica do adulto”**.

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

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

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

(Somente para o responsável do projeto)

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

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

Anexo 3: Escore de gravidade EASI (*Eczema Area and Severity Index*).

Nome: _____

EASI

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

Adultos:

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

Porcentagem de área envolvida par cada uma das 4 regiões:

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

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

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

Total:

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

Anexo 4: Escore de gravidade SCORAD (*SCOring Atopic Dermatitis*).**SCORAD**Ambulatório de Dermatite ~~Atópica~~ do Hospital das Clínicas da FMUSPConsulta: Dia Mês Ano

--	--	--	--	--

Nome: _____

RG: _____

Data de nascimento: Dia Mês Ano

--	--	--	--	--	--

Iniciais:

--	--	--	--

A. Extensão:

--

B. Intensidade:

--

C. Sintomas subjetivos: Prurido + Perda de sono

--

Critérios	Intensidade	Métodos de cálculo
Eritema		ITENS DE INTENSIDADE (Área Representativa) 0 - ausente 1 - leve 2 - moderada 3 - grave
Edema / formação de pápulas		
Exsudação / crostas		
Escoriação		
<u>Liquenificação</u>		* A xerose é avaliada nas áreas não envolvidas
Xerose		

Prurido

--

Perda do Sono

--

SCORAD = $A/5 + 7B/2 + C$

--

Anexo 5: Tabela 2.**Tabela 2** - Distribuição dos pacientes com dermatite atópica conforme dados demográficos, antecedentes pessoais de doenças atópicas respiratórias, escores de gravidade segundo a semana inicial, semana 12 e semana 24 do tratamento com metotrexato e IgE sérica inicial e na semana 24 de tratamento

Identificação	Gênero	Idade (anos)	AP de atopia respiratória	EASI inicial	EASI sem 12	EASI sem 24	SCORAD sem inicial	SCORAD sem 12	SCORAD sem 24	IgE (UI/mL) sem inicial	IgE (UI/mL) sem 24
PC1	M	39	rinite	22,1	4,8	6,0	47,9	24,0	19,6	14.918	2.500
PC2	M	25	asma, rinite	18,7	7,2	6,8	47,1	32,6	31,7	50.000	22.886
PC3	H	18	asma	32,4	12,2	14,3	56,2	45,1	40,9	20.446	2.500
PC4	H	33	rinite	18,4	9,8	6,0	49,6	34,3	21,9	36.700	2.500
PC5	M	20	asma, rinite	23,4	3,2	8,0	53,8	25,4	30,8	23.862	10.873
PC6	H	20	asma, rinite	31,8	13,4	29,6	59,7	26,6	57,7	2.161	23.853
PC7	H	33	asma, rinite	31,2	22,3	7,2	52,1	39,1	23,6	50.000	25.000
PC8	M	25	asma	38,9	36,4	30,5	68,3	65,8	48,3	2.500	4.766
PC9	H	29	rinite	46,0	31,8	33,1	64,8	49,9	54,6	22.443	16.836
PC10	H	28	asma, rinite	14,7	11,4	7,4	53,8	38,5	37,4	6.859	2.484
PC11	M	31	asma, rinite	41,6	28,7	16,3	64,5	46,2	46,7	21.469	2.500
PC12	M	21	asma, rinite	27,2	16,8	20,1	68,8	46,4	42,9	24.234	25.313

PC: paciente; M: mulher; H: homem; AP: antecedente pessoal; EASI: *Eczema Area Severity Index*; SCORAD: *SCORing Atopic Dermatitis*.

Anexo 6: Tabela 3.**Tabela 3** - Dados demográficos do grupo controle não-atópico

Identificação	Gênero	Idade
C1	M	32
C2	M	29
C3	M	28
C4	M	27
C5	H	28
C6	H	30
C7	H	28
C8	H	29
C9	H	39
C10	M	31

C: controle; M: mulher; H: homem.

Anexo 7: Tabela 4.

Tabela 4 - Comparação dos marcadores IL-31, IL-31RA, OSMR, TSLP e Ki-67, pela técnica de imunoistoquímica, entre pele com lesão de pacientes com dermatite atópica (DA) antes do tratamento com metrotexato (MTX) e o grupo controle

	Marcador				
	IL-31	IL-31RA	OSMR	TSLP	Ki-67
Epid A+/MB					
DA com lesão pré-MTX	0,166±0,326	1,73±2,54	1,37±1,19	3,68±7,57	78,49±21,15
Controles	0,152±0,243	13,33±8,27	1,91±1,71	6,50±17,47	24,4±8,63
Diferença	-0,014 (-0,283 0,081)	11,61 (7,94 15,94)	0,535 (-0,45 1,57)	2,82 (-2,98 11,99)	-54,09 (-71,61 -49,28)
DS A+/AT					
DA com lesão pré-MTX	0,001±0,002	0,021±0,033	0,020±0,025	0,023±0,025	228,2±176,7
Controles	0,001±0,001	0,019±0,007	0,009±0,005	0,035±0,034	6,94±15,46
Diferença	-0,001 (-0,002 0,000)	-0,002 (-0,023 0,008)	-0,011 (-0,023 0,001)	0,013 (-0,006 0,028)	-221,3 (-344,7 -164,5)

Valores medianos ± DIQ (diferença interquartil), diferença mediana (Controles menos DA com lesão pré-MTX) e, entre parênteses, intervalo de confiança 95%. Diferenças significativas em negrito. Epid A+/MB: relação entre a área positiva na epiderme (epid) e o comprimento da membrana basal da epiderme, expressa em $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$; DS A+/AT: relação entre a área positiva na derme superficial (DS) e a área total da DS, expressa em $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$. OBS: Para o anticorpo anti-Ki-67, avaliou-se o número de células positivas e não a área positiva e as relações foram expressas em: células+/mm na epiderme e células +/mm² na derme superficial.

Anexo 8: Tabela 5.

Tabela 5 - Comparação dos marcadores IL-31, IL-31RA, OSMR, TSLP e Ki-67, pela técnica de imunistoquímica, entre pele lesada dos pacientes com dermatite atópica (DA) antes e após o tratamento com metrotexato (MTX)

	Marcador				
	IL-31	IL-31RA	OSMR	TSLP	Ki-67
Epid A+/MB					
DA com lesão pré-MTX	0,166±0,326	1,73±2,54	1,37±1,19	3,68±7,57	78,49±21,15
DA com lesão pós-MTX	0,293±0,639	3,87±4,56	1,23±1,12	3,89±4,28	85,88±57,96
Diferença	0,072 (-0,084 0,556)	2,14 (-0,14 5,51)	-0,322 (-1,057 0,619)	-0,537 (-5,603 0,851)	10,63 (-37,98 35,37)
DS A+/AT					
DA com lesão pré-MTX	0,002±0,002	0,021±0,033	0,020±0,025	0,023±0,025	228,2±176,7
DA com lesão pós-MTX	0,003±0,003	0,044±0,034	0,012±0,010	0,021±0,034	136,0±179,2
Diferença	0,001 (-0,001 0,002)	0,017 (-0,004 0,030)	-0,010 (-0,013 0,003)	-0,004 (-0,012 0,040)	-105,6 (-178,7 57,27)

Valores medianos ± DIQ (diferença interquartil), diferença mediana (DA com lesão pós-MTX menos DA com lesão pré-MTX) e, entre parênteses, intervalo de confiança 95%. Diferenças significativas em negrito. Epid A+/MB: relação entre a área positiva na epiderme (epid) e o comprimento da membrana basal da epiderme, expressa em $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$; DS A+/AT: relação entre a área positiva na derme superficial (DS) e a área total da derme superficial, expressa em $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$. OBS: Para o anticorpo anti-Ki-67, avaliou-se o número de células positivas e não a área positiva e as relações foram expressas em: células+/mm na epiderme e células +/mm² na derme superficial.

Anexo 9: Tabela 6.

Tabela 6 - Comparação dos marcadores IL-31, IL-31RA, OSMR, TSLP e Ki-67, pela técnica de imunoistoquímica, entre pele com lesão e sem lesão nos pacientes com dermatite atópica (DA) antes do tratamento com metotrexato (MTX)

	Marcador				
	IL-31	IL-31RA	OSMR	TSLP	Ki-67
Epid A+/MB					
DA sem lesão pré-MTX	0,151±0,190	5,33±2,05	2,22±3,09	1,56±3,72	50,95±27,44
DA com lesão pré-MTX	0,166±0,326	1,73±2,54	1,37±1,19	3,68±7,57	78,49±21,15
Diferença	0,011 (-0,055 0,256)	-3,07 (-4,74 -1,97)	-0,67 (-1,75 0,47)	3,34 (-3,18 7,50)	20,92 (8,51 62,21)
DS A+/AT					
DA sem lesão pré-MTX	0,0011±0,0012	0,020±0,008	0,011±0,010	0,021±0,024	44,95±75,26
DA com lesão pré-MTX	0,0019±0,0015	0,021±0,033	0,020±0,0247	0,023±0,025	228,2±176,7
Diferença	0,001 (0,000 0,002)	-0,003 (-0,015 0,029)	0,012 (-0,003 0,019)	-0,001 (-0,011 0,006)	196,3 (111,4 220,2)

Valores medianos ± DIQ (diferença interquartil), diferença mediana (DA com lesão pré-MTX menos DA sem lesão pré-MTX) e, entre parênteses, intervalo de confiança 95%. Diferenças significativas em negrito. Epid A+/MB: relação entre a área positiva na epiderme (epid) e o comprimento da membrana basal da epiderme, expressa em $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$; DS A+/AT: relação entre a área positiva na derme superficial (DS) e a área total da derme superficial, expressa em $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$. OBS: Para o anticorpo anti-Ki-67, avaliou-se o número de células positivas e não a área positiva e as relações foram expressas em: células+/mm na epiderme e células +/mm² na derme superficial.

Anexo 10: Tabela 7.

Tabela 7 - Comparação dos marcadores IL-31, IL-31RA, OSMR, TSLP e Ki-67, pela técnica de imunoistoquímica, entre pele com lesão e sem lesão nos pacientes com dermatite atópica (DA) após o tratamento com metrotexato (MTX)

	Marcador				
	IL-31	IL-31RA	OSMR	TSLP	Ki-67
Epid A+/MB					
DA sem lesão pós-MTX	0,210±0,782	8,56±6,53	2,10±4,33	0,93±3,29	33,06±16,83
DA com lesão pós-MTX	0,293±0,639	3,87±4,56	1,23±1,12	3,89±4,28	85,88±57,96
Diferença	0,047 (-0,409 0,263)	-3,15 (-7,92 1,36)	-1,36 (-4,10 0,52)	1,87 (-0,12 3,71)	44,39 (18,44 77,5)
DS A+/AT					
DA sem lesão pós-MTX	0,002±0,003	0,023±0,013	0,012±0,012	0,024±0,034	20,66±68,82
DA com lesão pós-MTX	0,003±0,003	0,044±0,034	0,012±0,010	0,021±0,034	136,0±179,15
Diferença	0,001 (0,000 0,003)	0,010 (-0,003 0,039)	0,002 (-0,004 0,008)	0,007 (-0,037 0,025)	102,70 (36,25 280,20)

Valores medianos ± DIQ (diferença interquartil), diferença mediana (DA com lesão pós-MTX menos DA sem lesão pós-MTX) e, entre parênteses, intervalo de confiança 95%. Diferenças significativas em negrito. Epid A+/MB: relação entre a área positiva na epiderme (epid) e o comprimento da membrana basal da epiderme, expressa em $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$; DS A+/AT: relação entre a área positiva na derme superficial (DS) e a área total da derme superficial, expressa em $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$. OBS: Para o anticorpo anti-Ki-67, avaliou-se o número de células positivas e não a área positiva e as relações foram expressas em: células+/mm na epiderme e células +/mm² na derme superficial.

9 APÊNDICE

Apêndice 1: Publicação: Samorano LP, Takaoka R, Zaniboni MC, Aoki V. Methotrexate for atopic dermatites in adults: a prospective study from a reference center in Brazil. J Dtsch Dermatol Ges. 2021 Feb;19(2):294-296.

Correspondence Clinical Letter

Clinical Letter

**Methotrexate for atopic dermatitis in adults:
a prospective study from a reference center in
Brazil**

DOI: 10.1111/ddg.14414

Dear Editors,

Atopic dermatitis (AD) is a chronic inflammatory skin disease with a high prevalence and multifactorial pathogenesis. It is frequently associated with elevated levels of circulating immunoglobulin (Ig) E and a personal and/or family history of atopy [1, 2]. Treatment of AD targets repair of the skin barrier and control of inflammation [3]. In patients with AD refractory to traditional therapy, methotrexate (MTX) may be an alternative treatment [4–6].

Methotrexate is an immunosuppressant drug with anti-inflammatory properties related to extracellular increase of adenosine; it exerts a role as an endogenous anti-inflammatory agent [7, 8].

Although many physicians have treated AD patients with off-label MTX for several years, there are few reports that evaluate the efficacy and safety of this medication on adult AD patients worldwide. This is a pioneer report regarding the situation in Brazil.

We conducted an open prospective study at the Department of Dermatology, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, BR. We included twelve adults with moderate to severe AD, who we treated with MTX for 24 weeks according to the criteria of Hanifin and Rajka. The study was approved by the local ethics committee (CAPESq 13368); ClinicalTrials.gov identifier NCT03327116. Eligibility criteria included age ≥ 18 years, EASI (Eczema Area and Severity Index) ≥ 7.1 ,

and SCORAD (SCORing Atopic Dermatitis) ≥ 25 . Women of childbearing potential were required to use effective birth control and provide a confirmed negative blood test for pregnancy prior to treatment. Exclusion criteria comprised diseases or conditions that contraindicated the use of MTX (e.g. hepatic impairment), HIV infection or other immunosuppressive condition, phototherapy, systemic corticosteroids, cyclosporine, azathioprine or immunobiologic therapy within twelve weeks prior to introduction of MTX.

The initial methotrexate dose (an oral test dose) was 7.5 mg in week 1, which was then increased to 15 mg weekly. Laboratory monitoring included a full blood count, liver enzymes, urea, and creatinine. Oral folic acid was administered once a week (5 mg), 48 to 72 hours after the ingestion of MTX. Throughout the treatment, the patients maintained the same topical medications (topical corticosteroids – *betamethasone valerate* cream [0.1 %] and hydrocortisone acetate cream [1.0 %], calcineurin inhibitors, and emollients) that they used for AD.

Patients were evaluated at weeks 1 and 24 of the study for circulating IgE levels (nephelometry method), and at weeks 1, 12 and 24 for EASI, SCORAD, and pruritus (visual analog pruritus scale; VAS).

After 24 weeks of treatment with MTX, the condition of all patients had improved (Figures 1, 2). There was a statistically significant reduction ($p < 0.05$) of EASI, SCORAD and pruritus, with a mean reduction of 46.7 %, 33.6 % and 39.1 %, respectively (Table 1), comparing week 24 to baseline.

The mean level of the patients' circulating IgE was $22,966.0 \pm 16,060.9$ IU/ml at baseline and $11,834.2 \pm 10,150.9$ IU/ml at week 24 of the protocol, and the difference was statistically significant ($p < 0.034$). Three of twelve patients had no reduction in circulating IgE levels and a lower reduction of severity scores throughout the treatment.

As drug-related side effects, we observed increased serum levels of glutamate-pyruvate transaminase ($n = 3$),

Figure 1 A twenty-five-year-old woman with atopic dermatitis, with multiple lesions of nummular and pruriginous pattern. Initial week of the protocol; EASI: 18.7 and SCORAD: 47.1 (a). After twelve weeks of treatment with methotrexate; EASI: 7.2 and SCORAD: 32.6 (b). After 24 weeks of treatment with methotrexate; EASI: 6.8 and SCORAD: 31.7 (c).