

LUIS EDUARDO AGNER MACHADO MARTINS

**Detecção de citocinas em culturas de linfócitos em
pacientes alérgicos ao cromo**

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

Programa: Dermatologia

Orientador: Dr. Vitor Manoel Silva dos Reis

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Martins, Luis Eduardo Agner Machado
Detecção de citocinas em culturas de linfócitos em pacientes alérgicos ao cromo /
Luis Eduardo Agner Machado Martins. -- São Paulo, 2010.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.
Orientador: Vitor Manoel Silva dos Reis.

Descritores: 1.Teste de proliferação linfocitária 2.Hipersensibilidade/diagnóstico
3.Cromo 4.Citocinas 5.Dermatite de contato

USP/FM/DBD-229/10

DEDICATÓRIA

**Aos meus pais pelo constante
auxílio, apoio e
incentivo**

.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof^o. Dr. Vitor Manoel Silva dos Reis que mais uma vez acreditou no meu potencial e contribuiu ativamente durante todo o desenvolvimento desse projeto.

Ao Prof^o. Dr. Evandro Rivitti e membros da comissão da pós-graduação do Departamento de Dermatologia que permitiram a continuidade do trabalho.

Ao Prof^o Dr. Alberto José da Silva Duarte, a Prof^a. Dra. Mirian Nacagami Sotto e demais integrantes do LIM-56 por apoiar e fornecer os meios para a realização da tese.

A Prof^a. Dra. Valéria Aoki e ao Prof^o. Dr. Paulo Ricardo Criado pela amizade, auxílio e orientações prestadas.

Ao Ricardo Spina Nunes pela dedicação e realização dos testes de contato.

A todos os demais professores, residentes e funcionários pela amizade e carinho.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de tabelas e gráficos

Resumo

Summary

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 01 |
| 2 OBJETIVOS | 06 |
| 3 REVISÃO DA LITERATURA | 07 |
| 3.1.1 Cromo..... | 07 |
| 3.1.2 Manifestações clínicas da DCA pelo cromo..... | 08 |
| 3.1.3 Prognóstico da DCA por cromo..... | 09 |
| 3.2 Patogênese da dermatite de contato alérgica..... | 10 |
| 3.2.1 Fase aferente | 12 |
| 3.2.2 Fase eferente | 15 |
| 3.2.3 Células envolvidas..... | 16 |
| 3.2.3.1 Células dendríticas..... | 16 |
| 3.2.3.1.1 As Células dendríticas na fase aferente..... | 17 |
| 3.2.3.1.2 As células dendríticas na fase eferente..... | 20 |
| 3.2.3.2 Linfócitos | 21 |
| 3.2.3.2.1 Linfócitos efetores..... | 21 |
| 3.2.3.2.2 Linfócitos T reguladores..... | 23 |
| 3.2.3.3 Queratinócitos..... | 26 |
| 3.2.3.4 Mastócitos..... | 28 |
| 3.2.3.5 Linfócitos B e células T NK..... | 28 |
| 4 Testes diagnósticos..... | 30 |
| 4.1 Teste de contato | 30 |
| 4.2 Teste de proliferação linfocitária..... | 31 |
| 4 MÉTODOS | 42 |
| 4.1 Seleção de pacientes..... | 42 |
| 4.2 Teste de contato..... | 43 |
| 4.3 Teste de proliferação linfocitária..... | 45 |
| 4.3.1 Teste de proliferação linfocitária para detecção da ativação celular pela taxa de captação de timidina radiomarcada..... | 47 |
| 4.3.2 Teste de proliferação linfocitária para detecção da ativação celular pela produção de citocinas | 49 |
| 4.4 Dosagem das citocinas no sobrenadante das culturas | 50 |
| 4.4.1 “Luminex liquichip array”..... | 50 |
| 4.4.2 Citocinas testadas | 52 |
| 4.4 Métodos estatísticos..... | 53 |
| 5 RESULTADOS | 54 |
| 5.1 Seleção dos grupos..... | 54 |
| 5.2 Testes de contato..... | 54 |

| | |
|--|------------|
| 5.3 Testes de proliferação linfocitária..... | 55 |
| 5.4 Detecção das citocinas | 57 |
| 5.4.1 Interferon-gama..... | 57 |
| 5.4.2 Interlucina-2..... | 59 |
| 5.4.3 Interlucina-4..... | 61 |
| 5.4.4 Interlucina-5..... | 63 |
| 5.4.5 Interlucina-10..... | 65 |
| 5.4.6 Interlucina-12..... | 67 |
| 5.4.7 Interlucina-13..... | 69 |
| 5.4.8 Interlucina-17..... | 71 |
| 5.4.9 RANTES..... | 73 |
| 5.5 Testes de coprrrelação..... | 75 |
| 6 DISCUSSÃO..... | 76 |
| 7 CONCLUSÕES..... | 86 |
| 8 ANEXOS..... | 87 |
| 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 100 |

LISTAS

Lista de Abreviaturas

| | |
|--------------------------------------|--|
| Ag = | Antígeno |
| C5 = | Fração C5 do complemento |
| C5a = | Fração C5a do complemento |
| CCL1 = | Quimiocina CCL1 |
| CCL5 = | Quimiocina CCL5 (RANTES) |
| CCL19 = | Quimiocina CCL19 |
| CCL21 = | Quimiocina CCL21 |
| CCR4 = | Receptor de quimiocina CCR4 |
| CCR7 = | Receptor de quimiocina CCR7 |
| CCR8 = | Receptor de quimiocina CCR8 |
| CD = | Célula dendrítica |
| CD1d = | Membro da família CD1 |
| CD4 ⁺ = | Antígeno CD4 |
| CD4 ⁺ CD25 ⁺ = | Célula T reguladora CD4 ⁺ CD25 ⁺ |
| CD8 ⁺ = | Antígeno CD8 |
| CD25 = | Antígeno CD25 |
| CD28 = | Antígeno CD28 |
| CD80 = | Antígeno CD80 |
| CD86 = | Antígeno CD86 |
| CD205 = | Antígeno CD205 |
| CLA = | Antígeno linfocitário cutâneo |
| CL = | Célula de Langerhans |

| | |
|---------------------|---|
| Cpm = | Contagens por minuto |
| Cr (III) = | Cromo trivalente |
| Cr (VI) = | Cromo hexavalente |
| CrCl ₃ = | Cloreto de cromo |
| CTLA-4 = | Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico |
| DC = | Dermatite de contato |
| DCA = | Dermatite de contato alérgica |
| DCI = | Dermatite |
| DNA = | Ácido desoxirribonucléico |
| DTH = | Reação de hipersensibilidade tardia |
| ELISA = | Ensaio imunoenzimático |
| ELISpot = | Ensaio imunoenzimático modificado |
| Fas = | Proteína Fas |
| FasL = | Ligante da proteína Fas |
| Fas-FasL = | Interação da proteína Fas com seu ligante |
| Foxp3 = | Fator de transcrição nuclear Foxp3 |
| GM-CSF = | Fator estimulador da colônia de macrófagos e monócitos |
| HC-FMUSP = | Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo |
| ICAM-1 = | Molécula de adesão intercelular |
| IE = | Índice de estimulação |
| IgM = | Imunoglobulina M |
| IL-1 = | Interleucina 1 |

| | |
|---|--|
| IL-1 α = | Interleucina 1 alfa |
| IL-1 β = | Interleucina 1 beta |
| IL-2 = | Interleucina 2 |
| IL-4 = | Interleucina 4 |
| IL-5 = | Interleucina 5 |
| IL-6 = | Interleucina 6 |
| IL-7 = | Interleucina 7 |
| IL-8 = | Interleucina 8 |
| IL-10 = | Interleucina 10 |
| IL-12 = | Interleucina 12 |
| IL-13 = | Interleucina 13 |
| IL-16 = | Interleucina 16 |
| IL-17 = | Interleucina 17 |
| IL-23 = | Interleucina 23 |
| INF- γ = | Interferon gama |
| K ₂ Cr ₂ O ₇ = | Bicromato de potássio |
| LB = | Linfócito B |
| LFA-1 = | Proteína 1 associada a função linfocitária |
| LT = | Linfócito T |
| LT NK = | células T exterminadoras naturais |
| M = | Molar |
| MHC I = | Complexo principal de histocompatibilidade 1 |
| MHC II = | Complexo principal de histocompatibilidade 2 |

| | |
|--------------------|--|
| NK = | Célula exterminadora natural |
| <i>P</i> = | Significância |
| PWM = | Pokeweed |
| RANK = | Receptor ativador do fator nuclear KB |
| RANKL = | Ligante do receptor ativador do fator nuclear KB |
| RANTES = | Quimiocina RANTES (CCL5) |
| RNA _m = | Ácido ribonucléico mensageiro |
| Rpm = | Rotações por minuto |
| RPMI 1640 = | Meio de cultura Rosewell Park Memorial Institute |
| TC = | Teste de contato |
| Tc1 = | T citotóxica tipo 1 |
| TGF-β = | Fator transformador do crescimento beta |
| Th1 = | T auxiliar tipo 1 |
| Th2 = | T auxiliar tipo 2 |
| Th17 = | T auxiliar tipo 17 |
| TNF-α = | Fator de necrose tumoral alfa |
| TPL = | Teste de proliferação linfocitária |
| Tr1 = | Linfócito T regulador 1 |
| UVB = | Radiação ultravioleta B |
| VCAM-1 = | Molécula 1 de adesão da célula vascular |
| VLA-4 = | Antígeno de ativação muito tardia 4 |
| VLA-5 = | Antígeno de ativação muito tardia 5 |

VLA-6 = Antígeno de ativação muito tardia 6

Lista de Símbolos

| | |
|--------------------|------------------|
| Δ | Delta |
| μg | Micrograma |
| ng | Nanograma |
| μL | Microlitro |
| M | Molar |
| $>$ | Maior que |
| \geq | Maior ou igual a |
| $<$ | Menor que |
| % | por cento |
| $^{\circ}\text{C}$ | grau Celsius |

Lista de Tabelas e Gráficos

| | | |
|-----------|--|----|
| FIGURA 1 | Mecanismo da sensibilização e elicitação da dermatite de contato alérgica..... | 11 |
| FIGURA 2 | Microesferas de poliestireno coradas de forma singular..... | 50 |
| FIGURA 3 | A esfera com o anticorpo é incubada com a amostra e se liga ao seu antígeno. A amostra é lavada e incubada com um anticorpo biotilado que se liga ao complexo antígeno-anticorpo. O resultado é amplificado pela incubação com o conjugado estreptavidina-ficoeritrina que emite um sinal fluorescente | 51 |
| FIGURA 4 | Os feixes de laser incidem sobre as esferas permitindo a detecção do ensaio e da intensidade da resposta..... | 52 |
| FIGURA 5 | Contagens por minuto encontradas nas culturas basais e estimuladas com PWM do grupo de casos. | 56 |
| FIGURA 6 | Contagens por minuto encontradas nas culturas basais e estimuladas com PWM do grupo controle..... | 56 |
| FIGURA 7 | Índices de estimulação encontrados nos casos e controles estimulados com PWM. | 56 |
| FIGURA 8 | Contagens por minuto encontradas nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo de casos. | 56 |
| FIGURA 9 | Contagens por minuto encontradas nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo controle. | 56 |
| FIGURA 10 | Índices de estimulação encontrados nos casos e controles estimulados com cromo..... | 56 |
| FIGURA 11 | Detecção de IFN- γ nas culturas basais dos casos e controles..... | 58 |
| FIGURA 12 | Detecção de IFN- γ nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo de casos..... | 58 |
| FIGURA 13 | Detecção de IFN- γ nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo controle. | 58 |

| | | |
|-----------|--|----|
| FIGURA 14 | Índices de estimulação encontrados nas culturas dos casos e controles..... | 58 |
| FIGURA 15 | Diferença na detecção de IFN- γ entre as culturas estimuladas e basais dos grupos de caso e controle..... | 58 |
| FIGURA 16 | Detecção de IL-2 nas culturas basais dos casos e controles..... | 60 |
| FIGURA 17 | Detecção de IL-2 nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo de casos. | 60 |
| FIGURA 18 | Detecção de IL-2 nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo controle. | 60 |
| FIGURA 19 | Índices de estimulação encontrados nas culturas dos casos e controles..... | 60 |
| FIGURA 20 | Diferença na detecção de IL-2 entre as culturas de estimuladas e basais dos grupos de caso e controle. | 60 |
| FIGURA 21 | Detecção de IL-4 nas culturas basais dos casos e controles..... | 62 |
| FIGURA 22 | Detecção de IL-4 nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo de casos..... | 62 |
| FIGURA 23 | Detecção de IL-4 nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo controle..... | 62 |
| FIGURA 24 | Índices de estimulação encontrados nas culturas dos casos e controles..... | 62 |
| FIGURA 25 | Diferença na detecção de IL-4 entre as culturas estimuladas e basais dos grupos de caso e controle. | 62 |
| FIGURA 26 | Detecção de IL-5 nas culturas basais dos casos e controles..... | 64 |
| FIGURA 27 | Detecção de IL-5 nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo de casos. | 64 |
| FIGURA 28 | Detecção de IL-5 nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo controle..... | 64 |
| FIGURA 29 | Índices de estimulação encontrados nas culturas dos casos e controles..... | 64 |

| | | |
|-----------|--|----|
| FIGURA 30 | Diferença na detecção de IL-5 entre as culturas estimuladas e basais dos grupos de caso e controle. | 64 |
| FIGURA 31 | Detecção de IL-10 nas culturas basais dos casos e controles..... | 66 |
| FIGURA 32 | Detecção de IL-10 nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo de casos. | 66 |
| FIGURA 33 | Detecção de IL-10 nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo controle..... | 66 |
| FIGURA 34 | Índices de estimulação encontrados nas culturas dos casos e controles..... | 66 |
| FIGURA 35 | Diferença na detecção de IL-10 entre as culturas estimuladas e basais dos grupos de caso e controle..... | 66 |
| FIGURA 36 | Detecção de IL-12 nas culturas basais dos casos e controles..... | 68 |
| FIGURA 37 | Detecção de IL-12 nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo de casos..... | 68 |
| FIGURA 38 | Detecção de IL-12 nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo controle..... | 68 |
| FIGURA 39 | Índices de estimulação encontrados nas culturas dos casos e controles..... | 68 |
| FIGURA 40 | Diferença na detecção de IL-12 entre as culturas estimuladas e basais dos grupos de caso e controle..... | 68 |
| FIGURA 41 | Detecção de IL-13 nas culturas basais dos casos e controles..... | 70 |
| FIGURA 42 | Detecção de IL-13 nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo de casos..... | 70 |
| FIGURA 43 | Detecção de IL-13 nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo controle..... | 70 |
| FIGURA 44 | Índices de estimulação encontrados nas culturas dos casos e controles..... | 70 |
| FIGURA 45 | Diferença na detecção de IL-13 entre as culturas estimuladas e basais dos grupos de caso e controle..... | 70 |
| FIGURA 46 | Detecção de IL-17 nas culturas basais dos casos e controles..... | 72 |

| | | |
|-----------|--|----|
| FIGURA 47 | Detecção de IL-17 nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo de casos..... | 72 |
| FIGURA 48 | Detecção de IL-17 nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo controle..... | 72 |
| FIGURA 49 | Índices de estimulação encontrados nas culturas dos casos e controles..... | 72 |
| FIGURA 50 | Diferença na detecção de IL-17 entre as culturas estimuladas e basais dos grupos de caso e controle. | 72 |
| FIGURA 51 | Detecção de RANTES nas culturas basais dos casos e controles..... | 74 |
| FIGURA 52 | Detecção de RANTES nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo de casos..... | 74 |
| FIGURA 53 | Detecção de RANTES nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo controle..... | 74 |
| FIGURA 54 | Índices de estimulação encontrados nas culturas dos casos e controles..... | 74 |
| FIGURA 55 | Diferença na detecção de RANTES entre as culturas estimuladas e basais dos grupos de caso e controle. | 74 |
| QUADRO 1 | Trabalhos sobre teste de proliferação linfocitária por cromo..... | 41 |
| QUADRO 2 | Grupo de substâncias testadas na bateria padrão brasileira de dermatite de contato..... | 87 |
| QUADRO 3 | Grupo de substâncias testadas na bateria de cosméticos..... | 87 |
| QUADRO 4 | Resultados dos testes de contato..... | 88 |
| TABELA 1 | Valores médios das contagens por minuto das triplicatas dos casos e controles..... | 89 |
| TABELA 2 | Detecção de IFN-gama em pg/mL nas culturas dos casos e controles..... | 90 |
| TABELA 3 | Detecção de IL-2 em pg/mL nas culturas dos casos e controles.. | 91 |

| | | |
|-----------|---|----|
| TABELA 4 | Detecção de IL-4 em pg/mL nas culturas dos casos e controles.. | 92 |
| TABELA 5 | Detecção de IL-5 em pg/mL nas culturas dos casos e controles.. | 93 |
| TABELA 6 | Detecção de IL-10 em pg/mL nas culturas dos casos e controles..... | 94 |
| TABELA 7 | Detecção de IL-12(p70) em pg/mL nas culturas dos casos e controles..... | 95 |
| TABELA 8 | Detecção de IL-13 em pg/mL nas culturas dos casos e controles..... | 96 |
| TABELA 9 | Detecção de IL-17 em pg/mL nas culturas dos casos e controles..... | 97 |
| TABELA 10 | Detecção de RANTES em pg/mL nas culturas dos casos e controles..... | 98 |
| TABELA 11 | Correlação entre alergia e os índices de estimulação detectados com o teste de proliferação linfocitária..... | 99 |
| TABELA 12 | Correlação entre alergia e os índices de estimulação encontrados com as citocinas detectadas. | 99 |
| TABELA 13 | Correlação entre os índices de estimulação encontrados com o TPL e os índices obtidos com as citocinas. | 99 |

RESUMO

Martins LEAM. *Detecção de citocinas em culturas de linfócitos em pacientes alérgicos ao cromo*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade São Paulo; 2010.

A dermatite de contato alérgica decorre de uma reação imunológica, mediada por células T, contra um contactante em pessoas previamente sensibilizadas. O exame padrão ouro para o diagnóstico da DCA é o teste de contato (TC). Infelizmente, o TC demanda tempo, não é inócuo e tem algumas limitações. O teste de proliferação linfocitária (TPL) convencional, uma alternativa ao TC, apresenta baixa sensibilidade no diagnóstico de alergia ao cromo. A fim de aprimorar a sensibilidade o resultado do teste foi obtido pela detecção de citocinas no sobrenadante das culturas e não por timidina radiomarcada. Dezoito pacientes alérgicos ao cromo e 19 controles foram testados com o teste convencional e com as citocinas IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17 e rantes. Houve correlação entre alergia ao cromo e detecção das citocinas IFN- γ , IL-2, IL-5, IL-12 e IL-13. Dessas, os melhores resultados foram encontrados com a IL-13. O TPL pode ser utilizado como exame adicional ou alternativo no diagnóstico da DCA pelo cromo.

SUMMARY

Martins LEAM. *Cytokine detection in lymphocyte cultures of chromium allergic patients* [thesis]. Faculty of Medicine, University of São Paulo, SP (Brazil); 2010.

Allergic contact dermatitis (ACD) elapses from an specific T cell immunologic reaction against an allergen in a sensitized individual. The gold standard exam to confirm ACD is the patch test (PT). However, PT demands time, has potential side effects and some limitations. The standard lymphocyte proliferation assay (LPA) has sensitivity in the diagnosis of chromium allergy. To optimize this test the results were obtained by detection of cytokines instead radiolabeled thymidine. Eighteen patients allergic to chromium and 19 controls were tested with the conventional LPA and for the following cytokines: IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17 and rantes. Correlation between allergy to chromium and detection of IFN- γ , IL-2, IL-5, IL-12 e IL-13 was found. The best results were found with IL-13. LPA can be used as an alternative or additional test in the diagnosis of ACD by chromium.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A pele é o órgão que separa o corpo humano do meio externo. Esta função a expõem a inúmeras agressões físicas, químicas e biológicas que determinam doenças, como os eczemas. Os eczemas são dermatites caracterizadas pela presença de eritema, edema, vesículas, secreção, escamas, crostas e liquenificação dependendo do estágio da lesão. Os eczemas causados por agentes exógenos sejam eles contactantes ou endotantes são chamados de eczemas de contato ou dermatites de contato (DC). A DC pode ser causada por irritação primária, dermatite de contato irritativa (DCI), ou por sensibilização, dermatite de contato alérgica (DCA). A DCI resulta da exposição a agentes que provocam dano tecidual direto, como ácidos e álcalis. Já a DCA decorre de uma reação imunológica específica, contra o contactante, em pessoas previamente sensibilizadas. A reação imune contra o antígeno, gerada para destruí-lo e expulsá-lo, provoca o dano tecidual.¹

A DC é uma doença universal, freqüente, responsável por cerca de 10% dos atendimentos dermatológicos.² Ocorre em todas as idades e raças, porém a incidência é menor na infância, pela menor exposição às substâncias mais sensibilizantes e na raça negra, por particularidades da pele nesse grupo.^{3,4}

O impacto socioeconômico da DC é grande, porém difícil de quantificar. A DC ocupacional representa uma das mais prevalentes doenças

de trabalho, sendo considerada problema de saúde pública.⁵ Corresponde a mais de 90% das dermatoses ocupacionais, principalmente nos países em desenvolvimento onde as indústrias nem sempre adotam todas as medidas de proteção necessárias e é responsável por cerca de um quarto de todas as ausências de trabalho.⁶⁻⁸

A DC afeta a qualidade de vida de seus portadores. O prurido, a dor, a exsudação e a eventual infecção das lesões comprometem a vida social, profissional e o descanso desses pacientes ^{8,9(QD2)}. A descoberta do agente responsável pela DC modifica a evolução e o prognóstico da DC, melhorando a qualidade de vida dos pacientes.^{9,10}

Existem mais de 3.700 substâncias capazes de deflagrar DCA. A prevalência da DCA por um determinado antígeno depende do potencial sensibilizante e da frequência e tempo de exposição ao mesmo. As condições da exposição também são importantes, pois podem favorecer o desenvolvimento da sensibilização. A oclusão, a umidade e o contato do alérgeno com a pele lesada favorecem a penetração do mesmo e portanto a sensibilização.^{11,12} A prevalência da DCA nas diversas populações difere por ser fruto da peculiar exposição antigênica de cada região.¹³ Além disso, a taxa de sensibilização de uma determinada população muda constantemente na medida em que a presença e exposição aos sensibilizantes se alteram com o tempo.¹⁴ Dentre os principais agentes encontramos alguns metais como o níquel, o cromo e o cobalto.^{15,16}

O bicromato de potássio é um forte sensibilizante encontrado em produtos de convívio diário e ocupacional o que justifica a alta incidência de

DCA por esse elemento. Materiais de construção, produtos de couro, têxteis, cosméticos, tintas verdes e amarelas, feltros verdes, fluídos de litografia, cabeças de fósforos e preservativos da madeira são alguns exemplos de fontes de exposição a esse antígeno.^{11,12}

O teste de contato (TC), também chamado de teste epicutâneo, é o exame padrão ouro para o diagnóstico da DCA. Auxilia no diagnóstico, ajuda a diferenciar dos casos de DCI, e no tratamento, já que aponta o agente responsável. A importância da descoberta do sensibilizante no prognóstico da DCA já foi demonstrada.^{17,18}

O TC apresenta algumas limitações sendo, às vezes, necessário outro exame complementar, como o teste aberto ou o teste de proliferação linfocitária.¹⁹⁻²² Conhecer e respeitar as contra-indicações do TC, a técnica de montagem e colocação, a leitura, assim como orientar o paciente para manter as substâncias testadas no local durante 48 horas é essencial para obter um resultado fidedigno. Além disso, o teste de contato requer tempo para a sua execução uma vez que três consultas são necessárias para a colocação, retirada e leitura do teste.²¹

Considerando a importância da doença, as limitações do TC e o impacto do diagnóstico correto no prognóstico da DCA, torna-se necessário o desenvolvimento de técnicas diagnósticas alternativas. O teste de proliferação linfocitária (TPL) tem sido estudado com o propósito de complementar e possivelmente substituir o TC. No TPL, células mononucleares (linfócitos e monócitos) do sangue venoso periférico são isoladas e cultivadas com e sem o suposto sensibilizante. Nos pacientes

com hipersensibilidade ao agente testado os linfócitos cultivados na presença do antígeno são ativados passando a apresentar alterações morfológicas, proliferativas e funcionais. A ativação linfocitária pode ser quantificada pelo: a) percentual de células blásticas (jovens) na cultura, b) captação de timidina radiomarcada, que é adicionada a cultura e incorporada pelas células ativadas para a formação de ácido desoxirribonucléico (DNA) ou c) produção de citocinas.^{23,24}

O TPL já provou ter adequada sensibilidade e especificidade no diagnóstico da DCA por níquel. Crivellaro *et al.*²⁵ compararam a resposta do TPL entre 19 pacientes sensibilizados a esse antígeno e 25 pacientes saudáveis com TC negativo. Os autores demonstraram que a resposta proliferativa dos linfócitos dos pacientes sensibilizados é superior à dos controles em todas as concentrações testadas e o exame apresentou sensibilidade de 84% e especificidade de 100%. Outros autores chegaram a resultados semelhantes, confirmando o valor desse teste no diagnóstico de alergia ao níquel.²⁶

Existem poucos trabalhos na literatura médica sobre o uso do TPL para diagnóstico de hipersensibilidade ao cromo. Esses trabalhos usaram técnicas diferentes; diferentes sais do metal, concentrações diversas, períodos de incubação variáveis e critérios para positividade não uniformes, gerando resultados não comparáveis.²⁷ Recentemente Martins *et al.*²⁴ testaram os diferentes protocolos promovendo a otimização do teste. Em uma comparação entre 20 pacientes alérgicos ao cromo e 20 controles obtiveram uma sensibilidade de 60% e especificidade de 95%. Apesar da

boa especificidade encontrada a sensibilidade ficou aquém do desejado impedindo o uso rotineiro desse teste. A detecção de citocinas nas culturas de linfócitos vem sendo testada como alternativa potencial para melhorar a sensibilidade desse teste. No entanto, novamente, os poucos estudos impedem a precisa determinação do papel das citocinas no diagnóstico da DCA por cromo por apresentarem falhas como: a) falta de um grupo controle, b) baixa casuística, c) um ou poucos períodos de incubação testados e d) pequeno número de citocinas detectadas – frente a ampla possibilidade determinada pela complexidade da resposta imunológica.²⁸⁻³²

A determinação dos melhores critérios para o diagnóstico da DCA através da detecção de citocinas pelo TPL passa pelo estudo do perfil das citocinas expressas em culturas com diferentes períodos de incubação de linfócitos de pacientes alérgicos ao cromo, seguido da comparação com as citocinas produzidas nas mesmas condições por indivíduos não alérgicos.

Para definir a expressão de citocinas no sobrenadante de cultura de linfócitos e, conseqüentemente, o papel das mesmas no diagnóstico de hipersensibilidade ao cromo pelo TPL foram selecionados 18 pacientes com DCA por cromo e 19 pacientes sem DCA por esse metal.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Determinar o perfil de citocinas expressas nas culturas de linfócitos de pacientes alérgicos ao cromo, comparar com a produção dos controles e determinar o papel dessas citocinas no diagnóstico da dermatite de contato alérgica.

REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1.1 Cromo

O cromo é o quarto elemento mais freqüente na crosta terrestre sendo encontrado em diferentes estados de valência, de -2 a +6, na dependência de fatores como o pH e a temperatura.^{11,33} O cromo é o sétimo agente causador de DCA em São Paulo.³⁴ No ambulatório de alergia do departamento de dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo o cromo apareceu como o 3º agente positivo nos testes de contato realizados entre Janeiro de 2002 a Agosto de 2004, dado não publicado.

Para identificar o potencial sensibilizante dos alérgenos foram desenvolvidos testes de sensibilização. Kligman³⁵ desenvolveu um teste em humanos para classificar os alérgenos de acordo com o seu potencial sensibilizante em 5 classes. A capacidade de sensibilização aumenta da classe 1 para a classe 5. Nesse ensaio o bicromato de potássio foi identificado como pertencente à classe 5 e os sais de cromo trivalente à classe 3. O potencial sensibilizante dos sais de cromo depende da solubilidade dos mesmos na água, quanto mais solúvel maior a penetração cutânea e o potencial sensibilizante. O bicromato de potássio, uma forma hexavalente de cromo, tem alta solubilidade e poder sensibilizante. Já a maioria dos compostos trivalentes têm baixa solubilidade e são sabidamente

menos alergênicos.^{35,36} Por essa razão, concentrações muito baixas de cromo hexavalente (Cr(VI)) são capazes de desencadear DCA enquanto o mesmo é visto com o cromo trivalente (Cr(III)) apenas em concentrações muito maiores.³⁷

Os sais de cromo assumem grande importância pelo seu extenso uso, principalmente nas atividades profissionais. O cimento e os materiais de construção são as principais fontes de exposição ao cromo seguido dos produtos de couro.¹¹ Outras fontes menos frequentes de exposição ao cromo são: tintas, sombras e outros cosméticos, materiais cromados (como o catgut cromado), creme de barbear, cabeça de palito de fósforo, resina-epóxi, próteses e ligas metálicas, feltro verde, solventes, detergentes, esmaltes, fluidos de litografia, óleos de corte, agentes antiferrugem, antioxidante, antiembaçantes e polidores de vidro, selos de postagem, tarjas magnéticas, tubos de imagem, conservantes de madeira e solo.¹¹

3.1.2 Manifestações clínicas da DCA pelo cromo

A erupção eczematosa caracteriza-se pelo surgimento insidioso de xerose, liquenificação e formação de fissuras, estas especialmente nas mãos. As lesões são persistentes e recorrentes, tornando-se mais graves e duradouras a cada exposição. Todavia, também podem apresentar-se com caráter agudo, exsudativo.^{11,38}

As lesões podem mimetizar as lesões do eczema numular, da dermatite atópica, da neurodermite e da dermatofitose crônica das mãos. Também já foram descritas erupções vesiculosas palmares, disidrosiformes,

pela ingesta de cromo e quadros disseminados com acentuação flexural com envolvimento dos tornozelos e dorso dos pés pelo pó do cimento.^{10,38}

3.1.3 Prognóstico da DCA por cromo

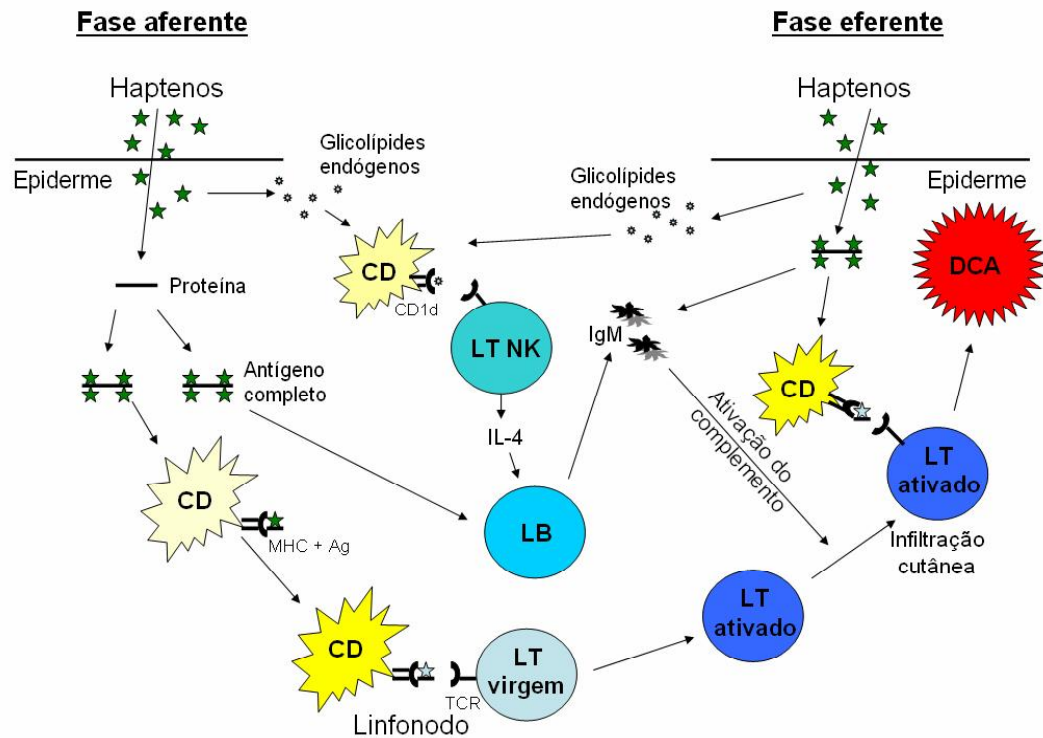
A DCA por cromo tem um mau prognóstico. Fregert³⁹ relatou que apenas 7% das mulheres e 10% dos homens com alergia ao cromo estavam sem lesões após 5 anos. Burrows⁴⁰ encontrou dados semelhantes, apenas 8% de seus casos de DC por cimento estavam sem lesões após 10-14 anos. A causa para essa persistência não é clara. Foi proposto que a persistência do cromo na pele ou o contato diário com materiais que contenham pequena quantidade de cromo seja responsável pela perpetuação da dermatite.^{39,40}

A troca da ocupação, quando esta é a fonte de exposição, pode resolver o problema. Lips *et al.*⁴¹ demonstraram que a troca de atividade profissional constitui uma medida efetiva no tratamento da DCA por cromo desde que não haja exposição ao cromo na nova ocupação. Setenta e dois por cento dos 88 trabalhadores da construção civil estavam livres da afecção já nos primeiros anos de troca de profissão ou aposentadoria precoce sugerindo que o mau prognóstico se deve à persistência do contato com o alérgeno.

3.2 Patogênese da dermatite de contato alérgica

A DCA é uma doença inflamatória desencadeada por haptenos e mediada por células T.⁴² Em 1935, Karl Landsteiner e John Jacobs⁴³ escreveram sobre a existência de químicos reativos de baixo peso molecular que ao se ligar a proteínas determinam a formação de anticorpos ou substâncias anticorpo-símiles, supostamente responsáveis pela DCA. Somente 40 anos mais tarde Shearer demonstrou que linfócitos T (LT) hapteno-específicos também respondem a esses complexos hapteno-proteicos.⁴⁴

A DCA ocorre como consequência de uma cascata de processos físico-químicos e imunes que podem ser didaticamente divididos em duas fases: de indução, também chamada de aferente e de elicitação ou eferente. A figura 1 resume os eventos envolvidos nessas fases.



Fonte: Adaptado de Gober e Gaspari⁴⁵ e Campos *et al.*⁴⁶

Fig 1. Mecanismo da sensibilização e elicitação da dermatite de contato alérgica. Na fase aferente os haptenos penetram a pele e se ligam a proteínas teciduais tornando-se antígenos (Ag) completos. Esses antígenos são captados e processados pelas células dendríticas (CD) que passam a apresentá-los acoplados a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) na superfície da membrana celular. As CD migram para os linfonodos regionais onde apresentam o antígeno aos linfócitos T (LT). Os LT que reconhecem o antígeno apresentado são ativados. A penetração dos antígenos na pele também determina a liberação de glicolípides endógenos que são apresentados pelas CD para os linfócitos T NK (LT NK). Os LT NK liberam IL-4 que estimula os linfócitos B (LB) tipo 1 a produzir IgM. Frente a um novo contato a interação da IgM com o complexo antígeno-proteico leva a ativação do complemento que induz a liberação de fatores quimiotáticos e inflamatórios dos mastócitos e células endoteliais. Os LT ativados migram para a pele a interagem com as CD que carregam o antígeno levando a DCA.

3.2.1 Fase aferente

A fase aferente se desenvolve ao longo do tempo como resultado da exposição repetida a agentes ambientais. A maioria dos contactantes são grandes demais para passar o estrato córneo, mas os haptenos, devido ao seu baixo peso molecular penetram essa camada e se difundem em direção a camada basal sem serem reconhecidos pelo sistema imunológico. Durante esse processo de difusão se ligam às proteínas teciduais tornando-se imunogênicos. Essas proteínas podem ser derivadas dos queratinócitos, componentes das células de Langerhans (CL) ou peptídeos previamente processados ligados ao MHC.⁴⁷ A natureza do hapteno, o tipo de ligação do hapteno com seu carreador e a configuração tridimensional final do complexo formado influenciam a imunogenicidade do complexo hapteno-proteico.⁴⁸

O complexo hapteno-proteico é captado pelas células dendríticas (CD), fragmentado em diversos peptídios e acoplados a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). O conjunto peptídeo-MHC é expresso na superfície da CD possibilitando a apresentação do antígeno ao linfócito T hapteno-específico no linfonodo regional.⁴⁸⁻⁵⁰ A captação dos antígenos promove uma série de alterações morfológicas e funcionais nas CD. Elas tornam-se mais dendríticas, aumentam o número de grânulos de Birbeck, de moléculas co-estimulatórias e produzem maior quantidade de citocinas. Dentre essas citocinas destacam-se as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α .^{51,52}

A IL-1 e o TNF- α transformam as CD que passam de células preparadas para a captação e processamento de antígenos para células especializadas na apresentação antigênica.⁵³ A IL-1 beta aumenta a expressão de moléculas co-estimulatórias como a ICAM-1 e o CD86 nas CD, necessárias para a ativação dos LT hapteno-específicos.^{54,55} O TNF- α atua em diversos pontos na migração das CD. Diminui a expressão de E-caderinas nas CL, uma molécula de adesão aos queratinócitos, induz a liberação de metaloproteinases, a interação de moléculas de adesão, como a LFA-1, ICAM-1 e VLA-6 das CD com a matriz dérmica, e a expressão de CCR7, um receptor que responde à quimiocinas do tecido linfóide secundário.^{47,56-59} Essas alterações levam a migração das CD em direção ao endotélio do vaso linfático aferente em resposta ao gradiente de quimiocinas produzidas por essas células. As citocinas pró-inflamatórias, IL-1 e TNF- α , aumentam a expressão de E-selectinas e VCAM-1 nas células endoteliais.^{60,61} A interação entre o sialyl Lewis X, uma selectina cuja expressão esta aumentada nas CD durante as reações alérgicas, e o seu ligante, a E-selectina das células endoteliais promove a passagem das CD para os linfáticos.^{42,56,62,63}

Dentro de vinte e quatro horas após o contato com o antígeno, as CD migram para os linfonodos regionais para a apresentação do antígeno.⁶⁴ Na região paracortical dos linfonodos regionais, as CD encontram e tocam diversos linfócitos T virgens que estão em processo de recirculação. Para ativar as células T virgens as CD devem passar dois sinais.⁶⁵ Caso o linfócito possua o receptor complementar ao complexo peptídeo-MHC ele

receberá o primeiro sinal. O primeiro sinal determina alterações conformacionais nas moléculas co-estimulatórias do LT virgem tornando-as mais ávidas pelos seus ligantes que estão presentes na CD. Ainda, o primeiro sinal leva a transcrição do RNAm da IL-2 porém o RNAm formado é instável.⁶⁶ O segundo sinal é dado pela ligação entre as moléculas co-estimulatórias das CD, ICAM-1, CD80 e CD86, com os seus respectivos ligantes, LFA-1 e CD28 (que se liga tanto ao CD80 quanto ao CD86), no LT. O CD86, quando acoplado ao CD28, estabiliza o RNAm da IL-2 induzindo o LT a produzir grande quantidade dessa citocina. Os linfócitos ativados passam a expressar o receptor completo da IL-2 tornando-se suscetíveis a esta citocina que por ação autócrina leva a proliferação celular, processo esse conhecido como expansão clonal.⁶⁶⁻⁶⁸ A expansão clonal forma um grande número de células T hapteno-específicas que responderão em um futuro contato com o alérgeno. Na ativação das células T, além do primeiro e segundo sinais, as citocinas produzidas pelas CD e presentes no microambiente onde ocorre a apresentação antigênica também têm um papel essencial. As citocinas determinam o tipo de resposta ao antígeno apresentado, a IL-12 leva a formação de células efectoras ao passo que a IL-10 determina o surgimento de células reguladoras, células que suprimem o processo.^{69,70} Após a expansão clonal nos linfonodos regionais, os LT passam para o ducto torácico e entram na circulação sangüínea. Essas células T hapteno-específicas expressam o antígeno linfocitário cutâneo (CLA) que direciona esses linfócitos preferencialmente para os processos inflamatórios cutâneos.

3.2.2 Fase eferente

Para encontrar o alérgeno, as células T precisam passar pela microvasculatura dérmica, pela matriz dérmica e alcançar os queratinócitos modificados pelo antígeno onde atuarão. Toda essa passagem é regulada por quimiocinas e moléculas de adesão expressas nos tecidos e reconhecidas pelos LT.

O LT ativado apresenta o antígeno de “homing” (CLA), o VLA-4 e receptores para quimiocinas.⁷⁰⁻⁷⁴ O CLA se liga à E-selectina expressa no endotélio estimulado pela presença do antígeno na pele sobrejacente iniciando o processo de rolagem. Porém, somente quando o VLA-4 ou o LFA-1 dos leucócitos se ligam respectivamente às integrinas endoteliais VCAM-1 e ICAM-1, forma-se uma ligação firme que combinada ao estímulo de quimiocinas permite a diapedese.^{60,75-77} Como a expressão de ICAM-1 no endotélio só aumenta 16 horas após o contato com o antígeno, período no qual grande parte do influxo de linfócitos já ocorreu, a E-selectina e o VCAM-1 parecem ser particularmente importantes no início do processo e o ICAM-1 na sua amplificação.⁷⁷

Uma vez na derme, o VLA-4 e o VLA-5 dos LT se ligam a fibronectina, uma proteína extracelular da matriz dérmica, o que facilita o trânsito dessas células nesse meio.⁷⁸ As quimiocinas direcionam os linfócitos para o epitélio e a ligação entre o ICAM-1, expresso nos queratinócitos, com o LFA-1 dos leucócitos promove a interação dessas células.⁷⁹ Os linfócitos produzem uma resposta inflamatória vigorosa para eliminar os queratinócitos

modificados pelo antígeno. Liberam grande quantidade de IFN- γ que estimula outras células T, células NK e macrófagos a ampliar o processo inflamatório e aumenta a expressão de Fas nos queratinócitos tornando-os mais suscetíveis à citotoxicidade mediada por FasL.^{80,81} Além da via Fas-FasL, foi demonstrado que as perforinas também participam da destruição celular na dermatite de contato.⁸² Os queratinócitos entram em apoptose ocorrendo a clivagem da caderina E que resulta em perda da coesão celular demonstrada pela espongiose e formação de vesículas.⁸³ A destruição tecidual e a descamação removem o antígeno do tecido, diminuindo o processo inflamatório.⁴²

3.2.3 Células envolvidas

3.2.3.1 Células dendríticas

A aplicação de haptenos na pele induz a extensão e retração sucessiva dos dendritos das células de Langerhans (CL), bem como induz a migração dessas células para os linfonodos regionais.⁸⁴ Esses movimentos são estimulados pela IL-1 e TNF alfa, citocinas produzidas pelos queratinócitos e pelas próprias CL após o contato com o antígeno.⁸⁵ Essas citocinas também induzem a maturação e migração das CL.⁸⁶ Durante o processo de amadurecimento as CD aumentam a expressão de moléculas coestimulatórias como o CD40, CD80 e CD86, moléculas de adesão como a ICAM-1 e citocinas, como a IL-12.⁸⁷⁻⁸⁹ O processo de amadurecimento é

necessário para a ativação das células T hapteno-específicas virgens nos LFN regionais para LT efetores e de memória.⁹⁰ O amadurecimento descrito ocorre com a exposição aos haptenos, os irritantes quando aplicados à pele induzem a migração das CL, mas não a maturação, impedindo a formação de uma resposta específica.⁸⁹ As CD estimuladas são atraídas para os linfáticos aferentes, pois passam a expressar o CCR7 que responde as quimiocinas do tecido linfóide CCL19 e CCL21.⁹¹ Os linfáticos aferentes expressam CCL21 e a zona paracortical dos linfonodos tanto CCL21 quanto CCL19 atraindo as CD para esta região dos linfonodos pelo gradiente de citocinas.⁹²

Recentemente o papel das CD na DCA vem sendo revisto.

3.2.3.1.1 As Células dendríticas na fase aferente

Há controvérsias quanto à função das CL na fase de indução da DCA. A langerina é uma proteína transmembrana que leva a formação dos grânulos de Birbeck, um marcador específico das CL. Utilizando um modelo murino onde a injeção de toxina diftérica leva a depleção seletiva das células que expressam a langerina, Bennett *et al.*⁹³ demonstraram em maio de 2005 que a ausência das CL diminui a chance de sensibilização aos haptenos. Os autores creditaram a sensibilização de alguns dos camundongos expostos no ensaio as CD dérmicas e concluíram que essas células trabalham junto com as CL no processo de sensibilização e que a ausência destas afeta esse mecanismo. No entanto, no mesmo mês, Kissenpfennig *et al.*⁹⁴

utilizando um modelo semelhante encontraram uma resposta aos haptenos semelhante entre camundongos com depleção das CL e controles e concluíram que as CL são dispensáveis para a apresentação dos haptenos, ficando essa função a cargo apenas das CD dérmicas. Em dezembro desse mesmo ano, Kaplan *et al.*⁹⁵ demonstraram que camundongos que constitucionalmente não apresentam CL têm resposta aumentada aos haptenos, ou seja, segundo esse modelo as CL possuem um papel regulador. Até então o papel da CL na sensibilização foi definido como indutor, indiferente ou supressor. Em 2007, Bennett *et al.*⁹⁶ colaboradores voltaram ao seu modelo e demonstram que os antígenos não são adequadamente transportados para os linfonodos na ausência das CL e concluem que isso diminui a sensibilização aos antígenos, confirmando seus achados no primeiro ensaio. Atribuíram às diferenças encontradas nos outros estudos a: 1) ausência perene das CL no modelo de Kaplan e colaboradores e 2) ao uso de concentrações elevadas dos alérgenos nos demais estudos. As CL em seu estado imaturo carregam auto-antígenos para os linfonodos gerando mecanismos de tolerância como células T reguladoras.^{97,98} A ausência dessas células pode ter impedido o desenvolvimento desse mecanismo e levado a um estado de hiperreatividade, responsável pelo aumento da sensibilização aos haptenos. Com relação ao emprego de concentrações elevadas dos alérgenos os autores referem que não refletem as exposições habituais, mas sim a artificialidade dos modelos criados, o que pode ter gerado uma via de resposta alternativa (Bennett 2007, 34 do Bennett 2007 e os 3 patetas).^{96,98}

Mais tarde Fukunaga *et al.*⁹⁹ demonstraram que camundongos com defeito migração das CL para os linfonodos regionais, mas com migração normal das CD dérmicas, tem resposta normal aos haptenos e sugerem que as CD dérmicas sejam mais importantes na geração de uma resposta efetora contra os haptenos do que as CL. Coletivamente, esses dados demonstram claramente que as CD dérmicas são capazes de determinar uma resposta efetora aos haptenos, mas não permitem uma conclusão adequada quanto ao papel das CL.

Recentemente um novo subtipo de CD langerina⁺ foi descrita, a CD dérmica langerina⁺.¹⁰⁰ Essas células não são CL em trânsito para os linfonodos regionais, pois são oriundas de uma linhagem celular diferente, quando depletadas são capazes de repovoar os tecidos muito mais rápido que as CL e apesar de serem fenotipicamente muito semelhantes apresentam marcadores de superfície próprios.¹⁰⁰⁻¹⁰² As CD dérmicas langerina⁺ também captam e apresentam antígenos. Usando um modelo de ablação seletiva das CL e CD dérmicas langerina⁺, Wang *et al.*¹⁰³ demonstraram que a tentativa de sensibilização imediatamente após a depleção, momento que se caracteriza pela ausência tanto das CL quanto das CD dérmicas langerina⁺, é frustrada mas quando realizada alguns dias após a ablação, quando parte das CD dérmicas langerina⁺ já retornaram mas as CL não, a resposta a sensibilização é normal. Esse ensaio aponta para as CD dérmicas langerina⁺ e não para as CL e CD dérmicas langerina⁻ como principais responsáveis para o desenvolvimento da DCA. No entanto, Bursch *et al.*¹⁰⁰ e Bennett *et al.*⁹⁶ utilizaram um sistema semelhante e

falharam ao tentar induzir DCA com baixas concentrações de oxazolona na quarta semana após a ablação, período no qual apenas as CD dérmicas langerina⁺ já retornaram ao normal, indicando a necessidade das CL para a sensibilização. Uma explicação conciliatória possível reside na concentração aplicada dos haptenos para a sensibilização. Bacci *et al.*¹⁰⁴ e Bennett *et al.*⁹⁶ sugerem que em concentrações mais altas o antígeno é captado tanto pelas CL quanto pelas CD dérmicas que induzem a geração de uma resposta efetora nos linfonodos regionais e que em concentrações menores o antígeno é captado preferencialmente pelas CL que induzem por si só o processo.

3.2.3.1.2 As células dendríticas na fase eferente

Evidências claras indicam que as CL não são necessárias na fase de elicitação. A depleção induzida dessas células seja pelo uso de corticosteróides tópicos, radiação UVB ou pela ablação seletiva dessas células em modelos experimentais com camundongos previamente sensibilizados não acarretou na diminuição da resposta alérgica.^{93,94,96,105} Acredita-se que os macrófagos, queratinócitos e mastócitos também funcionem como células apresentadoras de antígenos.^{106,107} O papel dessas células apresentadoras, incluindo da CL, na fase efetora da DCA ainda está em estudo.

3.2.3.2 Linfócitos

3.2.3.2.1 Linfócitos efetores

A DCA foi considerada por muito tempo o protótipo da reação de hipersensibilidade tardia (DTH), no entanto as subpopulações de linfócitos e os antígenos envolvidos na DCA apresentam particularidades que individualizam essa reação.⁴⁷ Na DHT os antígenos são proteínas relativamente grandes e solúveis já na sensibilidade de contato são compostos pequenos, reativos e lipofílicos.⁴⁷ A principal célula efetora na DHT é o LT CD4⁺ ao passo que na DCA a principal célula efetora é o LT CD8⁺ que tem a sua ação corroborada por LT auxiliares tipo 1 e suprimida por outras células T CD4⁺.⁴⁷ Uma série de achados, descritos abaixo, levaram a essas conclusões.

Gocinski *et al.*¹⁰⁹ demonstraram que camundongos com depleção de LT CD8⁺ induzida pelo uso de anticorpo monoclonal anti-CD8 são incapazes de desenvolver DCA. No entanto, camundongos com depleção induzida de LT CD4⁺ desenvolvem resposta clínica mais intensa e prolongada ao alérgeno. Resultados semelhantes foram obtidos com camundongos com “*knockout*” (inativação) dos MHC classe I e II. A ausência dessas moléculas impede a ativação dos LT CD8⁺ e LT CD4⁺ respectivamente, levando as mesmas conseqüências da ausência seletiva dessas subpopulações de linfócitos.¹¹⁰

Em uma avaliação seqüencial do infiltrado inflamatório da DCA Okazaki *et al.*¹¹¹ demonstraram que os linfócitos encontrados no início do processo são LT CD8⁺ produtores de IFN- γ seguidos de LT CD4⁺. A maior proporção de LT CD8⁺ foi encontrada após 12 horas do contato e de CD4⁺ após 24 horas.

Em 1998, Cavani *et al.*¹¹² demonstraram que apenas indivíduos alérgicos ao níquel apresentam LT CD8⁺ (Tc1) antígeno-específicos. Porém, células T CD4⁺ antígeno-específicas são encontradas em indivíduos alérgicos e não alérgicos diferindo apenas na maior proporção de células supressoras, produtoras de IL-10, no grupo são.⁷⁰ A IL-10 inibe a diferenciação e maturação das CD bloqueando a liberação de IL-12 necessária para gerar uma resposta alérgica.¹¹²

Apesar da evidencia crescente de que a célula efetora da DCA seja o LT CD8⁺ é possível que a natureza do antígeno e/ou a via de acesso do mesmo possam contribuir com a determinação do tipo celular envolvido na resposta que se formará.¹¹³

Além dos LT CD8⁺ e LT CD4⁺ produtores de IFN- γ , os LTh17 também exercem papel efetor importante na DCA. Quando estimulados pelo contato com os haptenos os queratinócitos humanos produzem IL-23 que, junto com a IL-1 beta, leva ao desenvolvimento de LTh17.¹¹⁴ Os indivíduos com sensibilidade de contato apresentam LTh17 no sangue periférico que respondem as células apresentadoras de antígeno que portam o alérgeno.¹¹⁴ Essas células são CD4⁺ ou CD8⁺ e produzem IL-17. A IL-17 afeta os queratinócitos de diversas formas: estimula a produção de citocinas pró-

inflamatórias, modula a liberação de quimiocinas, pelo aumento da expressão de IL-8 e diminuição de RANTES e aumenta a expressão de ICAM-1, que favorece a interação com os linfócitos.¹¹⁵ Dessa forma a IL-17 amplia o processo inflamatório local.¹¹⁵⁻¹¹⁷ Um modelo experimental demonstrou que a ausência da IL-17 em camundongos compromete o desenvolvimento da reação de hipersensibilidade de contato.¹¹⁸

Surpreendentemente a célula NK foi identificada como célula efetora da DCA por dinitrofluorobenzênio em camundongos com “*knock-out*” do gene Rag 2, gene essencial para o desenvolvimento dos linfócitos T e B.¹¹⁹ Esse achado é notável pois sugere que as células NK, apesar de não possuírem receptor de células T, são capazes de reconhecer antígenos específicos e desenvolver memória.

3.2.3.2.2 Linfócitos T reguladores

Apesar da DCA ser uma doença comum o seu surgimento não é a resposta habitual resultante da interação do sistema imune cutâneo aos químicos ambientais. Apesar da exposição diária a esses químicos a maioria dos indivíduos não desenvolvem alergia de contato. A reação é na realidade uma resposta não controlada do sistema imune aos haptenos.¹²⁰ O controle da resposta imune aos químicos ambientais é uma tarefa prioritária do sistema imune e uma série de mecanismos garantem a homeostase.¹²⁰ A interação entre as CD carregadas com o hapteno e o LT antígeno-específico normalmente resulta na apoptose, anergia ou indução de células T com

atividade reguladora.¹²¹ A perda desses mecanismos de tolerância leva a DCA.

O conhecimento sobre as células T reguladoras vem sendo revisto nos últimos anos. Essas células são uma subfamília heterogênea de linfócitos T que suprime a resposta imune pela liberação de citocinas antiinflamatórias, especialmente IL-10, ou por inativar as células T efetoras pelo contato célula-célula via CTLA-4 (antígeno-4 do linfócito T citotóxico).¹²² Há dois tipos de células T reguladoras já bem caracterizadas, as células T reguladoras 1 (Tr1) e as células Treg CD4⁺CD25⁺. As células Tr1 produzem grande quantidade de IL-10, moderada quantidade de IL-5 e TGF- β e não produzem IL-4 e IFN- γ . “In vitro” essas células restringem a diferenciação e produção de IL-12 pelas CD inibindo a apresentação antigênica.^{70,123} Esses efeitos são mediados pela IL-10 e resultam na supressão das células T CD4⁺ e CD8⁺ hapteno-específicas.¹²³ Cavani *et al.*¹¹² demonstraram que os LT CD4⁺ periféricos dos indivíduos não alérgicos ao níquel expressam maior quantidade de IL-10 e menor de IFN- γ que os pacientes alérgicos, ou seja, indivíduos não alérgicos apresentam maior quantidade de células Tr1 hapteno-específicas no sangue. As células Tr1 hapteno-específicas também podem ser encontradas nas lesões de pele da sensibilidade de contato onde modulam a intensidade do processo.^{70,123}

O segundo tipo de célula reguladora bem estudada expressa a molécula CD4, a cadeia alfa do receptor da IL-2 (CD25), o antígeno 4 do linfócito T citotóxico (CTLA-4) e o fator de transcrição Foxp3. Essas células são chamadas de LTreg CD4⁺CD25⁺ ou Tregs.¹²⁴ Elas também podem

expressar o CLA, presumivelmente após o encontro com CD nos linfonodos regionais, e migrar para a pele.¹²⁵ Essas células estão envolvidas na tolerância ao próprio e também são capazes de inibir a ativação “in vitro” das células efectoras expostas ao sensibilizante de indivíduos não alérgicos, mas não de pacientes alérgicos.^{126,127} O mecanismo da supressão induzida por essas células é motivo de discussão. Estudos “in vitro” sugerem a necessidade do contato célula-célula pela interação entre o CTLA-4 da célula reguladora com o CD80 e CD86 para inativação do LT efector.¹²⁸ Já modelos “in vivo” apontam para uma supressão mediada pela ação de citocinas, em particular a IL-10.¹²⁹

É possível que as células T reguladoras trabalhem em um sistema de cooperação, foi demonstrado que as células Treg induzem a produção de IL-10 em células Tr1.¹³⁰ Esses dois tipos de células reguladoras apresentam uma vasta gama de receptores de quimiocinas, como o CCR4 e CCR8, e são atraídas por quimiocinas produzidas na fase tardia da DCA como a CCL1.^{131,132} Dessa forma, atuam tanto na fase aferente quanto na fase eferente, impedindo o surgimento da alergia e minimizando a intensidade e duração do processo quando ele já se desenvolveu.

A mobilização e maturação das CD é promovida pela exposição à sinais de perigo como lesão celular, radiação UVB, bactérias e produtos virais.¹²⁰ O estado de maturação das CD determina a capacidade dessas células em direcionar os LT hapteno-específicos virgens para LT hapteno-específicos efectoras, de memória ou supressores.¹²¹ Células T CD4⁺ virgens quando estimulados com CD imaturas na presença de TGF- β se

transformam em LTreg CD4⁺CD25⁺.¹³³ A diferenciação para LTh1 ou LTc1 depende da produção de IL-12 pela CD, o que ocorre apenas quando a maturação é completa.^{121,134} A coexistência de sinais de perigo e exposição aos químicos parece ser um fator importante na perda da tolerância aos haptenos. Dessa forma o efeito irritante, uma característica dos alérgenos de contato mais sensibilizantes, pode ajudar a romper o mecanismo de tolerância e junto com o alérgeno determinar o amadurecimento completo das CD e induzir o desenvolvimento da DCA.^{135,136}

Além desses mecanismos controladores, Gorbachev *et al.*¹³⁷ demonstraram que há apoptose das células dendríticas nos linfonodos e que esse mecanismo também suprime a DCA. O autor demonstrou que camundongos com depleção de células CD4⁺ ou com “*knockout*” do gene responsável pelo FasL apresentam maior tempo de permanência das células dendríticas nos linfonodos em relação aos camundongos virgens. A perda da apoptose das células apresentadores resultou em ativação intensa e sustentada de LT CD8⁺ produtores de IFN- γ nos camundongos modificados. Além desses achados laboratoriais, os camundongos, com depleção de células CD4⁺ ou com alteração do FasL, apresentaram resposta clínica mais intensa e persistente ao alérgeno testado.

3.2.3.3 Queratinócitos

São células críticas na resposta imune da pele devido a sua dominância numérica. Os queratinócitos são importantes tanto na indução

quanto no controle da resposta aos haptenos. Os receptores para IL-1 dos queratinócitos respondem a IL-1 β liberada pelas CL expostas ao antígeno produzindo TNF- α que resulta na maturação e migração das CL.^{138,139} O IFN- γ produzido pelos LT aumenta a expressão de ICAM-1 nos queratinócitos que se liga ao LFA-1 dos linfócitos facilitando a infiltração dessas células para a epiderme e o processo de apresentação antigênica.^{140,141} Além disso, o IFN- γ aumenta a expressão de moléculas do MHC classe II nos queratinócitos.¹⁴¹ Dessa forma os queratinócitos podem apresentar o antígeno para os LTCD8⁺, pois constitucionalmente expressam MHC classe I e para os LTCD4⁺, pois são induzidos a expressar o MHC classe II pelo IFN- γ . Em condições normais os queratinócitos expressam baixos níveis das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86.⁴⁵ Essas moléculas se ligam aos seus receptores na célula T (CD28/CTLA-4 – antígeno-4 associado ao LT citotóxico) e são necessárias para levar a um segundo sinal efetivo.⁴⁵ Na ausência de um segundo sinal os LT tornam-se anérgicos.^{142,143} Esses LT anérgicos expressam grande quantidade de receptores para IL-2 e portanto competem com as células T efectoras e de memória por esse fator de crescimento. O contato dos queratinócitos com alérgenos e irritantes faz com que os queratinócitos humanos aumentem a expressão de CD80 favorecendo o desenvolvimento da resposta alérgica de contato.¹⁴⁴ Além disso, como visto, os queratinócitos promovem a geração de LTh17 pela produção de IL-1 beta e IL-23 que ampliam o processo inflamatório.

Por outro lado os queratinócitos suprimem a DC pela produção de IL-10 em resposta a exposição aos haptenos.^{145,146} A exposição aos alérgenos também induz a produção de IL-16 que está envolvida na quimiotaxia de LT CD4⁺ que suprimem a resposta inflamatória.¹⁴⁷ Além disso, os queratinócitos, em um ambiente inflamatório, expressam altos níveis do ligante do receptor ativador do fator nuclear KB (RANKL) que induz a expressão de CD205 e CD86 nas CL quando se liga ao receptor ativador do fator nuclear KB (RANK).¹⁴⁸ A expressão de CD205 está associada à indução de células CD4⁺CD25⁺ que suprimem a resposta imune.¹⁴⁹

3.2.3.4 Mastócitos

Junto com os queratinócitos e células endoteliais os mastócitos são fonte importante de TNF- α e atuam tanto na fase aferente quanto eferente da hipersensibilidade de contato.¹⁵⁰ O TNF- α é importante na maturação das CD e passagem das mesmas pelo endotélio. Também promove a infiltração de células T aumentando a reação inflamatória. Assim como os queratinócitos, os mastócitos têm função dupla, pois suprimem a DCA pela produção de IL-10.¹⁵¹

3.2.3.5 Linfócitos B e células T NK

A DCA foi considerada por muito tempo um processo independente da participação das células B, mas estudos recentes apontam para um papel

essencial dessas células. Os linfócitos B (LB) associados à DCA são do tipo 1 que são células B independentes das células T, não formam centros germinativos, geralmente não passam pelo rearranjo do DNA e são fonte de IgM.¹⁵² Camundongos com depleção de LB tipo 1 apresentam diminuição da DCA que é restaurada com a reposição da IgM monoclonal antígeno-específica, pela transferência de LB tipo 1 de doadores alérgicos ao antígeno ou de soro de camundongos 24 horas após a sensibilização destes com o antígeno em questão.¹⁵³ Essa IgM cliva a fração C5 do complemento formando o C5a que ativa os mastócitos com conseqüente liberação de TNF- α e quimiotaxia dos leucócitos.¹⁵⁴ Camundongos com deficiência de C5 apresentam diminuição na resposta de contato aos haptenos.¹⁵⁵⁻¹⁵⁷ A IgM antígeno-específica é produzida durante a fase aferente da DCA onde os LB tipo 1 proliferam rapidamente.¹⁵³

Os LB tipo 1 por sua vez são ativados pelas células T NK, um subtipo de linfócito que faz parte do sistema imune inato. Apesar de apresentarem receptor de células T essas células não passam por rearranjo gênico e são capazes de se ligar, através desse TCR, a glicolípides altamente conservados acoplados as moléculas CD1d, uma molécula semelhante à molécula do MHC classe I, encontrada nas células apresentadoras de antígeno.^{45,158,159} A natureza desse glicolípide permanece desconhecida. Após o contato com esse glicolípide a célula T NK se prolifera no fígado e libera citocinas como a IL-4 que é responsável pela ativação dos LB tipo 1 na presença do antígeno.^{46,160}

4 Testes diagnósticos

4.1 Teste de contato

O diagnóstico etiológico das DC alérgicas é confirmado pelo TC, considerado exame padrão ouro para a identificação do agente causal. Todavia, esse teste tem uma série de desvantagens. O teste está contraindicado nos pacientes: 1) com doença ativa, 2) que fizeram uso recente de corticosteróide sistêmico ou tópico no local do teste, 3) que foram expostos à radiação ultravioleta no local do teste e 4) em gestação. Há a necessidade de material adequado, conhecimento e experiência quanto à técnica de montagem e aplicação, compreensão e cooperação por parte do paciente e tempo, tanto do profissional quanto do paciente.²¹ Ainda, a interpretação é subjetiva e o teste não é inócuo podendo levar a complicações locais e sistêmicas de gravidade variável. Entre as reações locais descritas encontram-se: dermatite de contato irritativa, exacerbação da dermatite de contato, síndrome da pele excitada, reações persistentes, pigmentação e cicatrizes. Dentre as adversidades sistêmicas podem ocorrer: sensibilização ativa, absorção de substâncias tóxicas e/ou carcinogênicas e reações anafilactóides.^{2,21,161,162}

Outro problema associado ao TC se refere à reprodutibilidade dos resultados. O maior estudo sobre reprodutibilidade do TC foi feito pelo grupo alemão de pesquisa em dermatite de contato que encontrou 15,1% de discordância entre os resultados.¹⁶³

Além disso, o TC com metais pode levar a respostas falso-positivas, de natureza irritativa.¹⁶ Nos Estados Unidos a concentração do bicromato de potássio no TC foi reduzida de 0,5% para 0,25% para diminuir o número de respostas irritativas. No entanto, alguns autores referem que a redução da concentração pode levar a diminuição da sensibilidade e por isso recomendam testar com 0,5% de bicromato de potássio.³⁸ Na Europa esse agente continua sendo testado a 0,5% tomando-se cuidado quanto à relevância dos resultados.¹¹

A importância do diagnóstico etiológico no prognóstico da DCA aliado as limitações e dificuldades geradas pelo TC apontam para a necessidade do desenvolvimento de outro teste diagnóstico. A alternativa mais promissora é o teste de proliferação linfocitária.²⁷

4.2 Teste de proliferação linfocitária

O teste de proliferação linfocitária (TPL) vem sendo estudado com o propósito de complementar e eventualmente substituir o TC. O TPL compara a resposta dos linfócitos em cultura na presença e ausência de mitógenos ou antígenos. Os mitógenos são ativadores policlonais ao passo que os antígenos ativam apenas os linfócitos que possuem o receptor antígeno específico adequado. Quando os linfócitos são ativados passam por alterações morfológicas, funcionais e proliferam. Aumentam de tamanho, apresentam citoplasma amplo e nucléolo evidente tornando-se semelhante às células blásticas. Esse fenômeno é denominado “transformação blástica”

e é acompanhado do aumento da expressão de citocinas e da síntese do ácido desoxirribonucléico (DNA). A ativação linfocitária pode ser quantificada pela determinação por microscopia da porcentagem de células blásticas na cultura, pela síntese de DNA dessas células, que pode ser inferida através da adição de timidina radiomarcada na cultura e posterior detecção do material radioativo incorporado ou pela detecção das citocinas produzidas. Independente do método, as células são cultivadas na presença e ausência do antígeno e a aferição é feita comparando os resultados encontrados entre as culturas estimuladas e não estimuladas.^{28,66,164} A diferença e a razão encontradas entre as culturas estimuladas e não estimuladas, conhecidas como delta (Δ) e índice de estimulação (IE) respectivamente, são os parâmetros mais utilizados como critério de resposta ao estímulo.¹⁶⁴

O TPL já provou ser útil no diagnóstico de DCA por níquel e vem sendo estudado para diagnóstico de hipersensibilidade ao cromo desde meados do século XX sem o mesmo sucesso.^{24,25}

Em 1966, Grosfeld *et al.*¹⁶⁵ testaram o TPL em 5 pacientes com DCA por cromo e 2 controles. As culturas foram realizadas com leucócitos totais estimulados com bicromato de potássio na concentração de 294, 29,4 e, em um caso, 2,94ng/mL durante 3 a 4 dias. A leitura do teste foi feita pelo percentual de células blásticas. O próprio autor definiu seus resultados como não convincentes e questiona se o uso de fitohemaglutinina, um mitógeno, para a separação das células e/ou o tempo de cultura, possivelmente curto, teriam sido responsáveis pelos resultados.

Em 1971, Gerd Lischka¹⁶⁶ usou bicromato de potássio na concentração final de 0,294 e 2,940 η g/mL em culturas de 5 dias de leucócitos totais de 8 pacientes com DCA por cromo e 5 controles. Sete pacientes e 1 controle responderam ao teste. Os 7 pacientes responderam à concentração de 2,940 η g/mL e 2 pacientes e um controle à concentração de 0,294 η g/mL. Assim como Grosfeld e colaboradores analisou a resposta pelo percentual de células blásticas; um método trabalhoso e subjetivo e por isso muito pouco utilizado hoje.

Em 1979, Christiansen *et al.*¹⁶⁷ o resultado do TPL para cromo, níquel e cobalto entre 24 pacientes com perda asséptica de prótese metálica e 11 controles com prótese bem sucedida por pelo menos dois anos. Para tanto estimularam os linfócitos com cloreto de cromo nas concentrações finais de 0,2665; 2,665; 26,65 e 266,5 μ g/mL em culturas de 6 dias. Os resultados obtidos com o TPL para o cromo foram significativamente superiores no grupo com perda de prótese. Quinze casos e apenas um controle foram estimulados ($IE > 3$), sugerindo a participação da hipersensibilidade dos componentes da prótese na perda das mesmas. Esses autores encontraram os melhores resultados do TPL para o cromo com a concentração de 26,65 η g/mL.

Em 1985, Carando *et al.*¹⁶⁸ utilizaram o TPL em dois pacientes com perda asséptica de prótese metálica. Os antígenos utilizados foram o cloreto de cromo, cloreto de níquel e cloreto de cobalto. O cromo foi testado na concentração de 0,5 μ g/ml em culturas de linfócitos de apenas 56 horas. Os índices de estimulação obtidos no teste para o cromo foram de 7 e 8.

Em 1981, Al-Tawil *et al.*¹⁶⁹ compararam os resultados do TPL entre 31 pacientes com TC positivo para cromo (++) ou mais) e 24 indivíduos saudáveis. Os autores testaram 2 sais de cromo trivalentes (CrCl_3 e $\text{Cr}_4(\text{SO}_4)_5(\text{OH})_2$) e dois hexavalentes ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ e Na_2CrO_4) em diversas concentrações em culturas de linfócitos com duração de 3 a 8 dias. Vinte pacientes (sensibilidade = 65%) e 2 controles (especificidade = 92%) responderam ao teste. O autor estabeleceu como critério para positividade a presença de IE maior que 1 e superior ao IE de um controle testado simultaneamente. Os melhores resultados foram obtidos com as culturas de 5 a 8 dias de duração com cloreto de cromo nas concentrações finais de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0,001$). Os pacientes que responderam ao cromo hexavalente também responderam aos compostos trivalentes. O autor testou a especificidade do teste em 4 pacientes sensibilizados ao níquel e/ou cobalto sendo os resultados negativos.

Em 1991, Räsänen *et al.*²⁷ testaram várias concentrações de CrCl_3 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ e Na_2CrO_4 em culturas de linfócitos de 6 a 8 dias. Seis dos 8 pacientes alérgicos e nenhum dos 8 controles responderam. Os autores encontraram as melhores respostas nas culturas de 7 e 8 dias com 25 e 50 $\mu\text{g/ml}$ de CrCl_3 e 0,025; 0,050 e 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ e Na_2CrO_4 .

Em síntese, os trabalhos usaram técnicas diferentes; diferentes sais do metal, concentrações diversas, períodos de incubação variáveis e os critérios para positividade não foram uniformes. Face aos diferentes protocolos empregados, Martins *et al.*²⁴ compararam os resultados do TPL entre 20 pacientes com DCA ao cromo e 20 controles utilizando diversos

parâmetros. Foram realizadas culturas de curta e longa duração (3 e 6 dias) empregando diferentes concentrações (0,000133 a 133,23 μ g/mL) de um sal trivalente (cloreto de cromo) e (0,147 η g/mL a 147 μ g/mL) de outro hexavalente (bicromato de potássio). Os autores concluíram que culturas de longa duração estimuladas com 333,33 μ g/mL de cloreto de cromo oferecem a melhor acurácia para o teste. Doze casos e apenas um controle responderam ao método utilizando esses parâmetros, determinando uma sensibilidade de 60% e especificidade de 95%. Apesar das diferenças nas metodologias empregadas entre os artigos publicados a sensibilidade e especificidade do método foi semelhante nos estudos com maior casuística.

24,167,169

Os motivos para uma sensibilidade aquém do desejado nesse teste podem ser devido: a) ao emprego de monócitos para a apresentação antigênica no lugar das células dendríticas que são melhores apresentadoras de antígeno, b) baixa sensibilidade do método de detecção e c) ausência de um gatilho para dar início a reação “in vitro”.

Räsänen *et al.*²⁷ testaram o TPL utilizando células de Langerhans em quatro pacientes e obtiveram um incremento no índice de estimulação. Dentre esses pacientes se encontrava um que não havia respondido ao teste convencional, o índice de estimulação saltou de 2,32 para 4,36, tornando-se positivo se considerarmos $IE > 3$ como valor de corte. Outros 3 pacientes, que responderam ao teste convencional, apresentaram aumento de 1,3 a 3,5 vezes no índice de estimulação. Infelizmente nenhum controle foi testado com esse método, é improvável, porém possível que os controles

também apresentassem um incremento no IE. Além disso, o método é muito trabalhoso, não podendo ser utilizado hoje para substituir o teste de contato como rotina no diagnóstico da DCA.

Trattner *et al.*²⁸ seguiram outro caminho, tentaram aprimorar o método medindo por ELISA o INF- γ no sobrenadante das culturas de 24 horas de 20 pacientes alérgicos ao cromo e 30 controles. As culturas foram estimuladas com bicromato de potássio (0.5 e 1 $\mu\text{cg/mL}$) e fitohemaglutinina, um mitógeno utilizado para iniciar a reação. Quatorze pacientes e 6 controles responderam, havendo diferença entre os grupos ($P = 0,001$). Em comparação com o teste de contato a detecção de INF- γ apresentou sensibilidade e especificidade de 73,7% e 71,4% respectivamente. Resultados ainda pouco encorajadores.

Em 2005, Moed *et al.*²⁹ estudaram a resposta proliferativa de 4 pacientes alérgicos ao cromo em culturas de 6 dias com diferentes concentrações de CrCl_3 (1, 10 e 100 $\mu\text{g/ml}$) e $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (0,01; 0,1 e 1 $\mu\text{g/ml}$). Nenhum dos pacientes respondeu. Os autores passaram a estimular as culturas de 6 dias com as combinações de citocinas IL-7 e IL-12 e IL-7 e IL-4 e avaliaram a proliferação e a produção de INF- γ e IL-5. A IL-7 foi escolhida por aumentar a ativação celular e a IL-12 e IL-4 por estimularem a produção de citocinas Th1 (INF- γ) e Th2 (IL-5) respectivamente. Esse método foi aplicado em 7 casos e 7 controles. Os resultados variaram de acordo com o método de detecção utilizado. Três casos e nenhum controle responderam quando o método de aferição foi o índice de estimulação, 4 casos e um controle com a detecção de INF- γ e os sete casos e um controle quando a

aferição foi feita pela detecção de IL-5. O mesmo resultado foi obtido com a detecção de IL-5 em sete pacientes alérgicos ao níquel e sete controles, mas resultados inferiores foram encontrados com o cobalto, fragrância, parafenilenodiamina e metilcloroisotiazolinona.

Akerman *et al.*³⁰ realizaram a detecção simultânea de 10 citocinas no sobrenadante das culturas de 6 dias de 20 pacientes alérgicos ao cromo usando o kit “Luminex liquichip array”. Todas as citocinas testadas (GM-CSF, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, INF- γ , e TNF- α), exceto pelo TNF- α , estavam significativamente aumentadas e os autores sugerem que esses resultados podem levar ao desenvolvimento de testes, baseados na detecção de citocinas, para o diagnóstico da hipersensibilidade ao cromo. Infelizmente os testes não foram realizados em um grupo controle.

Minang *et al.*³¹ detectaram a produção de IL-2, IL-4 e IL-13 por ELISpot e IFN- γ , IL-2 e IL-13 por ELISA nas culturas de 20 a 40 horas de células mononucleares do sangue periférico de 31 pacientes com eczema e teste de contato positivo para os metais níquel, cobalto, cromo, paládio e ouro e de 5 controles saudáveis com teste de contato negativo. A intenção dos autores era determinar se a resposta dos demais metais é uma resposta mista, tanto Th1 quanto Th2, como está bem determinado para o níquel. Concluíram que todos os metais testados levam a uma resposta mista, com aumento na produção de citocinas padrão Th1 e Th2. Dentre os pacientes, nove eram alérgicos ao cromo. Para o ELISA os autores adotaram como critério de resposta ao cromo um incremento no valor encontrado na cultura estimulada sobre a aferição da cultura basal aliado a uma razão entre a

cultura estimulada e a cultura basal que deveriam ser respectivamente da ordem de: $\geq 30\text{pg/mL}$ e 4 vezes para o $\text{INF-}\gamma$, $\geq 20\text{pg/mL}$ e 3,3 vezes para a IL-2 e $\geq 12,5\text{pg/mL}$ e 4 vezes para a IL-13. Para o ELISpot os critérios foram os mesmos mas o aumento nas citocinas deveria ser de: ≥ 12 “spots” e 2 vezes para a IL-2, ≥ 4 “spots” e 2 vezes para a IL-4 e ≥ 10 “spots” e 2 vezes para a IL-13. Seis dos nove pacientes apresentaram resposta a pelo menos uma das citocinas em pelo menos um dos métodos, ELISA ou ELISpot. Os três pacientes que não responderam foram os que apresentaram resposta de menor intensidade ao cromo no TC, apenas eritema e edema sem a formação de pápulas ou vesículas. Além disso, os três apresentaram positividade intensa, com formação de vesículas, ao níquel, um ao cloreto de cobalto e outro eritema e edema ao paládio e ouro. Assim a ausência de positividade nesses pacientes pode se dever a baixa sensibilidade do método ou a reações falso-positivas com os metais.

Em 2008, Lindemann *et al.*³² testaram os métodos celulares de detecção “in vitro” de alergia ao cromo a fim de estabelecer a capacidade dos mesmos discernirem alergia de sensibilização, estado em que há reatividade no teste de contato, mas ao contrário da alergia não ao contato habitual com o agente em questão. Lembram que reações irritantes são comuns no TC para o cromo, até uma em duas reações são irritantes quando o cromo é testado na forma de bicromato de potássio a 0,5%, dificultando o diagnóstico.¹⁷⁰ Assim um TC positivo para o cromo tem significado clínico limitado, devendo ser correlacionado à clínica do paciente.¹⁷¹ Todavia, nos casos crônicos de DC, evento bastante comum na

alergia ao cromo, é difícil diferenciar a DCI da DCA pelo quadro clínico.^{32,163} Esses dados levaram os autores a buscar por métodos diagnósticos alternativos que possam preferencialmente distinguir entre sensibilização e alergia. Os autores estudaram o TC, TPL e ELISpot em 37 pacientes alérgicos ao cromo, 19 sensibilizados e 26 voluntários.

Com relação ao TPL demonstraram que culturas de 7 dias estimuladas com 12,5µg/mL de cloreto de cromo ou 50 ng/mL de bicromato de potássio são capazes de discernir entre alérgicos e sensibilizados, a proliferação linfocitária foi estimulada nos alérgicos mas não nos sensibilizados. Todavia, o resultado foi significativo quando o critério de resposta adotado era o valor obtido pela subtração daquele encontrado nas culturas estimuladas menos o das culturas não estimuladas, mas não com o valor encontrado pela razão entre as culturas, apesar dos autores terem encontrado correlação entre os dois critérios ($r = 0.85$ e $P < 0,0001$). A positividade nas culturas estimuladas com cloreto de cromo e/ou bicromato de potássio ocorreu em 23 de 33 pacientes alérgicos (70%), 5 de 16 sensibilizados (31%) e 5 de 25 controles (20%) e se mostrou um fator preditivo forte para alergia, tanto na comparação com pacientes sensibilizados quanto controles, $P = 0,004$ e $< 0,0001$ respectivamente.

O ELISpot foi utilizado para dosar as citocinas IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10 e IL-12 nas culturas de 48 horas dos pacientes alérgicos, sensibilizados e controles. Não houve diferença na produção dessas citocinas entre os grupos de pacientes alérgicos e sensibilizados. Os pacientes alérgicos apresentaram maior produção de IFN- γ que os controles ($P < 0,05$). A

resposta do IFN- γ , mas não a das demais citocinas, se correlacionou a com a intensidade da resposta encontrada no TC ($r = 0.49$ e $P = 0.002$). Em contraste, não houve correlação entre as respostas encontrada no TC e no TPL. Em conjunto, alergia se correlacionou a resposta no TPL e a resposta do TC a do IFN- γ detectado pelo ELISpot. Os autores concluem que o TPL é melhor que a detecção de citocinas pelo ELISpot para distinguir pacientes alérgicos de sensibilizados mas admitem que novos trabalhos que avaliem diferentes condições de cultura para a detecção de citocinas devem ser feitos para determinar os parâmetros mais adequados para esse teste. Em particular defendem o aumento no período de incubação que como chamado a atenção por Keating *et al.*¹⁷² pode levar a identificação de outros fenótipos de células T, como as células T de memória central.

Um resumo dos principais trabalhos sobre TPL com cromo está disponível no quadro 1.

Quadro 1 - Trabalhos sobre teste de proliferação linfocitária com cromo

| Autores | Células | Sal utilizado | Concentração nas culturas ^{*1} | Período de cultura ^{*1} | Método de aferição | Resultado |
|---------------------------------------|-------------------|---|--|--|--|--|
| Grosfeld ¹⁶⁵ (1966) | Leucócitos totais | K ₂ Cr ₂ O ₇ | 0,0294 a 2,94 η g/mL | 3-4 dias | Blastos | I |
| Lischka ¹⁶⁶ (1971) | Leucócitos totais | K ₂ Cr ₂ O ₇ | 2,94 η g/mL | 5 dias | Blastos | S = 87% E = 80% |
| Christiansen ¹⁶⁷ (1979) | “PBMN cells” | CrCl ₃ | 26,65 μ g/mL | 6 dias | IE > 3 | S = 62% E = 91% |
| Al-Tawil ¹⁶⁹ (1983) | “PBMN cells” | Diversos | 25, 50 e 100 μ g/mL (CrCl ₃) | 7 e 8 dias | IE >1 e > co | S = 65% E = 92% |
| Carando ¹⁶⁸ (1985) | “PBMN cells” | CrCl ₃ | 0,5 μ g/mL | 56 horas (2,33 dias) | IE | S = 100% E = NT |
| Räsänen ²⁷ (1991) | “PBMN cells” | Diversos | 25 e 50 μ g/mL (CrCl ₃) | 7 e 8 dias | IE > 2,5 | S = 75% E = 100% |
| Trattner ²⁸ (2003) | “PBMN cells” | K ₂ Cr ₂ O ₇ | 0,5 e 1 μ cg/mL | 1 dia | IFN- γ | S = 74% E = 71% |
| Moed ²⁹ (2005) | “PBMN cells” | CrCl ₃ e K ₂ Cr ₂ O ₇ | 1, 10 e 100 μ g/mL (CrCl ₃) | 6 dias | IE, IFN- γ e IL-5 | S = 100% E = 86% |
| Martins ²⁴ (2006) | “PBMN cells” | CrCl ₃ | 333,33 μ g/mL | 6 dias | IE > 3 | S = 60% E = 95% |
| Ackerman ³⁰ (2006) | “PBMN cells” | K ₂ Cr ₂ O ₇ | ND | ND | Diversas citocinas ^{*2} | P < 0.05 ^{*3} NT |
| Minang ³¹ (2006) | “PBMN cells” | CrCl ₃ e K ₂ Cr ₂ O ₇ | 100 μ g/mL (CrCl ₃) | 20 a 40 horas | IL-2, 4, 13 e IFN- γ ^{*4} | S = 67% ^{*5} E = 100% ^{*5} |
| Lindemann ³² (2008) | “PBMN cells” | CrCl ₃ e K ₂ Cr ₂ O ₇ | 12,5 μ g/mL ^{*6} 50 μ g/mL ^{*7} | 7 e 8 dias ^{*8} 48 horas ^{*9} | IE, Δ cpm, citocinas ^{*10} | S = 70% ^{*11} E = 80% ^{*11} |

^{*1} – os parâmetros que levaram aos melhores resultados; K₂Cr₂O₇ – bicromato de potássio; I – inconclusivo; S – sensibilidade; E – especificidade; “PBMN cells” – células mononucleares do sangue periférico; CrCl₃ – cloreto de cromo; IE – índice de estimulação; co – controle testado simultaneamente; NT – não testada pela ausência de grupo controle; ND – não disponível; ^{*2} – GM-CSF, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, INF- γ , e TNF- α ; ^{*3} – aumento de todas as citocinas, exceto TNF- α ; ^{*4} – o valor de corte foi diferente para cada citocina; ^{*5} – considerando todas as citocinas testadas; ^{*6} – melhor valor de CrCl₃ para distinguir pacientes alérgicos de sensibilizados; ^{*7} – valor de CrCl₃ com o qual houve diferença na produção de IFN- γ entre alérgicos e não alérgicos; ^{*8} – melhor período para o teste de proliferação convencional; ^{*9} – período usado para a detecção de citocinas; ^{*10} – os valores de corte não foram descritos e as citocinas testadas foram: IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10 e IL-12; ^{*11} – valor para o teste de proliferação, as resposta as citocinas não foram descritas.

MÉTODOS

4 Métodos

4.1 Seleção de pacientes

37 pacientes foram selecionados no ambulatório de alergia da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) entre novembro de 2009 e janeiro de 2010. Dezoito pacientes apresentavam história, clínica e teste de contato recente, teste realizado a menos de dois anos, compatíveis com DCA por cromo e formaram o grupo de casos. Os dados da história levados em consideração foram: à existência de exposição ao cromo, o tempo transcorrido entre a exposição e o surgimento das lesões, a recorrência frente às exposições repetidas e a melhora, ao menos parcial, na ausência da exposição. Com relação ao exame físico especial atenção foi dada à morfologia, que deveria ser compatível com eczema e a topografia das lesões, que deveriam ocorrer nos locais da exposição. Os outros 19 pacientes tinham história e clínica não condizentes com DCA por cromo bem como teste de contato recente negativo para o metal, esses pacientes foram incluídos no grupo de controles. Nesse estudo foram excluídos pacientes menores de 18 anos idade, gestantes ou que fizeram uso de corticosteróide sistêmico por um período mínimo de 4 semanas antes da realização do TC e do TPL.

Antes da coleta do exame todos os pacientes foram informados quanto ao procedimento e a finalidade do estudo. Receberam e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Características dos grupos:

- 1) Grupo de casos: 18 pacientes, sendo 17 do gênero masculino e 1 feminino, com idade entre 36 e 65 anos (média 50 anos) apresentando história e clínica compatível com sensibilização ao cromo confirmada por teste de contato.
- 2) Grupo controle: 19 pacientes, sendo 11 do gênero masculino e 7 feminino com idade entre 26 e 68 anos (média 44 anos) sem história ou clínica compatível com sensibilização ao cromo com teste de contato negativo para bicromato de potássio.

4.2 Teste de contato

Todos os testes de contato foram realizados no ambulatório de Dermatologia do HC-FMUSP. Os testes foram efetuados utilizando a bateria brasileira padronizada de teste de contato (IPI-ASAC Brasil[®], Rio de Janeiro, Brasil). Essa bateria é formada por 30 substâncias sendo o bicromato de potássio testado a 0,5% em vaselina sólida. Dois controles também foram testados com a bateria de teste de contato para cosméticos (IPI-ASAC Brasil[®], Rio de Janeiro, Brasil) e um com o próprio esmalte. As substâncias que compõem essas baterias estão a disposição nos quadros 2 e 3, disponíveis nos anexos.

Os alérgenos foram aplicados no dorso superior com o auxílio de contensores (IPI-ASAC Brasil[®], Rio de Janeiro, Brasil – registro no MS-ANVISA nº 103.423.100.28) presos por fita adesiva hipoalergênicas (3M[®]) após preparo da pele com solução de éter. Os pacientes receberam as orientações necessárias e após 48 horas o teste era retirado e a primeira leitura feita. Em 96 horas o paciente retornava para a segunda leitura e orientações quanto aos resultados.

Os critérios utilizados para avaliar os resultados foram estabelecidos pelo “*International Contact Dermatitis Research Group*” – ICDRG.¹⁷³ Dessa forma os resultados foram divididos em:

negativo (-): sem reação;

duvidoso (+?): eritema mal definido;

positivo fraco (+): eritema definido e pápula;

positivo forte (++) : eritema, pápula e vesículas;

positivo muito forte (+++) : eritema, pápula e vesículas confluentes;

RI: reação irritativa.

Para ser considerado sensibilizado ao alérgeno testado o resultado deveria ser positivo em 96 horas com intensidade igual ou superior à da leitura de 48 horas. Nos casos em que houve positividade de 3 ou mais substâncias não relacionadas o teste foi repetido.

4.3 Teste de proliferação linfocitária

Foram colhidos quinze mililitros de sangue venoso periférico de cada paciente, em tubo estéril heparinizado, no ambulatório de Dermatologia do HC-FMUSP. O sangue foi processado dentro de 2 horas no Laboratório de Investigação em Alergia e Imunologia Clínica e Experimental (LIM 56) da FMUSP.

Em fluxo laminar, o sangue era transferido para um tubo cônico de 50ml ao qual era adicionado igual quantidade de solução salina isotônica, 15ml. Após homogeneizar o conteúdo o sangue era transferido lentamente, através de uma pipeta de transferência, para outro tubo cônico de 50ml contendo 12,5ml de Ficoll-Hypaque. O Ficoll-Hypaque é um gradiente de densidade que facilita a separação e colheita das células mononucleares do restante do sangue após a centrifugação.

A centrifugação era feita a 2200rpm por 20 minutos em uma centrífuga refrigerada e o conteúdo (sangue e Ficoll-Hypaque) separava-se em fases. A superior era formada pelo plasma, amarelo citrino. Logo abaixo, a segunda fase, formada pelas células mononucleares, apresentava-se como um anel esbranquiçado. A terceira fase era composta pelo Ficoll-Hypaque, incolor ou ligeiramente esbranquiçado e a quarta, na porção inferior do tubo, era formada pelos eritrócitos e granulócitos que conferiam a cor vermelha.

Apenas o anel de células mononucleares era transferido, pelo auxílio de uma pipeta de transferência, para um tubo cônico de 15ml contendo 1ml de soro fisiológico. Após a transferência o conteúdo do tubo era completado para 10ml com soro fisiológico e centrifugado a 1100rpm por 10 minutos em centrífuga refrigerada. Essa etapa visa eliminar o Ficoll-Hypaque residual devido à sua ação citotóxica.

Ao término da centrifugação o sobrenadante era desprezado e o botão de células presente no fundo do tubo cônico era resuspenso em 1ml de soro fisiológico. O volume era novamente completado para 10ml e centrifugado a 1100rpm por 10 minutos em centrífuga refrigerada.

Novamente, o sobrenadante era desprezado e o botão resuspenso, porém nessa etapa, em 1ml de RPMI 1640 (*Rosewell Park Memorial Institute culture medium*). O RPMI 1640 foi o meio de cultura empregado nas culturas.

Após a homogeneização do conteúdo 100 μ l da suspensão eram levados para a contagem de células no aparelho *Cell Dyn 1400*. As células eram transferidas para um tubo cônico contendo RPMI 1640 enriquecido com 10% de soro humano AB. A quantidade da suspensão de células transferida era ajustada para que a suspensão final tivessem 2×10^6 células/ml.

4.3.1 Teste de proliferação linfocitária para detecção da ativação celular pela taxa de captação de timidina radiomarcada

As culturas foram feitas em triplicatas em placas de 96 orifícios com fundo chato (TPP[®], Switzerland, Europe). Em cada orifício foram adicionados 100µl da suspensão de células e 100µl de antígeno ou mitógeno a ser testado diluído em RPMI. Uma triplicata, chamada de basal, era preparada com 100µl de células e 100µl de RPMI 1640, sem antígeno ou mitógeno. Essa cultura é a cultura não estimulada, usada como denominador no cálculo do índice de estimulação.

O mitógeno testado foi o Pokeweed – 5µl/ml (PWM - Sigma[®]). Os mitógenos são utilizados para verificar a integridade do sistema imunológico. O antígeno testado foi o cloreto de cromo hexahidratado (CrCl₃.6H₂O – fornecido pela Merck, Darmstadt, Alemanha, com pureza ≥ 96%). O sal trivalente foi diluído no meio RPMI 1640 para formar soluções a 10⁻² M. Essas soluções foram homogeneizadas e estocadas a -70°C até o uso. Durante o TPL a solução de cloreto de cromo a 10⁻² M era diluída para 2,5.10⁻³ M, equivalente a 666,66µg/mL. A concentração final das culturas era a metade dessa concentração, já que as culturas eram compostas por 100µl da suspensão de células e 100µl da solução.

As células foram cultivadas em triplicatas por 6 dias a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. O mitógeno PWM era testado como controle positivo.

Dezoito horas antes do término das culturas, 25µl de timidina tritiada (³H-thymidine, Amershan Pharmacia Biotech, UK; specific activity 25Ci/mmol) diluída em RPMI 1640 (1:100) foi adicionada em cada cultura para ser incorporada pelas células em quantidade diretamente proporcional ao seu estado de ativação.

Completado o período de incubação as células eram aspiradas por um coletor de células automático (*Cell-Harvester, Skatron Instruments, UK*) e passadas para uma membrana de fibra de vidro que era deixada para secar por 24 horas.

Após o período de secagem, as membranas eram banhadas com líquido de cintilação e seladas em envelopes plásticos. Passavam por um contador de cintilação (*Betaplate, Wallac, Finlândia*) que determinava a captação de timidina radiomarcada em cada cultura e dava o resultado em contagens por minuto (cpm). A média das triplicatas era calculada e os resultados expressos em índice de estimulação (IE) que é a razão entre a média de captação de timidina radiomarcada das culturas estimuladas e a média encontrada nas culturas não estimuladas.

$$\text{Índice de estimulação (IE)} = \frac{\text{média da captação nas culturas estimuladas}}{\text{média da captação nas culturas não estimuladas}}$$

4.3.2 Teste de proliferação linfocitária para detecção da ativação celular pela produção de citocinas

As culturas foram realizadas em monoplicatas em placas de 96 orifícios com fundo chato (TPP[®], Switzerland, Europe). Em cada orifício foram adicionados 100µl da suspensão de células e 100µl de meio RPMI ou da solução de cloreto de cromo a $2,5 \cdot 10^{-3}$ M, formando culturas não estimuladas, também denominadas de culturas basais e estimuladas respectivamente. As culturas para a detecção de citocinas foram preparadas ao mesmo tempo e nas mesmas condições que as culturas para detecção por timidina radiomarcada, mas em placas diferentes.

Ao término do período de incubação as culturas foram centrifugadas, para separar as células do sobrenadante e o sobrenadante transferido para tubos plásticos identificados e armazenados a -70°C até a dosagem das citocinas.

Os resultados da detecção de citocinas foram expressos em pg/mL. Os critérios usados para positividade dos testes foram: o aumento na produção de citocinas determinado pela diferença entre a produção encontrada nas culturas estimuladas menos a produção da cultura basal, diferença essa aqui denominada de delta (Δ) e pela razão entre o valor encontrado nas culturas estimuladas e as culturas basais, denominada de índice de estimulação (IE).

$$\text{Delta } (\Delta) = \frac{\text{valor encontrado nas culturas estimuladas}}{\text{valor encontrado nas culturas basais}}$$

$$\text{Índice de estimulação (IE)} = \frac{\text{valor encontrado nas culturas estimuladas}}{\text{valor encontrado nas culturas basais}}$$

4.4 Dosagem das citocinas no sobrenadante das culturas

4.4.1 “Luminex liquichip array”

A dosagem das citocinas foi realizada utilizando o sistema “luminex liquichip array”. Esse sistema permite a dosagem simultânea de múltiplas citocinas no sobrenadante de culturas. Nesse método microesferas de poliestireno são coradas com dois fluorocromos espectrais distintos (figura 2). Utilizando uma proporção precisa destes dois fluorocromos foram criadas 100 microesferas diferenciadas pela sua cor. Cada esfera é conjugada a um anticorpo de captura específico que se ligará ao seu antígeno quando encontra-lo. A vantagem desse método reside na utilização de esferas de especificidades diferentes para a detecção simultânea de vários antígenos em uma amostra.



Fig 2. Microesferas de poliestireno coradas de forma singular.

As microsferas foram incubadas com o sobrenadante das culturas. Após a incubação a amostra foi lavada para remover as microsferas que não se ligaram aos seus respectivos antígenos. Em seguida um anticorpo de detecção biotilado, que se liga ao complexo antígeno-anticorpo preso a microsfera de poliestireno, foi incubado com a amostra. O resultado final era amplificado através da incubação com o conjugado estreptavidina-ficoeritrina que emite um sinal fluorescente (figura 3). As microsferas foram lidas no equipamento Luminex 100[®] através de um sistema duplo de lasers que incide nas microsferas à medida que estas passavam pelo aparelho. Um feixe de laser detectava a cor da microsfera e portanto o ensaio relacionado a sua cor e o outro laser quantificava o sinal em cada microsfera (figura 4).

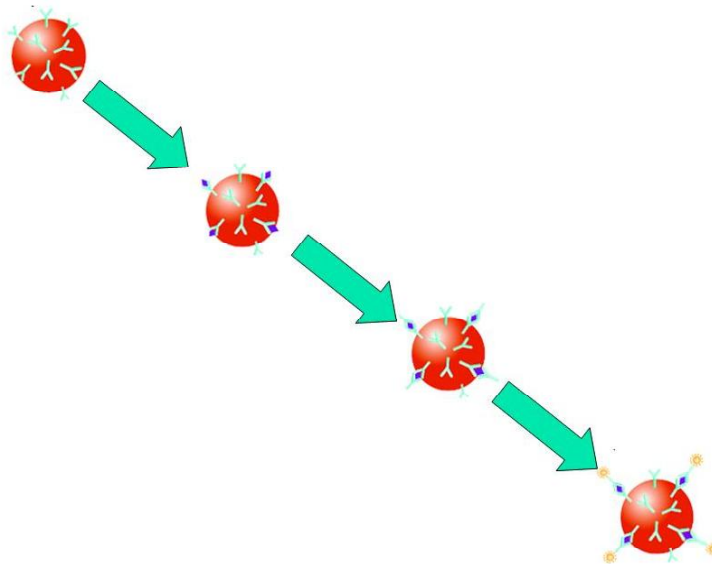


Fig 3. A esfera com o anticorpo é incubada com a amostra e se liga ao seu antígeno. A amostra é lavada e incubada com um anticorpo biotilado que se liga ao complexo antígeno-anticorpo. O resultado é amplificado pela

incubação com o conjugado estreptavidina-ficoeritrina que emite um sinal fluorescente.

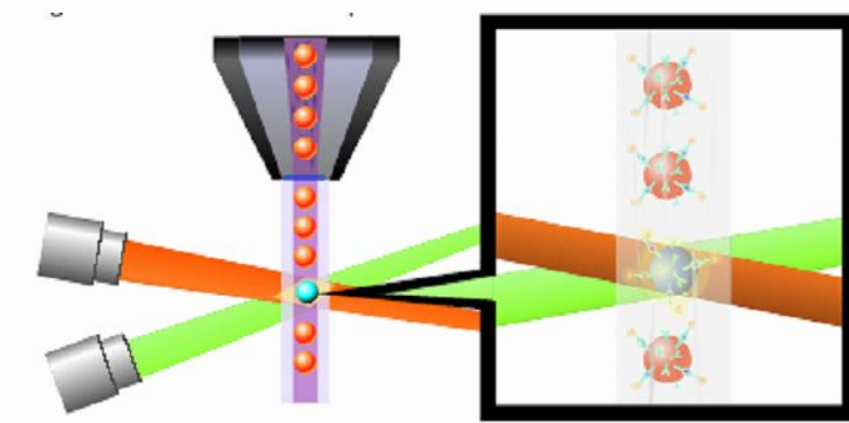


Fig 4. Os feixes de laser incidem sobre as esferas permitindo a detecção do ensaio e da intensidade da resposta.

4.4.2 Citocinas testadas

As citocinas escolhidas para estudo foram o IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17 e RANTES. Os valores médios mínimos de detecção dessas citocinas com o método são: 0,1; 0,3; 0,6; 0,1; 0,3; 0,4; 0,4; 0,2 e 1,0pg/mL respectivamente. Para os cálculos estatísticos todos os valores encontrados abaixo da capacidade de detecção do método foram trocados para o valor médio mínimo de detecção de cada citocina.

4.4 Métodos estatísticos

Para a avaliação estatística foram utilizados os testes não paramétricos de Mann-Whitney U e o teste de correlação de Spearman (software GraphPad Prism[®] versão 3.0) e os resultados foram considerados significantes quando $P < 0,05$. A sensibilidade, especificidade e acurácia dos métodos foram calculadas.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Seleção dos grupos

O grupo de casos foi formado por 18 pacientes, sendo 17 do gênero masculino e 1 feminino e o grupo controle por 19 pacientes, 11 do gênero masculino e 7 feminino. A idade do grupo de casos variou entre 36 e 65 anos (média 50 anos) e do grupo controle de 26 a 68 anos (média 44 anos), não havendo diferença estatística significativa ($P = 0.1913$).

5.2 Testes de contato

Todos os casos apresentaram teste de contato positivo (+, ++ ou +++) para cromo. Em um paciente o teste foi positivo fraco (+), em treze positivo forte (++) e em quatro positivo muito forte (+++). Além do cromo, oito pacientes eram sensibilizados ao carba-mix, cinco ao tiuram-mix e ao sulfato de níquel, três ao cobalto e um ao PPD-mix, formaldeído, nitrofurasona e quinolina.

Todos os controles apresentaram teste de contato negativo para bicromato de potássio. Cinco pacientes eram sensibilizados ao sulfato de níquel, dois ao cobalto, colofônio, neomicina e perfume-mix e um à

benzocaína, clorexidine, etilenodiamina, esmalte, formaldeído, nitrofurazona, timerosal, tioglicolato de amônia e tiuram-mix.

Os resultados dos testes de contato dos casos e controles estão disponíveis no quadro 4, presente na sessão de anexos.

5.3 Testes de proliferação linfocitária

Tanto controles quanto casos apresentaram proliferação adequada ao serem estimulados com o mitógeno *pokeweed*, $P < 0.0001$ nos dois grupos, não existindo diferença nos índices de estimulação entre casos e controles, $P = 0.2185$ (Figuras 5 a 7).

No entanto, apenas o grupo de casos respondeu ao estímulo com cromo, $P < 0.0001$ e 0.2202 para casos e controles respectivamente (figuras 8 e 9). Os índices de estimulação encontrados nos grupos de casos e controles estimulados com cromo também foram diferentes, $P = 0.0014$ (figura 10).

Seis dos 18 casos e nenhum controle apresentaram índice de estimulação superior a 3, apresentando o teste de proliferação linfocitária uma sensibilidade, especificidade e acurácia de 33%, 100% e 68%, respectivamente. Os valores encontrados nas culturas basais e estimuladas com cromo, bem como os índices de estimulação e os valores delta obtidos, estão disponíveis na tabela 1, presente nos anexos.

Fig 5. Contagens por minuto encontradas nas culturas basais e estimuladas com PWM do grupo de casos.

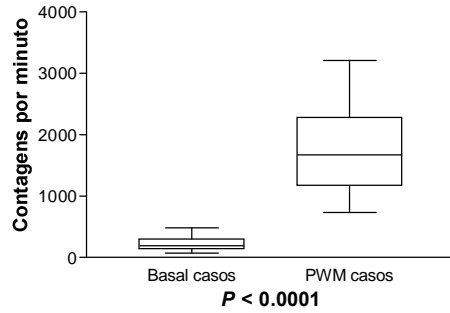


Fig 6. Contagens por minuto encontradas nas culturas basais e estimuladas com PWM do grupo controle.

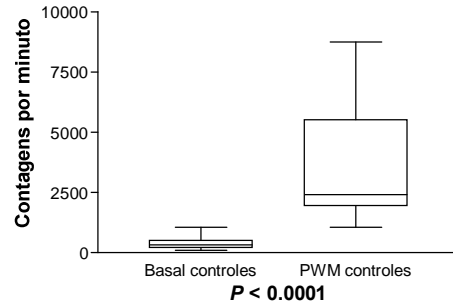


Fig 7. Índices de estimulação encontrados nos casos e controles estimulados com PWM.

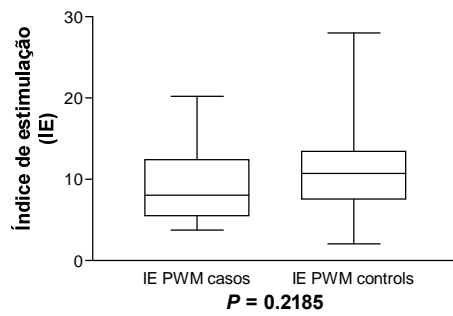


Fig 8. Contagens por minuto encontradas nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo de casos.

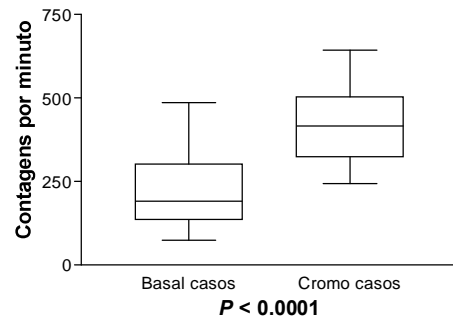


Fig 9. Contagens por minuto encontradas nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo controle.

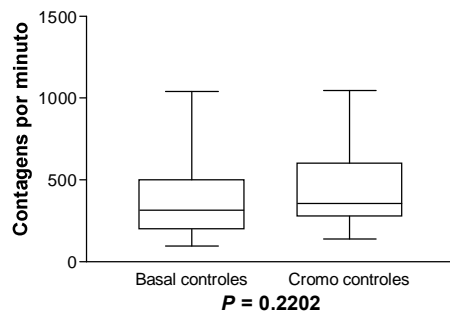
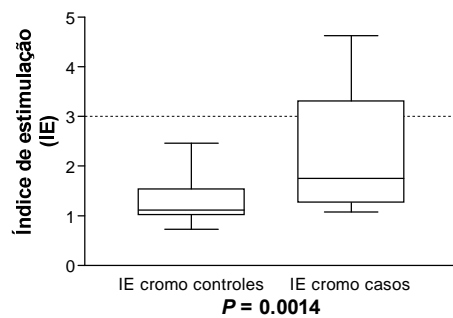


Fig 10. Índices de estimulação encontrados nos casos e controles estimulados com cromo.



5.4 Detecção das citocinas

5.4.1 Interferon-gama

Não foi encontrado diferença na produção de INF- γ entre as culturas basais de casos e controles, $P = 0.1406$ (figuras 11).

Houve aumento da produção de IFN- γ nas culturas estimuladas no grupo de casos, mas não no grupo controle - $P = 0.0005$ e 0.1290 respectivamente (figuras 12 e 13).

Os índices obtidos pela razão entre a produção de IFN- γ encontrada nas culturas estimuladas com cromo e nas não estimuladas no grupo de casos foram superiores aos vistos no grupo controle, $P = 0.0186$ (figura 14).

Da mesma forma os valores encontrados pela diferença na produção de IFN- γ entre as culturas estimuladas e não estimuladas com cromo no grupo de casos foram maiores do que os obtidos no grupo controle, $P = 0.0186$ (figura 15).

Os valores dos índices diagnósticos que apresentaram a melhor acurácia foram: IE superior a 6 e Δ maior que 50. Com esses valores de corte, a sensibilidade e especificidade do teste com o IE foi de 83% e 63% (acurácia de 73%) e com o Δ de 72% e 68% (acurácia de 70%). Todos os valores de INF- γ detectados e dos índices utilizados estão disponíveis na tabela 2, presente nos anexos.

Fig 11. Detecção de IFN- γ nas culturas basais dos casos e controles.

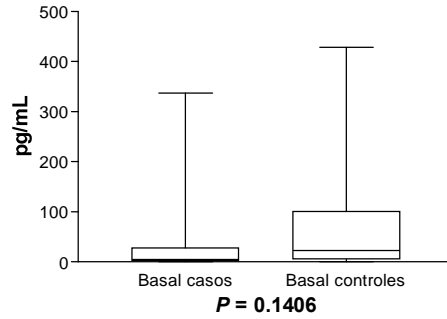


Fig 12. Detecção de IFN- γ nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo de casos.

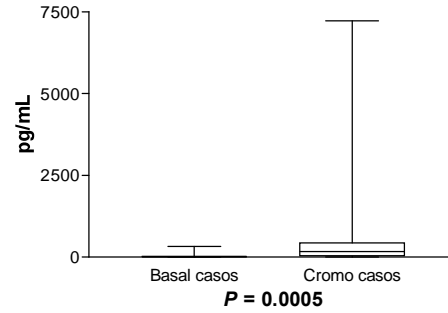


Fig 13. Detecção de IFN- γ nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo controle.

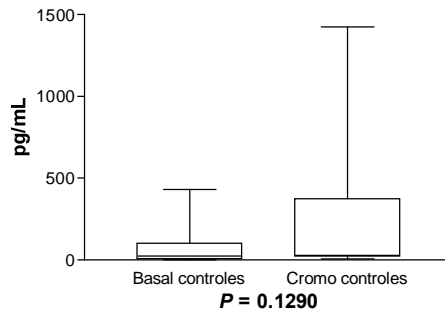


Fig 14. Índices de estimulação encontrados nas culturas dos casos e controles.

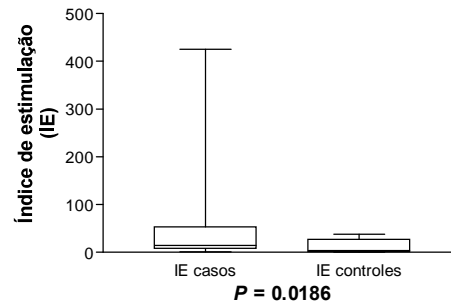
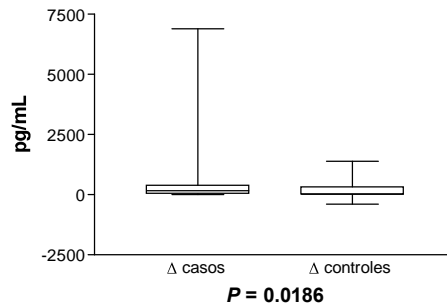


Fig 15. Diferença na detecção de IFN- γ entre as culturas estimuladas e basais dos grupos de caso e controle.



5.4.2 Interlucina-2

Não foi encontrado diferença na produção de IL-2 entre as culturas basais de casos e controles e nem entre as culturas basais e estimuladas do grupos, $P = 1$, 0.2110 e 0.1567, respectivamente (figuras 16 a 18).

Os valores obtidos pela razão entre as culturas estimuladas com cromo e as basais no grupo de casos foram superiores aos vistos no grupo controle, $P = 0.0465$ (figura 19).

No entanto, os valores encontrados pela diferença entre as culturas estimuladas e não estimuladas no grupo de casos não foram diferentes daqueles encontrados no grupo controle, $P = 0.0705$ (figura 20).

Os valores ótimos encontrados foram com um IE superior a 1,2. A sensibilidade e especificidade do teste com esse IE foram de 61% e 84% respectivamente, acurácia de 73%. Todos os valores de IL-2 detectados e dos índices utilizados estão disponíveis na tabela 3, presente nos anexos.

Fig 16. Detecção de IL-2 nas culturas basais dos casos e controles.

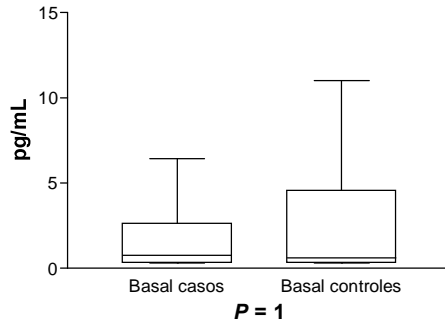


Fig 17. Detecção de IL-2 nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo de casos.

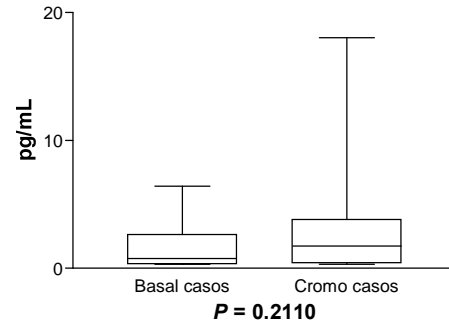


Fig 18. Detecção de IL-2 nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo controle.

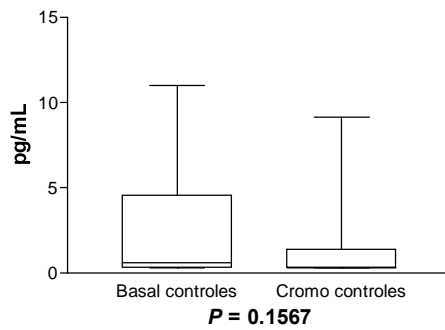


Fig 19. Índices de estimulação encontrados nas culturas dos casos e controles.

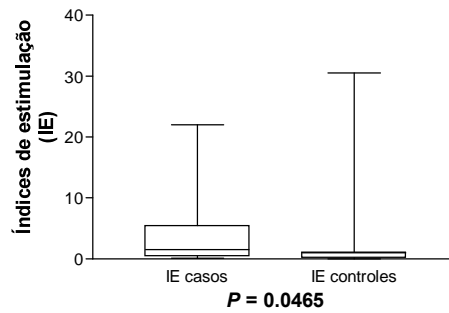
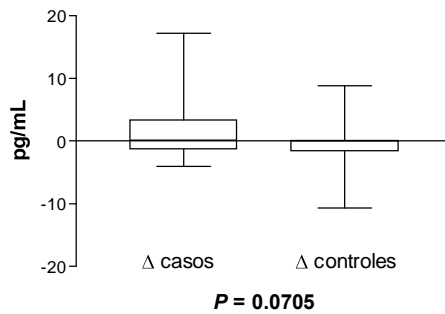


Fig 20. Diferença na detecção de IL-2 entre as culturas de estimuladas e basais dos grupos de caso e controle.



5.4.3 Interleucina-4

Foi encontrado maior produção de IL-4 nas culturas basais do grupo de casos em relação as culturas basais do grupo controle, $P = 0.0164$ (figura 21).

Não houve diferença entre os valores de IL-4 detectados nas culturas basais e estimuladas no grupo de casos, mas houve aumento nas culturas estimuladas em relação as basais no grupo controle – $P = 0.2114$ e 0.0265 respectivamente (figuras 22 e 23).

Os valores obtidos tanto pela razão quanto pela diferença entre as culturas estimuladas com cromo e as basais no grupo de casos não foram diferentes daqueles encontrados no grupo controle, $P = 0.6268$ e 0.7962 respectivamente (figuras 24 e 25). Todos os valores de IL-4 detectados e dos índices utilizados estão disponíveis na tabela 4, presente nos anexos.

Fig 21. Detecção de IL-4 nas culturas basais dos casos e controles.

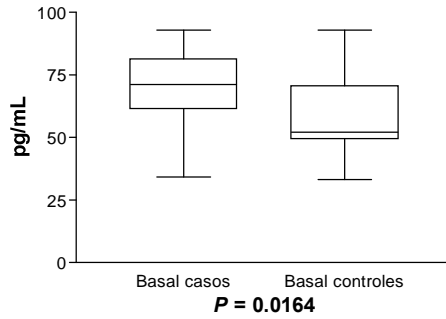


Fig 22. Detecção de IL-4 nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo de casos.

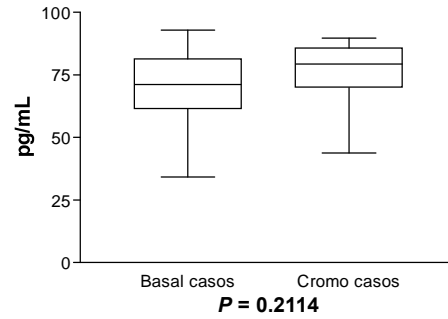


Fig 23. Detecção de IL-4 nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo controle.

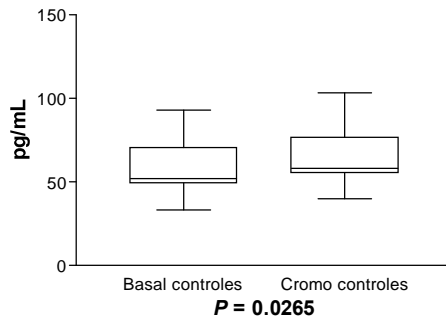


Fig 24. Índices de estimulação encontrados nas culturas dos casos e controles.

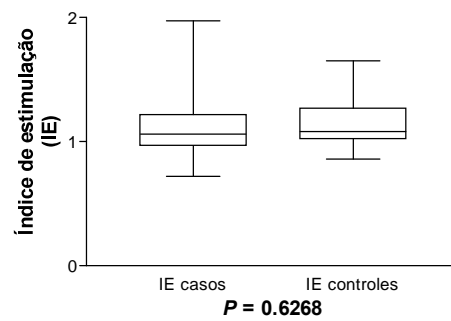
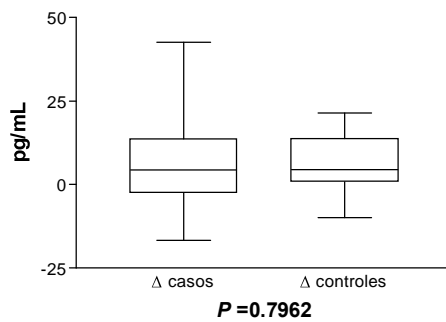


Fig 25. Diferença na detecção de IL-4 entre as culturas estimuladas e basais dos grupos de caso e controle.



5.4.4 Interleucina-5

Não foi encontrado diferença na produção de IL-5 entre as culturas basais dos casos e controles, $P = 0.069$ (figuras 26).

Houve aumento da produção de IL-5 nas culturas estimuladas no grupo de casos, mas não no grupo controle – $P = 0.0006$ e 0.7588 respectivamente (figuras 27 e 28).

Os valores obtidos tanto pela razão quanto pela diferença entre as culturas estimuladas e as basais no grupo de casos foram superiores aos vistos no grupo controle, $P = 0.0032$ e 0.0102 respectivamente (figuras 29 e 30).

Os valores ótimos de corte foram: IE superior 2 e Δ maior que 0,2. A sensibilidade, especificidade e acurácia do teste com esses parâmetros foram de 72%, 79% e 76% com esse IE e 56%, 89% e 73% com o Δ . Todos os valores de IL-5 detectados e dos índices utilizados estão disponíveis na tabela 5, presente nos anexos.

Fig 26. Detecção de IL-5 nas culturas basais dos casos e controles.

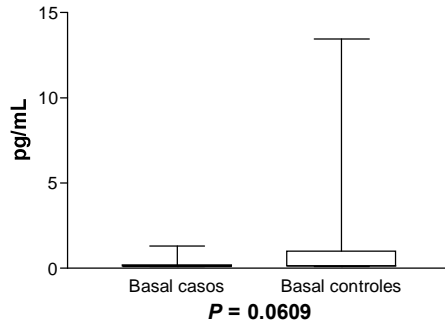


Fig 27. Detecção de IL-5 nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo de casos.

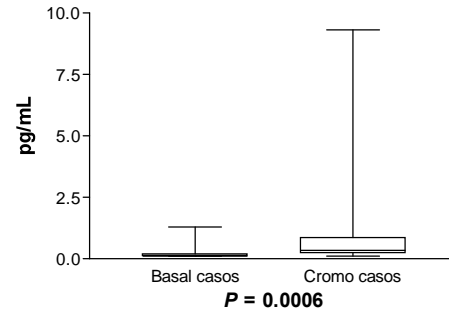


Fig 28. Detecção de IL-5 nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo controle.

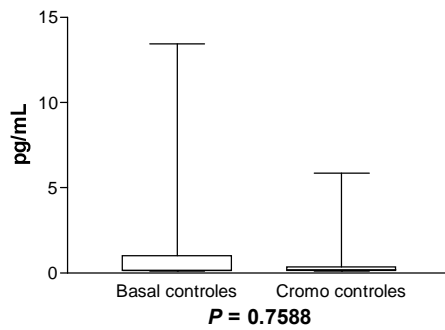


Fig 29. Índices de estimulação encontrados nas culturas dos casos e controles.

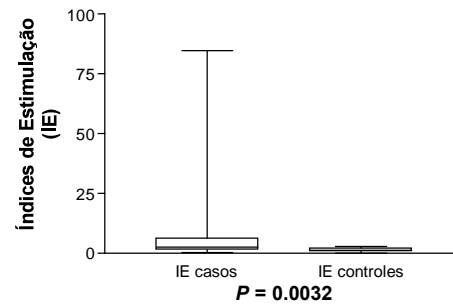
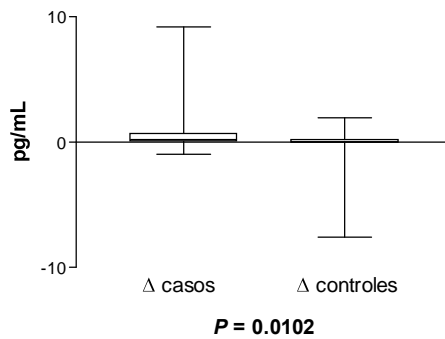


Fig 30. Diferença na detecção de IL-5 entre as culturas estimuladas e basais dos grupos de caso e controle.



5.4.5 Interleucina-10

Não foi encontrado diferença na produção de IL-10 entre as culturas basais dos casos e controles, $P = 0.6595$ (figuras 31).

Todavia, houve redução nos valores detectados nas culturas estimuladas com cromo tanto no grupo de casos quanto no grupo controle, $P < 0.0001$ e 0.0001 respectivamente (figuras 32 e 33).

Os valores obtidos pela razão e pela diferença entre as culturas estimuladas com cromo e as basais no grupo de casos não foram diferentes daqueles obtidos no grupo controle, $P = 0.2019$ e 0.7962 respectivamente (figuras 34 e 35). Todos os valores de IL-10 detectados e dos índices utilizados estão disponíveis na tabela 6, presente nos anexos.

Fig 31. Detecção de IL-10 nas culturas basais dos casos e controles.

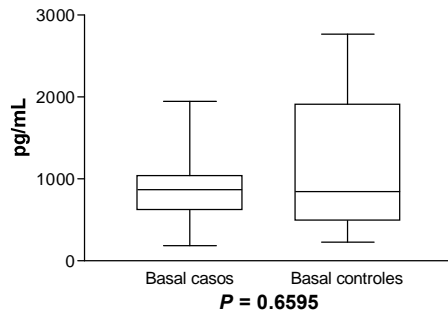


Fig 32. Detecção de IL-10 nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo de casos.

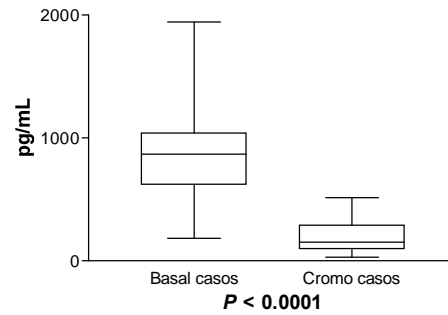


Fig 33. Detecção de IL-10 nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo controle.

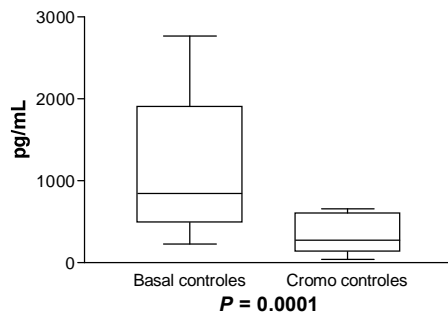


Fig 34. Índices de estimulação encontrados nas culturas dos casos e controles.

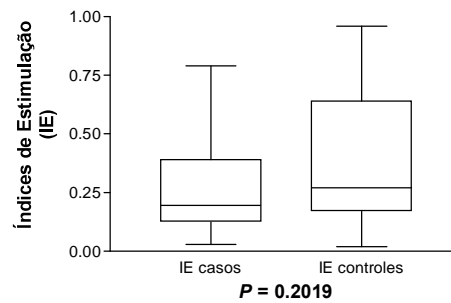
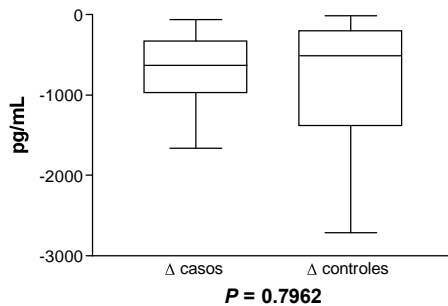


Fig 35. Diferença na detecção de IL-10 entre as culturas estimuladas e basais dos grupos de caso e controle.



5.4.6 Interleucina-12

Não foi encontrado diferença na produção de IL-12 entre as culturas basais de casos e controles, $P = 0.0946$ (figura 36).

Também não houve diferença entre os valores detectados nas culturas estimuladas e não estimuladas nos dois grupos, $P = 0.1940$ e 0.2999 respectivamente (figuras 37 e 38).

No entanto, os valores obtidos tanto pela razão quanto pela diferença entre as culturas estimuladas e as basais no grupo de casos foram superiores aos vistos no grupo controle, $P = 0.0024$ e 0.0050 (figuras 39 e 40).

Os melhores valores encontrados para o IE e o Δ foram: superior a 1,5 e 0,3 respectivamente. Com esses, a sensibilidade, especificidade e acurácia do teste foram de 50%, 84% e 68% para o IE e de 60%, 74% e 70% para o Δ . Todos os valores de IL-12 detectados e dos índices utilizados estão disponíveis na tabela 7, presente nos anexos.

Fig 36. Detecção de IL-12 nas culturas basais dos casos e controles.

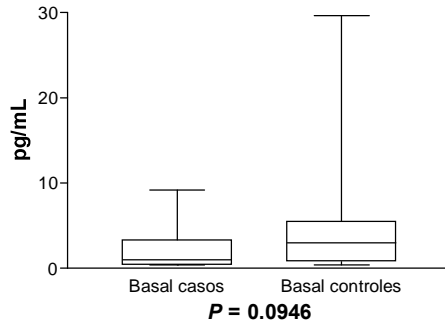


Fig 37. Detecção de IL-12 nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo de casos.

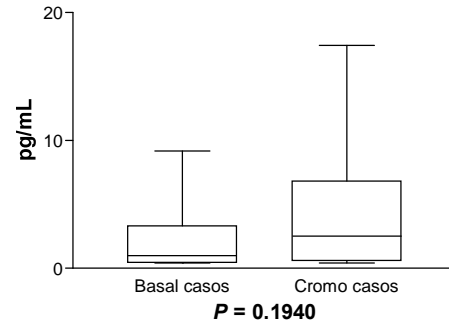


Fig 38. Detecção de IL-12 nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo controle.

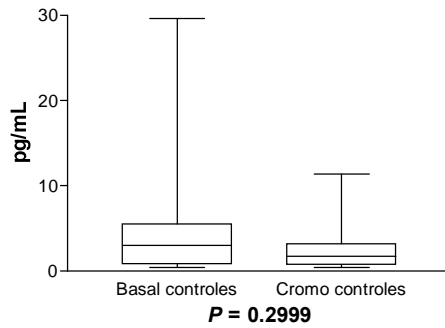


Fig 39. Índices de estimulação encontrados nas culturas dos casos e controles.

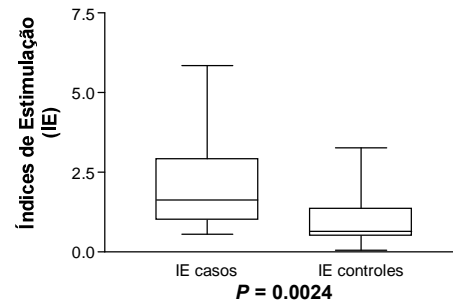
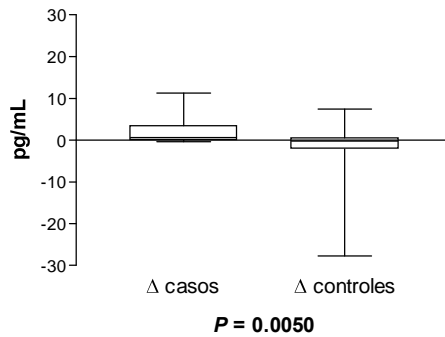


Fig 40. Diferença na detecção de IL-12 entre as culturas estimuladas e basais dos grupos de caso e controle.



5.4.7 Interleucina-13

Não foi encontrado diferença na produção de IL-13 entre as culturas basais de casos e controles, $P = 0.0945$ (figuras 41).

O cromo estimulou a produção de IL-13 nas culturas do grupo de casos, mas não nas culturas do grupo controle, $P < 0.0001$ e 0.9186 respectivamente (figuras 42 e 43).

Os valores encontrados tanto pela razão quanto pela diferença entre as culturas estimuladas com cromo e as basais no grupo de casos foram superiores aos obtidos no grupo controle, $P < 0.0001$ nas duas condições (figuras 44 e 45).

Utilizando os valores superiores a 3 para o IE e superior a 2 para o Δ , a sensibilidade, especificidade e acurácia do teste foram de 89%, 89% e 89% para o IE e 94%, 89% e 92% para o Δ . Todos os valores de IL-13 detectados e dos índices utilizados estão disponíveis na tabela 8, presente nos anexos.

Fig 41. Detecção de IL-13 nas culturas basais dos casos e controles.

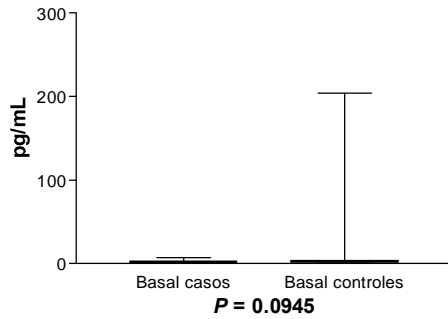


Fig 42. Detecção de IL-13 nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo de casos.

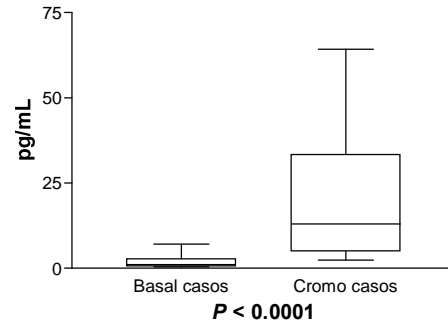


Fig 43. Detecção de IL-13 nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo controle.

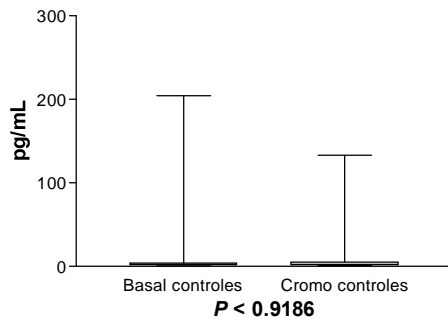


Fig 44. Índices de estimulação encontrados nas culturas dos casos e controles.

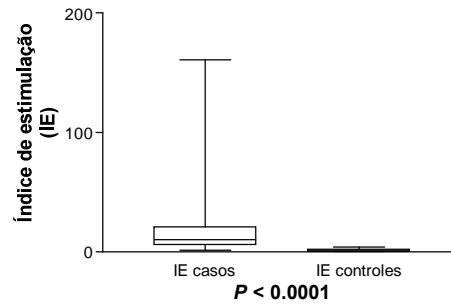
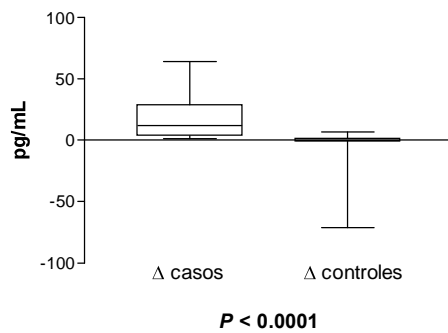


Fig 45. Diferença na detecção de IL-13 entre as culturas estimuladas e basais dos grupos de caso e controle.



5.4.8 Interleucina-17

Não foi encontrado diferença na produção de IL-17 entre as culturas basais dos grupos, $P = 0.4459$ (figura 46).

Também não houve diferença nos valores detectados nas culturas estimuladas e não estimuladas no grupo de casos e no grupo controle, $P = 0.3101$ e 0.1547 respectivamente (figuras 47 e 48).

Os valores obtidos pela razão e pela diferença entre as culturas estimuladas e as não estimuladas no grupo de casos não foram diferentes daqueles obtidos no grupo controle, $P = 0.0698$ e 0.0910 respectivamente (figuras 49 e 50). Todos os valores de IL-17 detectados e dos índices utilizados estão disponíveis na tabela 9, presente nos anexos.

Fig 46. Detecção de IL-17 nas culturas basais dos casos e controles.

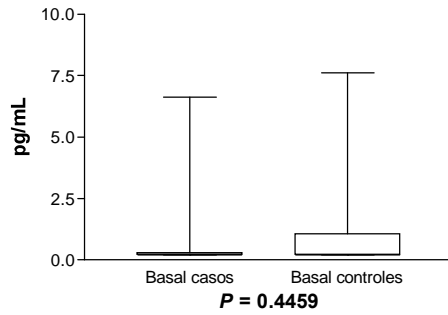


Fig 47. Detecção de IL-17 nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo de casos.

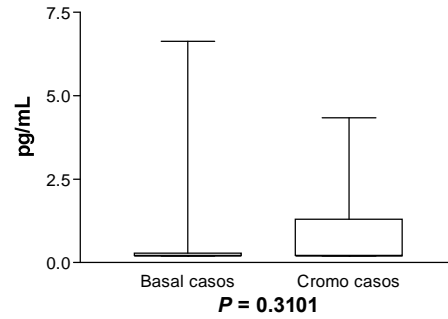


Fig 48. Detecção de IL-17 nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo controle.

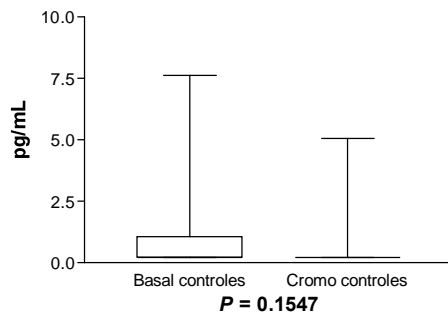


Fig 49. Índices de estimulação encontrados nas culturas dos casos e controles.

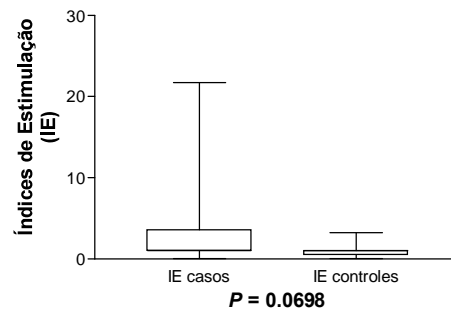
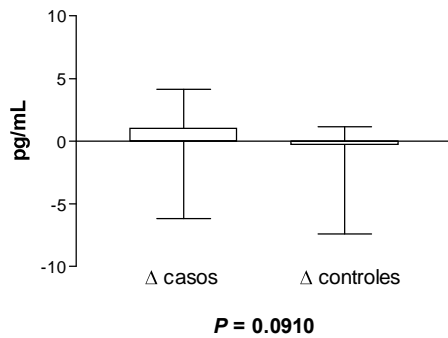


Fig 50. Diferença na detecção de IL-17 entre as culturas estimuladas e basais dos grupos de caso e controle.



5.4.9 RANTES

Não foi encontrado diferença na produção de RANTES entre as culturas basais de casos e controles, $P = 0.6161$ (figura 51). Já as culturas de casos e controles realizadas com cromo aumentaram a produção de RANTES, $P < 0,0001$ (figuras 52 e 53).

Já os valores obtidos pela razão e pela diferença entre as culturas estimuladas com cromo e as basais no grupo de casos foram iguais aos encontrados no grupo controle, $P = 0.5535$ e 0.6595 respectivamente (figuras 54 e 55). Todos os valores de RANTES detectados e dos índices utilizados estão disponíveis na tabela 10, presente nos anexos.

Fig 51. Detecção de RANTES nas culturas basais dos casos e controles.

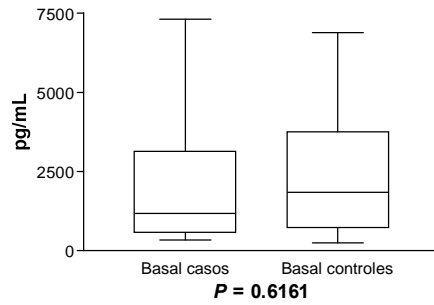


Fig 52. Detecção de RANTES nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo de casos.

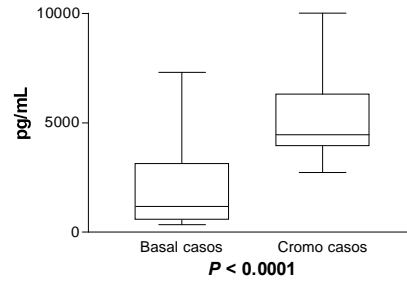


Fig 53. Detecção de RANTES nas culturas basais e estimuladas com cromo do grupo controle.

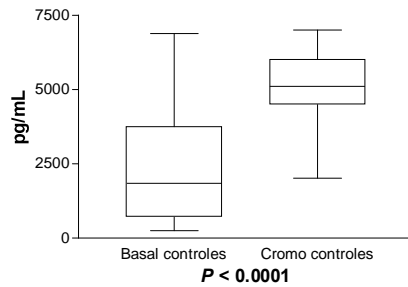


Fig 54. Índices de estimulação encontrados nas culturas dos casos e controles.

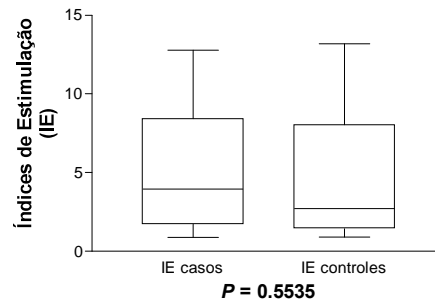
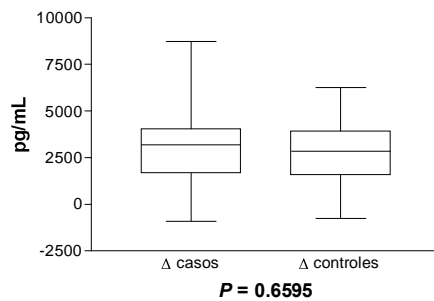


Fig 55. Diferença na detecção de RANTES entre as culturas estimuladas e basais dos grupos de caso e controle.



5.5 Testes de correlação

O índice de correlação entre as variáveis alergia e os índices de estimulação encontrados com o teste de proliferação convencional foi de 0,55 ($P = 0,0004$), tabela 11 nos anexos. A tabela 12 apresenta os índices de correlação encontrados entre alergia e os índices de estimulação obtidos com cada citocina testada. A tabela 13, disponível nos anexos, mostra que não houve correlação entre os resultados dos índices de estimulação obtidos com o TPL e com as diversas citocinas. Para todas as análises de correlação a variável alergia foi graduada pelo teste de contato em 0, 1, 2 e 3 que corresponderam a pacientes: sem alergia, alérgicos com uma cruz no TC, duas cruces e 3 cruces, respectivamente.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Apesar de existirem poucos estudos sobre o TPL em pacientes sensibilizados ao cromo está claro que esse teste, na sua forma convencional, não apresenta sensibilidade suficiente para substituir o TC.²⁴

Formas alternativas desse método, como o uso de CD no lugar dos monócitos ou a indução e a detecção da resposta por citocinas com o intuito de melhorar a sensibilidade, reabriram as portas para novas investigações. Os poucos estudos que seguiram esses protocolos alternativos apresentam diferenças consideráveis quanto a sua metodologia, dificultando a comparação dos resultados.²⁷⁻³² Mesmo assim, todos apresentaram algum resultado estimulando o refinamento desses protocolos através de novas pesquisas.

Dentre as diferenças encontradas nos métodos alternativos temos: a indução da resposta por mitógeno ou citocinas, períodos diferentes de cultura, poucas e diferentes citocinas testadas para detecção do resultado e, em um trabalho, ausência de grupo controle. Para sanar algumas dessas questões esse estudo foi realizado comparando a resposta do TPL convencional à detecção de nove citocinas nas culturas de 6 dias de 18 pacientes alérgicos ao cromo e 19 controles.

O IFN- γ foi escolhido por ser produzido pelos LTc1 e LTh1 antígeno-específicos, principais células efetoras da dermatite de contato alérgica.^{108,111} Essas células liberam IFN- γ que estimula outras células T, células NK e

macrófagos a ampliar o processo inflamatório e aumenta a expressão ICAM-1 e de Fas no queratinócitos tornando-os mais suscetíveis à citotoxicidade mediada por FasL.^{80,81,111,140,141}

A IL-2 é um fator de crescimento para as células T ativadas. Ela é produzida pelos próprios LT hapteno-específicos ativados e atua por ação autócrina levando a proliferação celular, processo esse conhecido como expansão clonal.⁶⁶⁻⁶⁸

A IL-4, produzida pela célula T NK invariante, é necessária para a ativação dos linfócitos B-1 e conseqüente produção da IgM antígeno-específica. A ausência de IL-4 diminui a resposta do contato em camundongos “*knock-out*” para o gene dessa interleucina.^{46,160}

A IL-5 é produzida em moderada quantidade pelas células T reguladoras antígeno-específicas.⁷⁰ A IL-5 também é necessária para a manutenção da produção da IgM. Camundongos com “*knock-out*” do gene da IL-5 apresentam diminuição da resposta de contato.⁴⁵

A IL-10 foi escolhida por ser produzida em grande quantidade pelas células T reguladoras para suprimir a resposta de contato.⁷⁰

A IL-12 é expressa pelas CD após a maturação completa das mesmas e é necessária para diferenciação e maturação dos LT hapteno-específicos em células efetoras e de memória.¹¹²

Minang *et al.* demonstraram que os metais levam a produção de citocinas padrão tanto Th1, como o INF- γ e a IL-2, quanto Th2, como a IL-4 e IL-13, nas culturas dos pacientes alérgicos. A IL-13 foi a citocina que apresentou a melhor resposta em seus ensaios com o cromo, sugerindo

uma melhor avaliação quanto ao seu papel no diagnóstico de alergia a esse metal.

A IL-17, produzida pelos LTh17 estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias, modula a liberação de quimiocinas e aumenta a expressão de ICAM-1 nos queratinócitos, o que favorece a interação com os linfócitos.¹¹⁵⁻¹¹⁷

A quimiocina RANTES, também chamada de CCL5, é produzida pelo endotélio, plaquetas e células T. Ela atrai monócitos, CD, basófilos, eosinófilos, células NK e células T e está envolvida na ativação dos LT.⁶⁶

Com relação ao TPL convencional, a resposta ao “*pokeweed*” foi adequada e de igual intensidade nos casos e controles; confirmando que as condições de cultura foram adequadas e que casos e controles respondem de forma semelhante a um estímulo aos quais ambos são sensíveis (figuras 5 a 7).

Como esperado, apenas os linfócitos do grupo de pacientes alérgicos foram estimulados com o cromo (figuras 8 e 9). A diferença encontrada na resposta entre os grupos levou a diferença nos IE encontrados entre os grupos (figura 10).

Considerando um IE superior a 3 como critério de positividade, a resposta ao teste foi encontrada em apenas 6 dos 18 casos e nenhum controle, o que corresponde a uma sensibilidade de 33% e especificidade de 100% (tabela 1, nos anexos). Esse valor de corte foi determinado como o ideal para distinguir casos de controles em um estudo prévio feito pelos mesmos autores seguindo as mesmas condições de cultura.²⁴

A sensibilidade aquém do desejado é uma característica própria desse teste, quando realizado para detectar alergia ao cromo.²⁴ Todavia, a sensibilidade ficou abaixo do encontrado no nosso estudo prévio (60%) e em outro estudo de mesma autoria, cujos dados não foram publicados, entre 19 casos e 14 controles onde a sensibilidade foi de 53%.²⁴

Já a especificidade do teste se mostrou excelente, como no nosso estudo prévio (95%) e superior àquela encontrada no estudo não publicado, que foi de 79%.²⁴ Como os critérios de seleção foram os mesmos, as culturas foram realizadas seguindo a mesma metodologia e preparadas pela mesma pessoa em todos os casos, essas diferenças devem se dever ao acaso.

O índice de correlação de Spearman mostrou existir correlação moderada entre as variáveis alergia e índice de estimulação obtido pelo TPL convencional, como visto no estudo de Lindemann *et al.*³²

O estímulo com cromo induziu a produção de INF- γ , IL-5 e IL-13 apenas no grupo de casos (figuras 12, 13, 27, 28, 42 e 43), determinando diferença nos IE e Δ entre casos e controles (figuras 14, 15, 29, 30, 44 e 45).

A sensibilidade e especificidade obtidas com a detecção de IFN- γ nesse trabalho foram semelhantes as encontradas nos estudos de Trattner *et al.*²⁸ (73,7% e 71,4%) e Moed *et al.*²⁹ (57% e 86%). Esses pesquisadores adicionaram fitohemaglutinina e citocinas a fim de melhorar a sensibilidade do teste. Como os resultados foram semelhantes novos estudos serão necessários para justificar o uso desses métodos, ao menos para a detecção de IFN γ nas culturas estimuladas com cromo. No entanto, duas ressalvas

devem ser feitas: o número de casos estudados por Moed *et al.*²⁹ foi muito pequeno e o período de incubação de Trattner *et al.*²⁸ foi sensivelmente mais curto. Para uma melhor comparação com o trabalho de Trattner *et al.*²⁸ um novo estudo com um período de incubação mais curto é necessário. Ackerman *et al.*³⁰ e Lindemann *et al.*³² também encontraram aumento na produção de IFN- γ nos pacientes alérgicos, mas não calcularam a sensibilidade e especificidade do método. Apenas Minang *et al.*³¹ não detectaram diferença na produção dessa citocina entre casos e controles, talvez pela baixa casuística.

A acurácia obtida com a detecção de IFN- γ não permite a substituição rotineira do TC por esse teste. Mas, a dosagem de IFN- γ pode ser útil como alternativa, quando o TC não puder ser feito ou como exame complementar.

O teste de correlação de Spearman mostrou existir correlação moderada entre alergia e a resposta do INF- γ nas culturas, tabela 12 nos anexos.

Ackerman *et al.*,³⁰ demonstraram que as culturas de pacientes alérgicos a cromo produzem IL-5 quando estimuladas com esse metal. Também encontramos aumento da IL-5 e determinamos que esse aumento é específico pois não foi visto no grupo controle (figuras 27 e 28). Todavia, a sensibilidade e especificidade encontradas ficaram aquém do desejado restringindo o uso isolado da IL-5 como método diagnóstico de alergia ao cromo. Moed *et al.*,²⁹ conseguiram índices de sensibilidade e especificidade melhores, 100% e 86% respectivamente. É possível que o estímulo com

citocinas tenha induzido uma melhora nos resultados, mas a casuística é muito baixa podendo esse efeito se dever ao acaso. Assim como com o IFN- γ , houve correlação moderada entre alergia e os níveis de IL-5 no sobrenadante das culturas, $r = 0,49$ ($P = 0,0019$).

O desempenho do teste com a IL-13 nesse trabalho foi surpreendente. Como visto por Minang *et al.*³¹ esta citocina está aumentada nos pacientes alérgicos ao cromo e para esses autores, também foi a que apresentou os melhores resultados. Apenas dois pacientes não responderam ao teste usando o IE sendo que um deles também não respondeu ao índice Δ . Os dois pacientes tiveram resposta de duas cruces no TC. No estudo de Minang *et al.*,³¹ os 3 pacientes que apresentaram eritema e edema sem a formação de pápulas no TC - resultado positivo fraco para os autores e duvidoso segundo a nossa interpretação - não responderam ao teste. Acreditamos que a sensibilidade do teste ficou aquém da sua possibilidade pela inclusão de casos duvidosos nesse estudo. A detecção de IL-13 também parece promissora como método diagnóstico em outros antígenos^{174,175}

Considerando que até uma em duas reações positivas no TC para o bicromato de potássio testado a 0,5% são falso-positivas, podemos afirmar que a especificidade do resultado encontrado com a IL-13 é superior a do TC.¹⁷⁰ A redução dessa concentração para 0,25% pode corrigir esse problema com o TC, mas leva a uma perda na sensibilidade.^{12,32,38} Dessa forma, a detecção de IL-13 pode ser considerada adequada para substituir o

TC no diagnóstico de DCA por cromo. O teste de Spearman mostrou forte correlação entre alergia e a detecção de IL-13, $r = 0,82$ e $P < 0.0001$.

Não houve diferença estatística na produção de IL-2 entre as culturas basais e estimuladas tanto de casos quanto controles (figuras 16 a 18). Apesar disso foi encontrado diferença nos IE, mas não no Δ , de casos e controles (figuras 19 e 20). Isso pode ser explicado pelo aumento da média e da mediana visto nas culturas estimuladas, em relação às culturas basais, dos casos aliado a diminuição da média e mediana das culturas estimuladas dos controles em relação as basais (tabela 3, no anexo). Essas mudanças na produção de IL-2 não foram detectadas na comparação entre as culturas basais com as culturas estimuladas dos dois grupos. No entanto, o discreto aumento nas culturas estimuladas de casos levou a um aumento equivalente nos IE desse grupo e a discreta diminuição vista nas culturas estimuladas dos controles diminuiu os IE dos controles gerando a diferença estatística encontrada entre os IE dos grupos.

Ackerman *et al.*³⁰ encontraram aumento na produção de IL-2 nas culturas dos casos quando estimulados com bicromato de potássio. Minang *et al.*³¹ também encontraram aumento da IL-2 com ELISpot mas não com ELISA. Já Lindemann *et al.*,³² utilizando ELISpot, não observaram aumento na produção de IL-2. Apesar de não detectado nesse estudo é possível e lógico que ocorra um aumento na produção de IL-2, mas esse aumento, se existir, é insuficiente para separa casos de controles, pelo menos nas culturas de 6 dias.

A acurácia do teste com o IE não encoraja o seu uso no lugar do TC para o diagnóstico de alergia ao cromo, especialmente devido a sua baixa sensibilidade (61%). No estudo de Minang *et al.*³¹ a sensibilidade também foi um problema, apenas 2 dos 9 pacientes - seis se excluirmos os 3 pacientes com apenas eritema e edema no TC - responderam com aumento da IL-2. Como não houve diferença entre os Δ de casos e controles a sensibilidade e a especificidade para esse índice não foram calculadas. Foi encontrada correlação moderada entre alergia e os níveis de IL-2 produzidos nas culturas, $r = 0,34$ e $P = 0,0410$.

Os casos e controles apresentaram diferença na produção basal de IL-4, o que impede qualquer comparação entre os grupos (figura 21). O motivo dessa diferença não está claro. No estudo de Ackerman *et al.*³⁰ o cromo induziu a produção de IL-4 nos pacientes alérgicos, o que não foi encontrado nesse estudo. Percebemos aumento da IL-4 no grupo controle, mas não nos casos (figuras 22 e 23). Lindemann *et al.*³² e Minang *et al.*³¹ não encontraram diferença na produção de IL-4 entre pacientes alérgicos e não alérgicos.

Segundo nossos achados, poderíamos imaginar que a IL-4 apresenta um efeito supressor na DCA pelo cromo, efeito esse que não está presente nos indivíduos alérgicos ou que ela seja produzida como resposta a outro fator gerado pela presença do cromo na cultura. Os outros estudos apresentaram resultados diferentes, mas o período de cultura desses trabalhos foram mais curtos, variando de 20 a 48 horas, a exceção do estudo de Ackerman *et al.*,³⁰ no qual tal informação não está disponível. A

dinâmica das citocinas nessas culturas dificulta a comparação entre os resultados.¹⁷⁵

O estímulo com cromo determinou uma redução na produção de IL-10 nos dois grupos (figura 32 e 33). A redução de IL-10 ocorreu nos dois grupos fazendo com que não exista diferença nos critérios diagnósticos entre eles (figuras 34 e 35). Lindemann *et al.*³² não encontraram diferença na produção de IL-10 entre pacientes alérgicos e não alérgicos, já Ackerman *et al.*,³⁰ encontraram aumento. Possivelmente essas diferenças se devem aos períodos de cultura empregados ou a diferença nas concentrações e na forma do cromo utilizada. Nesse estudo a concentração de cromo usada foi superior aos dos demais estudos o que pode ter gerado dano celular e esse sinal de perigo suprimido a ação das células reguladoras, diminuindo assim a liberação de IL-10.

Não houve diferença estatística na produção de IL-12 entre as culturas basais e estimuladas tanto de casos quanto controles (figuras 36 a 38). Lindemann *et al.*³² também não encontraram diferença na produção de IL-12 entre pacientes alérgicos e não alérgicos. Todavia, Ackerman *et al.*,³⁰ detectaram aumento na produção de IL-12 em suas culturas.

Apesar de não termos observado aumento na produção de IL-12 nos casos foi encontrado diferença nos índices de estimulação e no delta de casos e controles (figuras 39 e 40). De forma semelhante ao discutido com a IL-2, isso se deve ao aumento da média e da mediana encontradas nas culturas estimuladas, em relação às culturas basais, dos casos aliado a diminuição da média e mediana das culturas estimuladas dos controles em

relação as basais (tabela 7, no anexo). As oscilações opostas dos índices diagnósticos tornaram esses valores estatisticamente diferentes. A acurácia do teste encontrada tanto com o IE quanto com o Δ não foi adequada para que ele substitua o TC, mas pode ser usado como alternativa.

Não houve diferença na produção de IL-17 entre as culturas basais e estimuladas de casos e controles (figuras 46 a 48) nem nos valores obtidos com os critérios diagnósticos (figuras 49 e 50). Isso não descarta um possível papel dessas citocinas no diagnóstico da DCA por cromo, o que deve ser melhor investigado em outros períodos de cultura.

Tanto os linfócitos de casos quanto controles foram estimulados a produzir RANTES quando cultivados com cromo (figuras 52 e 53). A resposta foi de magnitude semelhante, inexistindo diferença nos índices diagnósticos dos grupos.

Não houve correlação entre os IE encontrados com o TPL e com as citocinas, pelas imperfeições somadas de cada teste.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

A IL-13 apresenta adequada sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de DCA pelo cromo. Caso outros estudos comprovem esses achados esse método poderá substituir o TC para esse diagnóstico.

A detecção de IFN- γ , IL-5 e IL-12 tanto pelo IE quanto pelo Δ e de IL-2 pelo IE no sobrenadante de culturas de pacientes alérgicos ao cromo são alternativas ao TC. Podem ser usados quando o TC está contra-indicado ou para complementar a investigação em casos específicos, mas a acurácia desses exames não é superior a do TPL convencional.

As citocinas IL-4, IL10, IL-17 e RANTES não são adequadas para distinguir casos de controles nas condições em que foram testadas.

O papel dessas citocinas e de outras, não avaliadas nesse estudo, no diagnóstico de DCA para o cromo deve ser melhor investigado com outros períodos de cultura e com e sem estímulo adicional, para otimizar a capacidade desse teste.

ANEXOS

8 ANEXOS

Quadro 2 – Grupo de substâncias testadas na bateria padrão brasileira de dermatite de contato.

| | | | |
|----|--------------------------|----|---------------------|
| 1 | Antraquinona | 16 | Neomicina |
| 2 | Bálsamo-do-peru | 17 | Nitrofurazona |
| 3 | Benzocaína | 18 | Parabeno-mix |
| 4 | Bicromato de potássio | 19 | Parafenilenodiamina |
| 5 | Butilfenol-paraterciário | 20 | Perfume-mix |
| 6 | Carba-mix | 21 | PPD-mix |
| 7 | Cloreto de cobalto | 22 | Prometazina |
| 8 | Colofônio | 23 | Propilenoglicol |
| 9 | Etilenodiamina | 24 | Quartenium 15 |
| 10 | Formaldeído | 25 | Quinolina-mix |
| 11 | Hidroquinona | 26 | Resina-epóxi |
| 12 | Irgasan | 27 | Sulfato de níquel |
| 13 | Kathon CG | 28 | Terebintina |
| 14 | Lanolina | 29 | Timerosal |
| 15 | Mercapto-mix | 30 | Tiuram-mix |

FONTE: Grupo brasileiro de estudo em dermatite de contato (GBEDC). Estudo multicêntrico para a elaboração de uma bateria-padrão brasileira de teste de contato. *An Bras Dermatol.* 2000; 75:147-56.⁹

Quadro 3 – Grupo de substâncias testadas na bateria de cosméticos.

| | |
|----|--|
| 1 | Germall 115 (Imidazolidiniluréia) |
| 2 | BHT (Butil hidroxi-tolueno) |
| 3 | Resina tonsilamida/formaldeído |
| 4 | Trietanolamina |
| 5 | Bronopol (Bromo-2-nitropropano-1,3-diol 2) |
| 6 | Cloracetamida |
| 7 | Ácido Sórbico |
| 8 | Tioglicolato de amônio |
| 9 | Amerchol L-101 |
| 10 | Clorhexidine |

FONTE: Bateria padrão da IPI-ASAC Brasil[®], Rio de Janeiro, Brasil. Em: http://www.ipibrasil.com.br/v2/pages/parcerias_endoderme_contatoCosmeticos.asp?catProdAtual=1.

Quadro 4 - Resultados dos testes de contato

| Casos | Teste de contato | Controles | Teste de contato |
|--------------|-------------------------|------------------|-------------------------|
| 1 | 4 (++) , 6, 27 e 30 | 1 | Negativo |
| 2 | 4 (++) e 6 | 2 | Negativo |
| 3 | 4 (++) , 6 e 30 | 3 | Negativo |
| 4 | 4 (++) , 6 e 7 | 4 | Negativo |
| 5 | 4 (++) e 6 | 5 | 8, 20 e 30 |
| 6 | 4 (++) e 25 | 6 | 27 e 10c |
| 7 | 4 (++) , 6 e 30 | 7 | 20, 27 e 8c |
| 8 | 4 (++) e 27 | 8 | 27 e esmalte |
| 9 | 4 (++) | 9 | 9 e 16 |
| 10 | 4 (+++), 7, 17 e 30 | 10 | 8 e 10 |
| 11 | 4 (+) e 6 | 11 | Negativo |
| 12 | 4 (+++) e 27 | 12 | 27 |
| 13 | 4 (++) | 13 | 17 e 29 |
| 14 | 4 (+++), 7, 27 e 30 | 14 | 3 |
| 15 | 4 (++) | 15 | 16 |
| 16 | 4 (+++), 10 e 27 | 16 | 7, 22 e 27 |
| 17 | 4 (++) e 6 | 17 | Negativo |
| 18 | 4 (++) e 21 | 18 | Negativo |
| | | 19 | 7 |

FONTE: Dermatologia do HC-FMUSP

NOTA: Os números apresentados nas colunas dos testes de contato correspondem aos utilizados pelas baterias de teste de contato padrão e de cosméticos e estão disponíveis no anexo, quadros 2 e 3. Quando os números forem seguidos da letra “c” indica que pertencem a bateria de cosméticos.

A intensidade da reação ao bicromato de potássio nas 96 horas foi descrita como (+) – positivo fraco; (++) – positivo forte; (+++) – positivo muito forte (+++).

Tabela 1 – Valores médios das contagens por minuto das triplicatas dos casos e controles.

| | Basal | | PWM | | Cromo | | IE PWM | | IE Cromo | | IE Cromo | |
|---------|--------|-----------|-------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|
| | casos | Controles | casos | controles | casos | controles | casos | controles | casos | controles | casos | controles |
| 1 | 189 | 160 | 1182 | 1423 | 422 | 139 | 6.25 | 8.89 | 2.23 | 0.86 | | |
| 2 | 188 | 205 | 1698 | 2170 | 333 | 150 | 9.03 | 10.59 | 1.77 | 0.73 | | |
| 3 | 84 | 97 | 1638 | 1260 | 389 | 239 | 19.50 | 12.99 | 4.63 | 2.46 | | |
| 4 | 295 | 125 | 1152 | 1239 | 317 | 194 | 3.91 | 9.91 | 1.08 | 1.55 | | |
| 5 | 375 | 502 | 1409 | 1053 | 424 | 520 | 3.76 | 2.10 | 1.13 | 1.04 | | |
| 6 | 257 | 316 | 2319 | 3494 | 329 | 387 | 9.02 | 11.06 | 1.28 | 1.24 | | |
| 7 | 308 | 193 | 2655 | 2361 | 343 | 273 | 8.62 | 12.23 | 1.11 | 1.41 | | |
| 8 | 133 | 380 | 961 | 5160 | 551 | 620 | 7.23 | 13.58 | 4.15 | 1.63 | | |
| 9 | 136 | 597 | 1120 | 1750 | 410 | 669 | 8.24 | 2.93 | 3.02 | 1.12 | | |
| 10 | 155 | 331 | 735 | 2192 | 254 | 350 | 4.74 | 6.62 | 1.64 | 1.06 | | |
| 11 | 194 | 618 | 2315 | 2890 | 244 | 608 | 11.93 | 4.68 | 1.26 | 0.98 | | |
| 12 | 166 | 224 | 2152 | 2403 | 525 | 340 | 12.96 | 10.73 | 3.16 | 1.52 | | |
| 13 | 117 | 250 | 2239 | 5857 | 464 | 463 | 19.14 | 23.43 | 3.97 | 1.86 | | |
| 14 | 343 | 288 | 1425 | 3828 | 518 | 291 | 4.15 | 13.29 | 1.51 | 1.01 | | |
| 15 | 234 | 184 | 1848 | 5154 | 488 | 284 | 7.90 | 28.01 | 2.09 | 1.54 | | |
| 16 | 74 | 322 | 1496 | 7191 | 257 | 357 | 20.22 | 22.33 | 3.47 | 1.11 | | |
| 17 | 256 | 1042 | 2016 | 8753 | 443 | 1047 | 7.88 | 8.40 | 1.73 | 1.00 | | |
| 18 | 486 | 444 | 3208 | 2112 | 643 | 458 | 6.60 | 4.76 | 1.32 | 1.03 | | |
| 19 | | 499 | | 5878 | | 599 | | 11.78 | | 1.20 | | |
| Média | 221.70 | 356.7 | 1754 | 3483 | 408.60 | 420.40 | 9.50 | 11.49 | 2.25 | 1.28 | | |
| Mediana | 191.50 | 316.0 | 1668 | 2403 | 416.00 | 357.00 | 8.07 | 10.73 | 1.75 | 1.12 | | |

PWM = pokeweed.

IE = índice de estimulação.

Tabela 2 – Detecção de IFN-gama em pg/mL nas culturas dos casos e controles.

| | Basal casos | Basal controles | Cromo casos | Cromo controles | IE casos | IE controles | Δ casos | Δ controles |
|---------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|----------|--------------|----------------|--------------------|
| 1 | 5.43 | 7.91 | 300.24 | 276.93 | 55.29 | 35.01 | 294.81 | 269,02 |
| 2 | 5.14 | 0.15 | 68.34 | 5.71 | 13.30 | 38.07 | 63.20 | 5,56 |
| 3 | 0.10 | 0.73 | 0.10 | 10.76 | 1.00 | 14.74 | 0.00 | 10,03 |
| 4 | 3.51 | 0.73 | 149.88 | 23.59 | 42.70 | 32.32 | 146.37 | 22,86 |
| 5 | 333.55 | 9.33 | 7218.19 | 19.22 | 21.64 | 2.06 | 6884.64 | 9,89 |
| 6 | 4.28 | 73.94 | 14.85 | 19.70 | 3.47 | 0.27 | 10.57 | -54,24 |
| 7 | 336.89 | 102.23 | 2925.33 | 94.25 | 8.68 | 0.92 | 2588.44 | -7,98 |
| 8 | 3.51 | 8.95 | 181.00 | 27.38 | 51.57 | 3.06 | 177.49 | 18,43 |
| 9 | 25.30 | 429.09 | 468.23 | 33.07 | 18.51 | 0.08 | 442.93 | -396,02 |
| 10 | 61.70 | 22.07 | 397.49 | 21.50 | 6.44 | 0.97 | 335.79 | -0,57 |
| 11 | 1.88 | 169.88 | 31.18 | 96.06 | 16.59 | 0.57 | 29.30 | -73,82 |
| 12 | 7.05 | 2.46 | 717.60 | 10.19 | 101.79 | 4.14 | 710.55 | 7,73 |
| 13 | 0.54 | 0.73 | 229.32 | 12.95 | 424.67 | 17.74 | 228.78 | 12,22 |
| 14 | 30.80 | 100.24 | 293.89 | 469.34 | 9.54 | 4.68 | 263.09 | 369,10 |
| 15 | 4.95 | 30.51 | 62.46 | 169.11 | 12.62 | 5.54 | 57.51 | 138,60 |
| 16 | 0.54 | 29.47 | 58.29 | 677.27 | 107.94 | 22.98 | 57.75 | 647,80 |
| 17 | 2.84 | 41.80 | 29.47 | 1422.88 | 10.38 | 34.04 | 26.63 | 1381,08 |
| 18 | 4.57 | 177.45 | 18.65 | 703.73 | 4.08 | 3.97 | 14.08 | 526,28 |
| 19 | | 22.83 | | 26.25 | | 1.15 | | 3,42 |
| Média | 46,25 | 64,76 | 731,4 | 216,8 | 50,57 | 11,70 | 685,1 | 152,1 |
| Mediana | 4,760 | 22,83 | 165,4 | 27,38 | 14,95 | 4,140 | 161,9 | 10,03 |

IE = índice de estimulação.

Δ = diferença entre as culturas estimulada e não estimuladas.

Tabela 3 – Detecção de IL-2 em pg/mL nas culturas dos casos e controles.

| | Basal casos | | Basal controles | | Cromo casos | | Cromo controles | | IE | | IE | | Δ | |
|---------|-------------|-----------|-----------------|-----------|-------------|-----------|-----------------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|----------------|--------------------|
| | casos | controles | casos | controles | casos | controles | casos | controles | casos | controles | casos | controles | Δ casos | Δ controles |
| 1 | 0,94 | 11,00 | 1,72 | 0,30 | 1,83 | 0,03 | 0,78 | -10,70 | | | | | | |
| 2 | 0,30 | 0,30 | 0,42 | 0,30 | 1,40 | 1,00 | 0,12 | 0,00 | | | | | | |
| 3 | 0,30 | 0,30 | 0,30 | 0,30 | 1,00 | 1,00 | 0,00 | 0,00 | | | | | | |
| 4 | 0,30 | 0,30 | 3,83 | 0,30 | 12,77 | 1,00 | 3,53 | 0,00 | | | | | | |
| 5 | 0,60 | 4,79 | 3,83 | 3,35 | 6,38 | 0,70 | 3,23 | -1,44 | | | | | | |
| 6 | 4,84 | 1,38 | 1,72 | 0,30 | 0,36 | 0,22 | -3,12 | -1,08 | | | | | | |
| 7 | 0,30 | 0,42 | 5,27 | 0,30 | 17,57 | 0,71 | 4,97 | -0,12 | | | | | | |
| 8 | 0,71 | 0,30 | 3,19 | 9,14 | 4,49 | 30,47 | 2,48 | 8,84 | | | | | | |
| 9 | 2,05 | 9,76 | 8,41 | 1,27 | 4,10 | 0,13 | 6,36 | -8,49 | | | | | | |
| 10 | 0,30 | 4,84 | 0,37 | 0,30 | 1,23 | 0,06 | 0,07 | -4,54 | | | | | | |
| 11 | 0,30 | 0,60 | 0,48 | 1,50 | 1,60 | 2,50 | 0,18 | 0,90 | | | | | | |
| 12 | 0,71 | 0,30 | 2,27 | 0,30 | 3,20 | 1,00 | 1,56 | 0,00 | | | | | | |
| 13 | 1,27 | 4,36 | 1,05 | 0,82 | 0,83 | 0,19 | -0,22 | -3,54 | | | | | | |
| 14 | 6,43 | 0,71 | 3,13 | 0,82 | 0,49 | 1,15 | -3,30 | 0,11 | | | | | | |
| 15 | 3,24 | 0,30 | 1,05 | 0,30 | 0,32 | 1,00 | -2,19 | 0,00 | | | | | | |
| 16 | 0,82 | 0,48 | 18,04 | 3,67 | 22,00 | 7,65 | 17,22 | 3,19 | | | | | | |
| 17 | 4,31 | 2,05 | 0,30 | 0,30 | 0,07 | 0,15 | -4,01 | -1,75 | | | | | | |
| 18 | 0,82 | 1,83 | 0,30 | 0,30 | 0,37 | 0,16 | -0,52 | -1,53 | | | | | | |
| 19 | | 0,30 | | 0,30 | | 1,00 | | 0,00 | | | | | | |
| Média | 1,59 | 2,33 | 3,09 | 1,27 | 4,44 | 2,64 | 1,51 | -1,06 | | | | | | |
| Mediana | 0,76 | 0,60 | 1,72 | 0,30 | 1,50 | 1,00 | 0,15 | 0,00 | | | | | | |

IE = índice de estimulação.

Δ = diferença entre as culturas estimulada e não estimuladas.

Tabela 4 – Detecção de IL-4 em pg/mL nas culturas dos casos e controles.

| | Basal casos | Basal controles | Cromo casos | Cromo controles | IE casos | IE controles | Δ casos | Δ controles |
|---------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|----------|--------------|----------------|--------------------|
| 1 | 68.68 | 92.89 | 83.01 | 83.01 | 1.21 | 0.89 | 14.33 | -9.88 |
| 2 | 61.76 | 49.28 | 59.12 | 58.24 | 0.96 | 1.18 | -2.64 | 8.96 |
| 3 | 87.97 | 52.00 | 85.50 | 70.39 | 0.97 | 1.35 | -2.47 | 18.39 |
| 4 | 60.88 | 83.01 | 67.82 | 84.67 | 1.11 | 1.02 | 6.94 | 1.66 |
| 5 | 62.63 | 46.53 | 76.32 | 39.98 | 1.22 | 0.86 | 13.69 | -6.55 |
| 6 | 60.44 | 88.80 | 43.75 | 103.40 | 0.72 | 1.16 | -16.69 | 14.60 |
| 7 | 63.50 | 87.15 | 77.17 | 87.15 | 1.22 | 1.00 | 13.67 | 0.00 |
| 8 | 69.53 | 49.28 | 72.09 | 63.50 | 1.04 | 1.29 | 2.56 | 14.22 |
| 9 | 92.89 | 52.90 | 81.35 | 57.36 | 0.88 | 1.08 | -11.54 | 4.46 |
| 10 | 75.06 | 50.19 | 84.67 | 62.63 | 1.13 | 1.25 | 9.61 | 12.44 |
| 11 | 82.18 | 52.90 | 75.48 | 58.24 | 0.92 | 1.10 | -6.70 | 5.34 |
| 12 | 43.75 | 54.69 | 86.32 | 55.58 | 1.97 | 1.02 | 42.57 | 0.89 |
| 13 | 72.94 | 58.24 | 76.32 | 59.12 | 1.05 | 1.02 | 3.38 | 0.88 |
| 14 | 80.52 | 42.81 | 85.91 | 52.00 | 1.07 | 1.21 | 5.39 | 9.19 |
| 15 | 87.15 | 51.09 | 89.62 | 52.00 | 1.03 | 1.02 | 2.47 | 0.91 |
| 16 | 80.52 | 54.69 | 83.01 | 57.36 | 1.03 | 1.05 | 2.49 | 2.67 |
| 17 | 79.68 | 43.75 | 87.15 | 56.91 | 1.09 | 1.30 | 7.47 | 13.16 |
| 18 | 34.20 | 33.21 | 50.19 | 54.69 | 1.47 | 1.65 | 15.99 | 21.48 |
| 19 | | 50.19 | | 53.79 | | 1.07 | | 3.60 |
| Média | 70,24 | 57,56 | 75,82 | 63,69 | 1,12 | 1,13 | 5,58 | 6,13 |
| Mediana | 71,24 | 52,00 | 79,26 | 58,24 | 1,06 | 1,08 | 4,39 | 4,46 |

IE = índice de estimulação.

Δ = diferença entre as culturas estimulada e não estimuladas.

Tabela 5 – Detecção de IL-5 em pg/mL nas culturas dos casos e controles.

| | Basal casos | Basal controles | Cromo casos | Cromo controles | IE casos | IE controles | Δ casos | Δ controles |
|---------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|----------|--------------|----------------|--------------------|
| 1 | 0.19 | 0.10 | 1.89 | 0.10 | 9.95 | 1.00 | 1.70 | 0.00 |
| 2 | 0.35 | 1.96 | 0.69 | 3.90 | 1.97 | 1.99 | 0.34 | 1.94 |
| 3 | 0.11 | 0.10 | 0.95 | 0.27 | 8.64 | 2.70 | 0.84 | 0.17 |
| 4 | 0.15 | 0.10 | 0.35 | 0.11 | 2.33 | 1.10 | 0.20 | 0.01 |
| 5 | 0.11 | 13.44 | 9.32 | 5.86 | 84.73 | 0.44 | 9.21 | -7.58 |
| 6 | 0.10 | 0.11 | 0.27 | 0.31 | 2.70 | 2.82 | 0.17 | 0.20 |
| 7 | 0.10 | 0.15 | 0.23 | 0.10 | 2.30 | 0.67 | 0.13 | -0.05 |
| 8 | 0.10 | 0.19 | 0.38 | 0.23 | 3.80 | 1.21 | 0.28 | 0.04 |
| 9 | 0.10 | 0.89 | 0.10 | 1.28 | 1.00 | 1.44 | 0.00 | 0.39 |
| 10 | 0.10 | 0.27 | 0.21 | 0.11 | 2.10 | 0.41 | 0.11 | -0.16 |
| 11 | 0.10 | 0.23 | 0.31 | 0.38 | 3.10 | 1.65 | 0.21 | 0.15 |
| 12 | 0.19 | 0.15 | 0.42 | 0.35 | 2.21 | 2.33 | 0.23 | 0.20 |
| 13 | 0.10 | 1.24 | 0.33 | 0.10 | 3.30 | 0.08 | 0.23 | -1.14 |
| 14 | 0.19 | 0.10 | 0.76 | 0.23 | 4.00 | 2.30 | 0.57 | 0.13 |
| 15 | 0.10 | 0.11 | 0.10 | 0.15 | 1.00 | 1.36 | 0.00 | 0.04 |
| 16 | 0.10 | 0.11 | 2.89 | 0.15 | 28.90 | 1.36 | 2.79 | 0.04 |
| 17 | 1.30 | 1.13 | 0.33 | 0.15 | 0.25 | 0.13 | -0.97 | -0.98 |
| 18 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.10 | 1.00 | 0.91 | 0.00 | -0.01 |
| 19 | | 0.19 | | 0.19 | | 1.00 | | 0.00 |
| Média | 0,20 | 1,09 | 1,09 | 0,74 | 9,07 | 1,31 | 0,89 | -0,35 |
| Mediana | 0,11 | 0,15 | 0,34 | 0,19 | 2,52 | 1,21 | 0,22 | 0,04 |

IE = índice de estimulação.

Δ = diferença entre as culturas estimulada e não estimuladas.

Tabela 6 – Detecção de IL-10 em pg/mL nas culturas dos casos e controles.

| | Basal casos | Basal controles | Cromo casos | Cromo controles | IE casos | IE controles | Δ casos | Δ controles |
|---------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|----------|--------------|----------------|--------------------|
| 1 | 951.29 | 2766.9 | 51,11 | 53.86 | 0.05 | 0.02 | -900.18 | -2713.04 |
| 2 | 1113.02 | 1427.47 | 29,84 | 640.76 | 0.03 | 0.45 | -1083.18 | -786.71 |
| 3 | 182.76 | 228.85 | 53,17 | 215.88 | 0.29 | 0.94 | -129.59 | -12.97 |
| 4 | 1944.73 | 489.65 | 280,73 | 252.74 | 0.14 | 0.52 | -1664 | -236.91 |
| 5 | 964.03 | 1374.51 | 148,95 | 642.81 | 0.15 | 0.47 | -815.08 | -731.7 |
| 6 | 960.58 | 1525.96 | 297,45 | 131.52 | 0.31 | 0.09 | -663.13 | -1394.44 |
| 7 | 944.06 | 761.33 | 122,29 | 108.62 | 0.13 | 0.14 | -821.77 | -652.71 |
| 8 | 805.24 | 842.65 | 513,91 | 659.93 | 0.64 | 0.78 | -291.33 | -182.72 |
| 9 | 578.51 | 908.63 | 215,88 | 468.47 | 0.37 | 0.52 | -362.63 | -440.16 |
| 10 | 1547.66 | 404.28 | 106,57 | 290.28 | 0.07 | 0.72 | -1441.09 | -114 |
| 11 | 338.06 | 2589.05 | 87,41 | 643.5 | 0.26 | 0.25 | -250.65 | -1945.55 |
| 12 | 696.91 | 2072.27 | 98,36 | 559.36 | 0.14 | 0.27 | -598.55 | -1512.91 |
| 13 | 1205.74 | 594.24 | 150,31 | 573.38 | 0.12 | 0.96 | -1055.43 | -20.86 |
| 14 | 774.71 | 1745.8 | 348,98 | 366.73 | 0.45 | 0.21 | -425.73 | -1379.07 |
| 15 | 903.13 | 488.97 | 199,49 | 273.56 | 0.22 | 0.56 | -703.64 | -215.41 |
| 16 | 827.55 | 680.47 | 341,48 | 168.08 | 0.41 | 0.25 | -486.07 | -512.39 |
| 17 | 653.08 | 296.09 | 109,99 | 38.77 | 0.17 | 0.13 | -543.09 | -257.32 |
| 18 | 288.92 | 2491.6 | 227,48 | 129.81 | 0.79 | 0.05 | -61.44 | -2361.79 |
| 19 | | 480.09 | | 97.67 | | 0.2 | | -382.42 |
| Média | 871,10 | 1167,00 | 188,00 | 332,40 | 0,26 | 0,40 | -683,10 | -834,40 |
| Mediana | 865,30 | 842,70 | 149,60 | 273,60 | 0,20 | 0,27 | -630,80 | -512,40 |

IE = índice de estimulação.

Δ = diferença entre as culturas estimulada e não estimuladas.

Tabela 7 – Detecção de IL-12(p70) em pg/mL nas culturas dos casos e controles.

| | Basal casos | | Basal controles | | Cromo casos | | Cromo controles | | IE | | IE | | Δ | |
|---------|-------------|-----------|-----------------|-----------|-------------|-----------|-----------------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|----------|-----------|
| | casos | controles | casos | controles | casos | controles | casos | controles | casos | controles | casos | controles | casos | controles |
| 1 | 3.62 | 5.65 | 4.46 | 11.38 | 1.23 | 2.01 | 0.84 | 5.73 | | | | | | |
| 2 | 0.88 | 1.31 | 4.12 | 0.71 | 4.68 | 0.54 | 3.24 | -0.60 | | | | | | |
| 3 | 0.40 | 0.40 | 0.40 | 0.40 | 1.00 | 1.00 | 0.00 | 0.00 | | | | | | |
| 4 | 3.02 | 0.88 | 4.46 | 1.57 | 1.48 | 1.78 | 1.44 | 0.69 | | | | | | |
| 5 | 3.02 | 0.53 | 8.34 | 0.71 | 2.76 | 1.34 | 5.32 | 0.18 | | | | | | |
| 6 | 1.40 | 1.74 | 1.74 | 2.43 | 1.24 | 1.40 | 0.34 | 0.69 | | | | | | |
| 7 | 6.24 | 10.45 | 17.44 | 2.77 | 2.79 | 0.27 | 11.20 | -7.68 | | | | | | |
| 8 | 4.04 | 0.53 | 8.51 | 0.40 | 2.11 | 0.75 | 4.47 | -0.13 | | | | | | |
| 9 | 1.57 | 29.65 | 5.31 | 1.91 | 3.38 | 0.06 | 3.74 | -27.74 | | | | | | |
| 10 | 9.19 | 3.62 | 9.10 | 1.49 | 0.99 | 0.41 | -0.09 | -2.13 | | | | | | |
| 11 | 0.40 | 5.39 | 0.40 | 2.60 | 1.00 | 0.48 | 0.00 | -2.79 | | | | | | |
| 12 | 0.40 | 0.62 | 0.71 | 0.40 | 1.78 | 0.65 | 0.31 | -0.22 | | | | | | |
| 13 | 0.40 | 0.71 | 2.34 | 0.40 | 5.85 | 0.56 | 1.94 | -0.31 | | | | | | |
| 14 | 0.71 | 6.32 | 0.40 | 6.41 | 0.56 | 1.01 | -0.31 | 0.09 | | | | | | |
| 15 | 1.14 | 3.02 | 1.23 | 1.74 | 1.08 | 0.58 | 0.09 | -1.28 | | | | | | |
| 16 | 0.53 | 2.94 | 0.40 | 3.28 | 0.75 | 1.12 | -0.13 | 0.34 | | | | | | |
| 17 | 0.88 | 3.28 | 2.68 | 10.70 | 3.05 | 3.26 | 1.80 | 7.42 | | | | | | |
| 18 | 0.40 | 5.14 | 0.88 | 3.11 | 2.20 | 0.61 | 0.48 | -2.03 | | | | | | |
| 19 | | 4.97 | | 1.31 | | 0.26 | | -3.66 | | | | | | |
| Média | 2,12 | 4,59 | 4,05 | 2,83 | 2,11 | 0,95 | 1,93 | -1,76 | | | | | | |
| Mediana | 1,01 | 3,02 | 2,51 | 1,74 | 1,63 | 0,65 | 0,66 | -0,22 | | | | | | |

IE = índice de estimulação.

Δ = diferença entre as culturas estimulada e não estimuladas.

Tabela 8 – Detecção de IL-13 em pg/mL nas culturas dos casos e controles.

| | Basal casos | Basal controles | Cromo casos | Cromo controles | IE casos | IE controles | Δ casos | Δ controles |
|---------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|----------|--------------|----------------|--------------------|
| 1 | 4.10 | 1.38 | 49.57 | 0.82 | 12.09 | 0.59 | 45.47 | -0.56 |
| 2 | 0.53 | 3.63 | 3.75 | 10.17 | 7.08 | 2.80 | 3.22 | 6.54 |
| 3 | 0.82 | 0.82 | 19.97 | 1.11 | 24.35 | 1.35 | 19.15 | 0.29 |
| 4 | 0.82 | 1.38 | 14.39 | 2.79 | 17.55 | 2.02 | 13.57 | 1.41 |
| 5 | 7.01 | 204.22 | 42.05 | 133.21 | 6.00 | 0.65 | 35.04 | -71.01 |
| 6 | 2.91 | 1.65 | 4.10 | 0.68 | 1.41 | 0.41 | 1.19 | -0.97 |
| 7 | 1.38 | 3.51 | 14.10 | 0.82 | 10.22 | 0.23 | 12.72 | -2.69 |
| 8 | 0.82 | 1.11 | 14.20 | 4.79 | 17.32 | 4.32 | 13.38 | 3.68 |
| 9 | 0.68 | 3.39 | 7.23 | 5.02 | 10.63 | 1.48 | 6.55 | 1.63 |
| 10 | 1.38 | 1.11 | 12.01 | 1.11 | 8.70 | 1.00 | 10.63 | 0.00 |
| 11 | 3.75 | 5.69 | 11.80 | 4.56 | 3.15 | 0.80 | 8.05 | -1.13 |
| 12 | 1.65 | 0.82 | 47.47 | 2.17 | 28.77 | 2.65 | 45.82 | 1.35 |
| 13 | 0.40 | 9.55 | 12.01 | 5.81 | 30.03 | 0.61 | 11.61 | -3.74 |
| 14 | 1.91 | 2.67 | 24.79 | 2.91 | 12.98 | 1.09 | 22.88 | 0.24 |
| 15 | 0.82 | 2.67 | 4.91 | 1.78 | 5.99 | 0.67 | 4.09 | -0.89 |
| 16 | 0.40 | 0.40 | 64.28 | 1.38 | 160.70 | 3.45 | 63.88 | 0.98 |
| 17 | 2.67 | 2.91 | 5.02 | 2.42 | 1.88 | 0.83 | 2.35 | -0.49 |
| 18 | 0.40 | 1.11 | 2.42 | 0.82 | 6.05 | 0.74 | 2.02 | -0.29 |
| 19 | | 2.54 | | 1.91 | | 0.75 | | -0.63 |
| Média | 1,80 | 13,19 | 19,67 | 9,70 | 20,27 | 1,39 | 17,87 | -3,49 |
| Mediana | 1,10 | 2,54 | 13,06 | 2,17 | 10,43 | 0,83 | 12,17 | -0,29 |

IE = índice de estimulação.

Δ = diferença entre as culturas estimulada e não estimuladas.

Tabela 9 – Detecção de IL-17 em pg/mL nas culturas dos casos e controles.

| | Basal casos | | Basal controles | | Cromo casos | | Cromo controles | | IE | | IE | | Δ | |
|---------|-------------|-----------|-----------------|-----------|-------------|-----------|-----------------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|----------|-----------|
| | casos | controles | casos | controles | casos | controles | casos | controles | casos | controles | casos | controles | casos | controles |
| 1 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.64 | 0.64 | 0.64 | 0.20 | 3.20 | 3.20 | 0.44 | 0.44 | 0.44 | 0.44 |
| 2 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 3 | 0.20 | 4.04 | 1.97 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 9.85 | 0.05 | 0.05 | 1.77 | 1.77 | -3.84 | -3.84 |
| 4 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 5 | 6.63 | 3.90 | 0.47 | 5.06 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.07 | 1.30 | 1.30 | -6.16 | -6.16 | 1.16 | 1.16 |
| 6 | 0.20 | 0.29 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 1.00 | 0.69 | 0.69 | 0.00 | 0.00 | -0.09 | -0.09 |
| 7 | 4.85 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.04 | 1.00 | 1.00 | -4.65 | -4.65 | 0.00 | 0.00 |
| 8 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 9 | 0.20 | 1.06 | 0.42 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 2.10 | 0.19 | 0.19 | 0.22 | 0.22 | -0.86 | -0.86 |
| 10 | 0.20 | 0.20 | 2.01 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 10.05 | 1.00 | 1.00 | 1.81 | 1.81 | 0.00 | 0.00 |
| 11 | 0.55 | 0.72 | 2.17 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 3.95 | 0.28 | 0.28 | 1.62 | 1.62 | -0.52 | -0.52 |
| 12 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 13 | 0.20 | 7.61 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 1.00 | 0.03 | 0.03 | 0.00 | 0.00 | -7.41 | -7.41 |
| 14 | 0.38 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.53 | 1.00 | 1.00 | -0.18 | -0.18 | 0.00 | 0.00 |
| 15 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 16 | 0.20 | 0.20 | 4.34 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 21.70 | 1.00 | 1.00 | 4.14 | 4.14 | 0.00 | 0.00 |
| 17 | 0.20 | 1.06 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 1.00 | 0.19 | 0.19 | 0.00 | 0.00 | -0.86 | -0.86 |
| 18 | 0.20 | 0.20 | 0.29 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 1.45 | 1.00 | 1.00 | 0.09 | 0.09 | 0.00 | 0.00 |
| 19 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| Média | 0,85 | 1,11 | 0,80 | 0,48 | 0,48 | 0,48 | 0,48 | 3,39 | 0,89 | 0,89 | -0,05 | -0,05 | -0,63 | -0,63 |
| Mediana | 0,20 | 0,20 | 0,20 | 0,20 | 0,20 | 0,20 | 0,20 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |

IE = índice de estimulação.

Δ = diferença entre as culturas estimulada e não estimuladas.

Tabela 10 – Detecção de RANTES em pg/mL nas culturas dos casos e controles.

| | Basal casos | Basal controles | Cromo casos | Cromo controles | IE casos | IE controles | Δ casos | Δ controles |
|---------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|----------------|--------------------|
| 1 | 3564.28 | 1839.87 | 7623.61 | 6991.08 | 2.14 | 3.80 | 4059.33 | 5151.21 |
| 2 | 4272.31 | 6887.49 | 5156.67 | 6123.41 | 1.21 | 0.89 | 884.36 | -764.08 |
| 3 | 5460.90 | 426.06 | 6897.14 | 4557.01 | 1.26 | 10.70 | 1436.24 | 4130.95 |
| 4 | 7305.59 | 1671.81 | 6392.32 | 4514.55 | 0.87 | 2.70 | -913.27 | 2842.74 |
| 5 | 2711.52 | 6033.05 | 4331.35 | 6285.31 | 1.60 | 1.04 | 1619.83 | 252.26 |
| 6 | 707.94 | 4135.79 | 2720.47 | 5431.28 | 3.84 | 1.31 | 2012.53 | 1295.49 |
| 7 | 506.45 | 2227.07 | 4526.01 | 5100.11 | 8.94 | 2.29 | 4019.56 | 2873.04 |
| 8 | 337.07 | 244.62 | 4312.49 | 3181.31 | 12.79 | 13.01 | 3975.42 | 2936.69 |
| 9 | 528.03 | 1123.38 | 4087.21 | 4208.48 | 7.74 | 3.75 | 3559.18 | 3085.10 |
| 10 | 768.91 | 1088.77 | 4366.39 | 5899.25 | 5.68 | 5.42 | 3597.48 | 4810.48 |
| 11 | 1285.17 | 272.63 | 3241.96 | 2015.14 | 2.52 | 7.39 | 1956.79 | 1742.51 |
| 12 | 1263.36 | 2658.05 | 10000.00 | 4840.64 | 7.92 | 1.82 | 8736.64 | 2182.59 |
| 13 | 926.45 | 513.60 | 3759.21 | 6779.50 | 4.06 | 13.20 | 2832.76 | 6265.90 |
| 14 | 1227.47 | 3635.96 | 2937.27 | 4798.71 | 2.39 | 1.32 | 1709.80 | 1162.75 |
| 15 | 407.23 | 3634.64 | 4451.26 | 5479.38 | 10.93 | 1.51 | 4044.03 | 1844.74 |
| 16 | 1122.13 | 484.97 | 6197.52 | 4204.40 | 5.52 | 8.67 | 5075.39 | 3719.43 |
| 17 | 2440.01 | 891.07 | 4417.66 | 4463.46 | 1.81 | 5.01 | 1977.65 | 3572.39 |
| 18 | 577.95 | 3858.30 | 5223.22 | 5233.23 | 9.04 | 1.36 | 4645.27 | 1374.93 |
| 19 | | 3330.26 | | 5589.61 | | 1.68 | | 2259.35 |
| Média | 1967 | 2366 | 5036 | 5037 | 5,01 | 4,57 | 3068 | 2670 |
| Mediana | 1175 | 1840 | 4434 | 5100 | 3,95 | 2,70 | 3196 | 2843 |

IE = índice de estimulação.

Δ = diferença entre as culturas estimulada e não estimuladas.

Tabela 11. Correlação entre alergia e os índices de estimulação detectados com o teste de proliferação linfocitária.

| Parâmetros | IE TPL |
|-------------|------------------|
| Nº de pares | 37 |
| <i>rs</i> | 0,5550 |
| IC 95% | 0.2724 to 0.7495 |
| <i>P</i> | 0,0004 |

Nº = número, IE = índice de estimulação, *rs* = índice de correlação de Spearman, IC = intervalo de confiança, *P* = significância.

Tabela 12. Correlação entre alergia e os índices de estimulação encontrados com as citocinas detectadas.

| Parâmetros | IE IFN- γ | IE IL-2 | IE IL-4 | IE IL-5 | IE IL-10 | IE IL-12 | IE IL-13 | IE IL-17 | RANTES |
|-------------|---------------------|----------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|----------------------|---------------------|
| Nº de pares | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 |
| <i>rs</i> | 0,4042 | 0,3376 | -0,009954 | 0,4944 | -0,2100 | 0,4183 | 0,8213 | 0,3126 | 0,1371 |
| IC 95% | 0.08236 a 0.6497 | 0.005194 a 0.6028 | -0.3418 a 0.3241 | 0.1933 a 0.7104 | -0.5074 a 0.1323 | 0.09920 a 0.6594 | 0.6721 a 0.9064 | -0.02276 a 0.5847 | -0.2052 a 0.4496 |
| <i>P</i> | 0,0131 | 0,0410 | 0,9534 | 0,0019 | 0,2123 | 0,0100 | <i>P</i> <0.0001 | 0,0596 | 0,4183 |

Nº = número, IE = índice de estimulação, *rs* = índice de correlação de Spearman, IC = intervalo de confiança, *P* = significância.

Tabela 13. Correlação entre os índices de estimulação encontrados com o TPL e os índices obtidos com as citocinas.

| Parâmetros | IE IFN- γ | IE IL-2 | IE IL-4 | IE IL-5 | IE IL-10 | IE IL-12 | IE IL-13 | IE IL-17 | RANTES |
|-------------|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Nº de pares | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 |
| <i>rs</i> | 0,2468 | -0,008564 | -0,2696 | 0,1594 | 0,03902 | 0,09310 | 0,1217 | 0,1188 | 0,1341 |
| IC 95% | -0.09386 a 0.5357 | -0.3406 a 0.3253 | -0.5529 a 0.06963 | -0.1833 a 0.4676 | -0.2978 a 0.3672 | -0.2475 a 0.4132 | -0.2201 a 0.4370 | -0.2230 a 0.4346 | -0.2082 a 0.4471 |
| <i>P</i> | 0,1408 | 0,9599 | 0,1066 | 0,3459 | 0,8186 | 0,5837 | 0,4729 | 0,4837 | 0,4289 |

Nº = número, IE = índice de estimulação, *rs* = índice de correlação de Spearman, IC = intervalo de confiança, *P* = significância.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sampaio SAP, Rivitti, EA. *Dermatologia*. 2a ed. São Paulo: Artes Médicas; 2001. Capítulo 16, p. 133-65: Erupções eczematosas.
2. Fischer T, Maibach HI. Easier patch testing with TRUE Test. *J Am Acad Dermatol*. 1989; 20:447-53.
3. Duarte I, Buense R, Kobata C, Lazzarini R. *Dermatite de contato*. São Paulo: Sgmento farma; 2005.
4. Carvalho LP. *Alergia Clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 1982.
5. McCall BP, Horwitz IB, Feldman SR, Balkrishnan R. Incidence rates, costs, severity, and work-related factors of occupational dermatitis: a workers' compensation analysis of Oregon, 1990-1997. *Arch Dermatol*. 2005; 141:713-8.
6. Beltrani VS. Occupational dermatoses. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2003; 3:115-23.

7. Rios JBM. *Alergia clínica diagnóstico e tratamento*. Rio de Janeiro: RevinteR Ltda; 1995.
8. Negreiros B. *Alergologia Clínica*. São Paulo: Atheneu; 1995.
9. Anderson RT, Rajagopalan R. Effects of allergic dermatosis on health-related quality of life. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2001 Jul;1(4):309-15.
10. Thomson KF, Wilkenson SM, Sommer S, Pollock B. Eczema: quality of life by body site and the effect of patch testing. *Br J Dermatol*. 2002 Apr; 146(4):627-30.
11. Rietschel RL, Fowler JF. Fischer's contact dermatitis. 5^a ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
12. Frosch PJ, Menné T, Lepoittevin JP. *Contact dermatitis*. 4th ed. Springer:Berlim; 2006.
13. Howard I, Maibach, Christopher J, Dannaker, Arto Lahti. Contact skin allergy. In: Middleton EJ. *Allergy, principles and practice*. Boston: Mosby; 1993.
14. Ayala F, Balato N, Lembo G et al. (GIRDCA) Statistical evaluation of the persistence of acquired hypersensitivity by standardized patch tests. *Contact Dermatitis* 1996; 34:354-8.

15. Dickel H, Kuss O, Schmidt A, Diepgen TL. Occupational relevance of positive standard patch-test results in employed persons with an initial report of an occupational skin disease. *Int Arch Occup Environ Health*. 2002 Aug;75(6):423-34.
16. Fisher T, Rystedt I. False-positive, follicular and irritant patch test reactions to metal salts. *Contact Dermatitis*. 1985 Feb;12(2):93-8.
17. Anderson RT, Rajagopalan R. Effects of allergic dermatosis on health-related quality of life. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2001; 1:309-15.
18. Thomson KF, Wilkinson SM, Sommer S, Pollock B. Eczema: quality of life by body site and the effect of patch testing. *Br J Dermatol*. 2002; 146:627-30.
19. Fisher T, Rystedt I. False-positive, follicular and irritant patch test reactions to metal salts. *Contact Dermatitis*. 1985; 12:93-8.
20. Duarte I, Lazzarini R, Buense R. Interference of the position of substances in an epicutaneous patch test battery with the occurrence of false-positive results. *Am J Contact Dermat*. 2002; 13:125-32
21. Alchorne AOA. "Patch test", teste epicutâneo ou de contato, ou epidermorreação. *Dermatologia Atual*. 1997; 3:27-30.

22. Bruze M, Isaksson M, Edman B, *et al.* A study on expert reading of patch test reactions: interindividual accordance. *Contact Dermatitis*. 1995; 32:331-7.
23. Rose NR, Friedman H, Fahey JL. Manual of clinical laboratory immunology. 3a ed. Washington: Medsi; 1986.
24. Martins LE, Duarte AJ, Aoki V, Nunes RS, Oigusuku S, Reis VM. Lymphocyte proliferation testing in chromium allergic contact dermatitis. *Clin Exp Dermatol*. 2008; 33:472-7.
25. Sanchez APG, Maruta CW, Sato MN, Ribeiro RL, Zomignan CA, Nunes RS, Reis VMS. Estudo da proliferação linfocitária em pacientes sensibilizados ao níquel. *An Bras Dermatol*. 2005; 80:149-58.
26. Macleod TM, Hutchinson F, Raffle EJ. The uptake of labeled thymidine by leukocytes of nickel sensitive patients. *Br J Dermatol* 1970; 82: 487-492.
27. Räsänen L, Sainio H, Lehto M, Reunala T. Lymphocyte proliferation test as a diagnostic aid in chromium contact sensitivity. *Contact Dermatitis* 1991; 25: 25-9.

28. Trattner A, Akerman L, Lapidoth M, Klein T, Weiss H, Ben Chaim B, David M. Use of in vitro release of interferon-gamma in the diagnosis of contact allergy to potassium dichromate - a controlled study. *Contact Dermatitis*. 2003; 48:191-3.

29. Moed H, von Blomberg M, Bruynzeel DP, Scheper R, Gibbs S, Rustemeyer T. Improved detection of allergen-specific T-cell responses in allergic contact dermatitis through the addition of "cytokine cocktails". *Exp Dermatol*. 2005; 14: 634-40.

30. Akerman L, Trattner A, Klein T, Israeli M, Freiser A, David M. Simultaneous quantification of ten cytokines in allergic contact dermatitis to potassium dichromate using Luminex Liquichip array. *Poster Abstract Book of the American Academy of Dermatology 64th Annual meeting*, 2006, San Francisco California.

31. Minang JT, Areström I, Troye-Blomberg M, Lundeberg L, Ahlborg N. Nickel, cobalt, chromium, palladium and gold induce a mixed Th1- and Th2-type cytokine response in vitro in subjects with contact allergy to the respective metals. *Clin Exp Immunol*. 2006;146(3):417-26.

32. Lindemann M, Rietschel F, Zabel M, Grosse-Wilde H. Detection of chromium allergy by cellular in vitro methods. *Clin Exp Allergy*. 2008;38(9):1468-75.

33. Shupack SI. The chemistry of chromium and some resulting analytical problems. *Environ Health Perspect.* 1991; 92:7-11.
34. Grupo brasileiro de estudo em dermatite de contato (GBEDC). Estudo multicêntrico para a elaboração de uma bateria-padrão brasileira de teste de contato. *An Bras Dermatol.* 2000; 75:147-56.
35. Kligman AM. The identification of contact allergens by human assay. *J Invest Dermatol.* 1966; 47:393-409.
36. Basketter D, Horev L, Slodovnik D, Merimes S, Trattner A, Ingber A. Investigation of the threshold for allergic reactivity to chromium. *Contact Dermatitis.* 2001; 44:70-4.
37. Hansen MB, Johansen JD, Menné T. Chromium allergy: significance of both Cr(III) and Cr(VI). *Contact Dermatitis.* 2003; 49:206-12.
38. Beck MH, Wilkinson SM. Contact dermatitis: Allergic. In: Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C. *Rook's Textbook of Dermatology.* 7th ed. Oxford, England: Blacwell Science Publishers; 2004: 20.1-124.
39. Fregert S. Occupational dermatitis in a 10-year material. *Contact Dermatitis.* 1975; 1: 96-107.

40. Burrows D. Prognosis in industrial dermatitis. *Br J Dermatol.* 1972; 87:145-8.
41. Lips R, Rast H, Elsner P. Outcome of job change in patients with occupational chromate dermatitis. *Contact Dermatitis.* 1996; 34:268-71.
42. Belsito DV. The rise and fall of contact dermatitis. *Am J Contact Dermatitis.* 1997; 8:193-201.
43. Landsteiner K, Jacobs J. Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. *J Exp Med.* 1935; 61:643-57.
44. Shearer GM. Cell-mediated cytotoxicity to trinitrophenyl-modified syngenic lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1974; 4:527-33.
45. Gober MD, Gaspari AA. Allergic contact dermatitis. *Curr Dir Autoimmun* 2008; 10:1-26.
46. Campos RA, Szczepanik M, Itakura A et al. Cutaneous immunization rapidly activates liver invariant Valpha14 NKT cells stimulating B-1 B cells to initiate T cell recruitment for elicitation of contact sensitivity. *J Exp Med* 2003; 198:1785-96.

47. Blauvelt A, Hwang ST, Udey MC. Allergic and immunologic diseases of the skin. *J Allergy Clin Immunol.* 2003; 111:S560-70.
48. Kohler J, Martin S, Pflugfelder U, Ruh H, Vollmer J, Weltzien HU. Cross-reactive trinitrophenylated peptides as antigens for class II major histocompatibility complex-restricted T cells and inducers of contact sensitivity in mice. Limited T cell receptor repertoire. *Eur J Immunol.* 1995; 25:92-101.
49. Cavani A, Hackett CJ, Wilson KJ, Rothbard JB, Katz SI. Characterization of epitopes recognized by hapten-specific CD4+ T cells. *J Immunol.* 1995; 154:1232-8.
50. Girolomoni G, Sebastiani S, Albanesi C, Cavani A. T-cell subpopulations in the development of atopic and contact allergy. *Curr Opin Immunol.* 2002; 13:733-7.
51. Lily YL, Ponciano D, Cruz Jr. Allergic contact dermatitis: pathophysiology applied to future therapy. *Dermatologic Therapy.* 2004; 17:219-27.
52. Enk AH. Allergic contact dermatitis: understanding the immune response and potential for targeted therapy using cytokines. *Mol Med Today.* 1997; 3:423-8.

53. Aiba S, Katz SI. Phenotypic and functional characteristics of *in vivo*-activated Langerhans cells. *J Immunol*. 1990; 145:2791-2800.
54. Reinherz EL, Meuer SC, Schlossman SF. The delineation of antigen receptors on human T lymphocytes. *Immunol Today*. 1983; 4:5-9.
55. Ozawa H, Nakagawa S, Tagami H, *et al*. Interleukin-1 beta and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mediate Langerhans cell maturation differently. *J Invest Dermatol*. 1996; 106:441-5.
56. Schwarzenberger K, Udey MC. Contact allergens and epidermal proinflammatory cytokines modulate Langerhans cell E-cadherin expression *in situ*. *J Invest Dermatol*. 1996; 106:553-8.
57. Winzler C, Rovere P, Rescigno M, *et al*. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J Exp Med*. 1997; 185:317-28.
58. Ma J, Wang JH, Guo YJ, *et al*. *In vivo* treatment with anti-ICAM-1 and anti-LFA-1 antibodies inhibits contact sensitization-induced migration of epidermal Langerhans cells to regional lymph nodes. *Cell Immunol*. 1994; 158:389-99.

59. Price AA, Camberbatch M, Kimber I, *et al.* Alpha 6 integrins are required for Langerhans cell migration from the epidermis. *J Exp Med.* 1997; 186:1725-35.
60. Bevilacqua MP. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Ann Rev Immunol.* 1993; 11:767-804.
61. Osborn L, Hession C, Tizard R, *et al.* Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell.* 1989; 59:1203-11.
62. Ross EL, Barker JN, Allen MH, *et al.* Langerhans' cell expression of the selectin ligand, Sialyl Lewis X. *Immunology.* 1994; 81:303-8.
63. Wang B, Kondo S, Shivji GM, *et al.* Tumor necrosis factor receptor II (p75) signalling is required for the migration of Langerhans' cells. *Immunology.* 1996; 88:284-8.
64. Xu H, Bjarnason B, Elmets CA. Sensitization versus elicitation in allergic contact dermatitis: potential differences at cellular and molecular levels. *Am J Contact Dermatitis.* 2000; 11:228-34.

65. Mueller DL, Jenkins MK, Schwartz RH. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T-cell antigen receptor occupancy. *Annu Rev Immunol.* 1989; 7:445-80.
66. Murphy K, Travers P, Walport M. *Imunobiologia de Janeway.* 7a ed. Porto Alegre: Editora ArtMed, 2010.
67. Kuhlman P, Moy VT, Lollo BA, *et al.* The accessory function of murine intercellular adhesion molecule-1 in T lymphocyte activation. Contribution of adhesion and coactivation. *J Immunol.* 1991; 146:1773-82.
68. Linsley PS, Brady W, Grosmaire L, *et al.* Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J Exp Med.* 1991; 173:721-31.
69. Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4⁺ T cells. *Ann Rev Immunol.* 1994; 12:634-73.
70. Cavani A, Nasorri F, Prezzi C, Sebastiani S, Albanesi C, Girolomoni G. Human CD4⁺ T lymphocytes with remarkable regulatory functions on dendritic cells and nickel-specific Th1 immune responses. *J Invest Dermatol.* 2000; 114:295-302.

71. Picker LJ, Treer JR, Ferguson-Darnell B, *et al.* Control of lymphocyte recirculation in man. II. Differential regulation of the cutaneous lymphocyte-associated antigen, a tissue-selective homing receptor for skin-homing T cells. *J Immunol.* 1993; 150:1122-36.
72. Horgan KJ, Luce GE, Tanaka Y, *et al.* Differential expression of VLA- α 4 and VLA- β 1 discriminates multiple subsets of CD4⁺CD45RO⁺ “memory” T cells. *J Immunol.* 1992; 149:4082-87.
73. Campbell JJ, *et al.* The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature.* 1999; 400:776-80.
74. Sallusto F, *et al.* The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18:593-620.
75. Elices MJ, Osborn L, Takada Y, *et al.* VCAM-1 on activated endothelial interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectine binding site. *Cell.* 1990; 60:577-84.
76. Dustin ML, Springer TA. Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J Cell Biol.* 1988; 107:321-31.

77. Brasch J, Sterry W. Expression of adhesion molecules in early allergic patch test reactions. *Dermatology*. 1992; 185:12-7.
78. Ferguson TA, Kupper TS. Antigen-independent process in antigen-specific immunity. A role for alpha 4 integrin. *J Immunol*. 1993; 150:1172-82.
79. Xu H, Bjarnason B, Elmetts CA. Sensitization versus elicitation in allergic contact dermatitis: potential differences at cellular and molecular levels. *Am J Contact Dermatitis*. 2000; 11:228-34.
80. Vilcek J, Gray PW, Rinderknecht E, *et al*. Interferon-gamma: a lymphokine for all seasons. *Lymphokines*. 1985; 11:1-32.
81. Trautmann A, Akdis M, Kleeman D, *et al*. T cell-mediated FAS-induced keratinocyte apoptosis plays a key pathogenetic role in eczematous dermatitis. *J Clin Invest*. 2000; 106:25-35.
82. Keheren J, *et al*. Cytotoxicity is mandatory for CD8⁺ T cell-mediated contact hypersensitivity. *J Exp Med*. 1999. 189:779-86.
83. Trautmann A, Altnauer F, Akdis M, *et al*. The differential fate of cadherins during T-cell-induced keratinocyte apoptosis leads to spongiosis in eczematous dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2001; 117:927-34.

84. Nishibu A, Ward BR, Jester JV, Ploegh HL, Boes M, Takashima A. Behavioral responses of epidermal Langerhans cells in situ to local pathological stimuli. *J Invest Dermatol.* 2006 Apr;126(4):787-96.

85. Nishibu A, Ward BR, Jester JV, et al. Roles for IL-1 and TNF- α in dynamic behavioral responses of Langerhans cells to topical hapten application. *J Dermatol Sci* 2007; 45: 23-30.

86. Antonopoulos C, Cumberbatch M, Mee JB, et al. IL-18 is a key proximal mediator of contact hypersensitivity and allergen-induced Langerhans cell migration. Using celltype-specific ablation of glucocorticoid receptors, this study elegantly demonstrates migration in murine epidermis. *J Leukoc Biol* 2008; 83:361–367.

87. Moodycliffe AM, Shreedhar V, Ullrich SE, Walterscheid J, Bucana C, Kripke ML, Flores-Romo L. CD40-CD40 ligand interactions in vivo regulate migration of antigen-bearing dendritic cells from the skin to draining lymph nodes. *J Exp Med.* 2000 Jun 5;191(11):2011-20.

88. Nuriya S, Yagita H, Okumura K, Azuma M. The differential role of CD86 and CD80 co-stimulatory molecules in the induction and the effector phases of contact hypersensitivity. *Int Immunol.* 1996 Jun;8(6):917-26.

89. Aiba S, Terunuma A, Manome H, Tagami H. Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur J Immunol*. 1997; 27:3031-8.
90. Hauser C. Cultured epidermal Langerhans cells activate effector T cells for contact sensitivity. *J Invest Dermatol*. 1990 Oct;95(4):436-40.
91. Saeki H, Moore AM, Brown MJ et al. Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. *J Immunol* 1999; 162:2472-5.
92. Wang B, Esche C, Mamelak A, Freed I, Watanabe H, Sauder DN. Cytokine knockouts in contact hypersensitivity research. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003 Oct;14(5):381-9.

93. Bennett CL, van Rijn E, Jung S et al. Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity. *J Cell Biol* 2005; 169:569-76.

94. Kissenpfennig A, Henri S, Dubois B et al. Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity* 2005; 22:643-54.

95. Kaplan DH, Jenison MC, Saeland S et al. Epidermal Langerhans cell-deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity. *Immunity* 2005; 23:611–620.

96. Bennett CL, Noordegraaf M, Martina CA, et al. Langerhans cells are required for efficient presentation of topically applied hapten to T cells. *J Immunol* 2007; 179:6830–6835.

97. Steinman RM and Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: The importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:351–358.

98. Kaplan DH, Kissenpfennig A, Clausen BE. Insights into Langerhans cell function from Langerhans cell ablation models. *Eur J Immunol* 2008; 38:2369–2376.

99. Fukunaga A, Khaskhely NM, Sreevidya CS et al. Dermal dendritic cells, and not Langerhans cells, play an essential role in inducing an immune response. *J Immunol* 2008; 180:3057-64.

100. Bursch LS, Wang L, Igyarto B et al. Identification of a novel population of Langerin+ dendritic cells. *J Exp Med* 2007; 204:3147-56.

101. Poulin LF, Henri S de Bovis B, Devilard E, Kissenpfennig A, Malissen B, The dermis contains langerin dendritic cells that develop and function independently of epidermal Langerhans cells. *J.Exp.Med.* 2007. 204: 3119–3131.

102. Ginhoux F, Collin MP, Bogunovic M, Abel M, Leboeuf M, Helft J, Ochando J. *et al.* Blood-derived dermal langerin dendritic cells survey the skin in the steady state. *J.Exp.Med.* 2007. 204: 3133–3146.

103. Wang L, Bursch LS, Kissenpfennig A et al. Langerin expressing cells promote skin immune responses under defined conditions. *J Immunol* 2008; 180:4722-7.

104. Bacci S, Alard P, Dai R et al. High and low doses of haptens dictate whether dermal or epidermal antigen-presenting cells promote contact hypersensitivity. *Eur J Immunol* 1997; 27:442-8.

105. Grabbe S, Steinbrink K, Steinert M, Luger TA, Schwarz T. Removal of the majority of epidermal Langerhans cells by topical or systemic steroid application enhances the effector phase of murine contact hypersensitivity. *J Immunol*. 1995 Nov 1;155(9):4207-17.

106. Grabbe S, Schwarz T. Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Immunol Today*. 1998 Jan;19(1):37-44.

107. Nakano Y. Antigen-presenting cell function of epidermal cells activated by hapten application. *Br J Dermatol*. 1998 May;138(5):786-94.

108. Kimber I, Dearman RJ. Allergic contact dermatitis: the cellular effectors. *Contact Dermatitis*. 2002; 46:1-5.

109. Gocinski BL, Tigelaar RE. Roles of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in murine contact sensitivity revealed by in vivo monoclonal antibody depletion. *J Immunol*. 1990; 144:4121-8.

110. Bour H, Peyron E, Gaucherand M, Garrigue JL, Desvignes C, Kaiserlian D, Revillard JP, Nicolas JF. Major histocompatibility complex class I - restricted CD8⁺ T cells and class II-restricted CD4⁺ T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene. *Eur J Immunol*. 1995; 25:3006-10.

111. Okazaki F, Kanzaki H, Fujii K et al. Initial Recruitment of Interferon- γ -producing CD8⁺ effector cells, followed by infiltration of CD4⁺ cells in 2,4,6-trinitro-1-chlorobenzene (TNCl)-induced murine contact hypersensitivity reactions. *J Dermatol*. 2002; 29:699-708.

112. Cavani A, Mei D, Guerra E, et al. Patients with allergic contact dermatitis to nickel and nonallergic individuals display different nickel-specific T cell responses. Evidence for the presence of effector CD8⁺ and regulatory CD4⁺ T cells. *J Invest Dermatol*. 1998; 111:621-8.

113. Dearman RJ, Kimber I. Role of CD4⁺ T helper 2-type cells in cutaneous inflammatory responses induced by fluorescein isothiocyanate. *Immunology*. 2000; 101:442-51.
114. Larsen JM, Bonefeld CM, Poulsen SS, et al. IL-23 and T(H)17-mediated inflammation in human allergic contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123:486-92.
115. Albanesi C, Cavani A, Girolomoni G. IL-17 is produced by nickel-specific T lymphocytes and regulates ICAM-1 expression and chemokine production in human keratinocytes: synergistic or antagonist effects with IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol* 1999;162:494–502.
116. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M *et al.* Interleukin(IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 2006; 203:2271-9.
117. Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, *et al.* Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* 2007;13:1173-5.

118. Nakae S, Komiyama Y, Nambu A *et al.* Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* 2002;17:375-387.
119. O'Leary JG, Goodarzi M, Drayton DL *et al.* T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat Immunol* 2006; 5:7-16.
120. Cavani A. T regulatory cells in contact hypersensitivity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008; 8:294-8.
121. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2003;21:685–711.
122. Germain RN. Arose by any other name: from suppressor T cells to Tregs, approbation to unbridled enthusiasm. *Immunology* 2008;123:20–27.
123. Berg DJ, Leach MW, Kuhn R, *et al.* Interleukin 10 but not interleukin 4 is a natural suppressant of cutaneous inflammatory responses. *J Exp Med* 1995;182:99–108.

124. Liu H, Leung BP. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in health and disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006;33(5-6):519-24.

125. Colantonio L, Iellem A, Sinigaglia F, D'Ambrosio D. Skin-homing CLA⁺ T cells and regulatory CD25⁺ T cells represent major subsets of human peripheral blood memory T cells migrating in response to CCL1/l-309. *Eur J Immunol*. 2002 Dec;32(12):3506-14.

126. Le Bras S, Geha RS. IPEX and the role of Foxp3 in the development and function of human Tregs. *J Clin Invest* 2006;116:1473–1475.

127. Cavani A, Nasorri F, Ottaviani C, Sebastiani S, De Pità O, Girolomoni G. Human CD25⁺ regulatory T cells maintain immune tolerance to nickel in healthy, nonallergic individuals. *J Immunol*. 2003 Dec 1;171(11):5760-8.

128. Shevach EM. CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2:389-400.

129. Ring S, Schäfer SC, Mahnke K, Lehr HA, Enk AH. CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions by blocking influx of effector T cells into inflamed tissue. *Eur J Immunol.* 2006 Nov;36(11):2981-92.

130. Dieckmann D, Bruett CH, Ploettner H, Lutz MB, Schuler G. Human CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells. *J Exp Med.* 2002 Jul 15;196(2):247-53.

131. Albanesi C, Scarponi C, Sebastiani S, *et al.* A cytokine-to-chemokine axis between T lymphocytes and keratinocytes can favour Th1 cell accumulation in chronic inflammatory skin disease. *J Leukoc Biol.* 2001; 70:617-23.

132. Sebastiani S, Allavena P, Albanesi C, *et al.* Chemokine receptor expression and function on CD4⁺ T lymphocyte with regulatory activity. *J Immunol.* 2001; 166:996-1002.

133. Chen W, Jin W, Hardegen N, *et al.* Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naïve T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003;198:1875–86.

134. Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, Wysocka M, Trinchieri G, Murphy KM, O'Garra A. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4⁺ T cells. *J Immunol.* 1995 May 15;154(10):5071-9.

135. Grabbe S, Steinert M, Mahnke K, *et al.* Dissection of antigenic and irritative effects of epicutaneously applied haptens in mice. Evidence that not the antigenic component but nonspecific proinflammatory effects of haptens determine the concentration-dependent elicitation of allergic contact dermatitis. *J Clin Invest* 1996;98:1158–1164.

136. Bonneville M, Chavagnac C, Vocanson M, *et al.* Skin contact irritation conditions the development and severity of allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol* 2007;127:1430–1435.

137. Gorbachev AV, Fairchild RL. CD4⁺ T cells regulate CD8⁺ T cell-mediated cutaneous immune responses by restricting effector T cell development through a Fas ligand-dependent mechanism. *J Immunol.* 2004; 172:2286-95.

138. Cavani A, De Pità O, Girolomoni G. New aspects of the molecular basis of contact allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007; 7:404-8.

139. Enk AH, Katz SI. Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Feb 15;89(4):1398-402.

140. Caughman SW, Li LJ, Degitz K. Characterization and functional analysis of interferon-gamma-induced intercellular adhesion molecule-1 expression in human keratinocytes and A-431 cells. *J Invest Dermatol*. 1990 Jun;94(6 Suppl):22S-26S.

141. Albanesi C, Cavani A, Girolomoni G. Interferon-gamma-stimulated human keratinocytes express the genes necessary for the production of peptide-loaded MHC class II molecules. *J Invest Dermatol* 1998;110:138–142.

142. Gaspari AA, Burns RP Jr, Kondo S, Nasir A, Kurup A, Mlodynia D, Sauder D, Barth RK. Characterization of the altered cutaneous reactivity of transgenic mice whose keratinocytes overexpress B7-1. *Clin Immunol Immunopathol*. 1998 Mar;86(3):259-70.

143. Nasir A, Ferbel B, Salminen W, Barth RK, Gaspari AA. Exaggerated and persistent cutaneous delayed-type hypersensitivity in transgenic mice whose epidermal keratinocytes constitutively express B7-1 antigen. *J Clin Invest.* 1994 Aug;94(2):892-8.

144. Wakem P, Burns RP Jr, Ramirez F, Zlotnick D, Ferbel B, Haidaris CG, Gaspari AA. Allergens and irritants transcriptionally upregulate CD80 gene expression in human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2000 Jun;114(6):1085-92.

145. Enk AH, Katz SI. Identification and induction of keratinocyte-derived IL-10. *J Immunol.* 1992 Jul 1;149(1):92-5.

146. Burns R, Luzina I, Nasir A, Haidaris CG, Barth RK, Gaspari AA. Keratinocyte-derived, CD80-mediated costimulation is associated with hapten-specific IgE production during contact hypersensitivity to TH1 haptens. *J Allergy Clin Immunol.* 2005 Feb;115(2):383-90.

147. Yoshimoto T, Wang CR, Yoneto T, Matsuzawa A, Cruikshank WW, Nariuchi H. Role of IL-16 in delayed-type hypersensitivity reaction. *Blood.* 2000 May 1;95(9):2869-74.

148. Loser K, Mehling A, Loeser S, Apelt J, Kuhn A, Grabbe S, Schwarz T, Penninger JM, Beissert S. Epidermal RANKL controls regulatory T-cell numbers via activation of dendritic cells. *Nat Med.* 2006 12(12):1372-9.

149. Mahnke K, Qian Y, Knop J, Enk AH. Induction of CD4+/CD25+ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells. *Blood.* 2003 15;101(12):4862-9.

150. Suto H, Nakae S, Kakurai M, *et al.* Mast cell-associated TNF promotes dendritic cell migration. *J Immunol* 2006;176:4102–4112.

151. Grimbaldston MA, Nakae S, Kalesnikoff J, *et al.* Mast cell-derived interleukin 10 limits skin pathology in contact dermatitis and chronic irradiation with ultraviolet B. *Nat Immunol* 2007;8:1095–1104.

152. Stall AM, Wells SM, Lam KP. B-1 cells: unique origins and functions. *Semin Immunol.* 1996;8(1):45-59.

153. Tsuji RF, Szczepanik M, Kawikova I, Paliwal V, Campos RA, Itakura A, Akahira-Azuma M, Baumgarth N, Herzenberg LA, Askenase PW. B cell-dependent T cell responses: IgM antibodies are required to elicit contact sensitivity. *J Exp Med.* 2002 18;196(10):1277-90.

154. Askenase PW, Szczepanik M, Itakura A, Kiener C, Campos RA. Extravascular T-cell recruitment requires initiation begun by V α 14+ NKT cells and B-1 B cells. *Trends Immunol.* 2004;25(8):441-9.

155. Tsuji RF, Kikuchi M, Askenase PW. Possible involvement of C5/C5a in the efferent and elicitation phases of contact sensitivity. *J Immunol.* 1996 15;156(12):4444-50.

156. Tsuji RF, Geba GP, Wang Y, Kawamoto K, Matis LA, Askenase PW. Required early complement activation in contact sensitivity with generation of local C5-dependent chemotactic activity, and late T cell interferon gamma: a possible initiating role of B cells. *J Exp Med.* 1997 6;186(7):1015-26.

157. Tsuji RF, Kawikova I, Ramabhadran R et al. Early local generation of C5a initiates the elicitation of contact sensitivity by leading to early T cell recruitment. *J Immunol* 2000; 165:1588-98.

158. Mercer JC, Ragin MJ, August A. Natural killer T cells: rapid responders controlling immunity and disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37(7):1337-43.

159. Hansen DS, Schofield L. Regulation of immunity and pathogenesis in infectious diseases by CD1d-restricted NKT cells. *Int J Parasitol.* 2004;34(1):15-25.

160. Campos RA, Szczepanik M, Itakura A, Lisbonne M, Dey N, Leite-de-Moraes MC, Askenase PW. Interleukin-4-dependent innate collaboration between iNKT cells and B-1 B cells controls adaptative contact sensitivity. *Immunology.* 2006;117(4):536-47.

161. Duarte I, Almeida FA, Proença NG. Excited skin syndrome. *Am J Contact Dermatitis.* 1996; 7:24-34.

162. Wolf R, Davidovici B, Marcos B, Orion E. Lymphocyte transformation test in patients with allergic contact dermatitis. *Contact Dermatitis.* 2005; 53:245.

163. Brasch J, Henseler T, Aberer W, et al. Reproducibility of patch tests. A multicenter study of synchronous left-versus right-sided patch tests by the

German Contact Dermatitis Research Group. *J Am Acad Dermatol.* 1994; 31:584-91.

164. Maluish AE, Strong DM. *Manual of clinical laboratory immunology.* Washington, 1986 3^a ed. p. 274-81.

165. Grosfeld JCM, Penders AJM, Grood R, Verwilghen L. In vitro investigations of chromium- and nickel-hypersensitivity with culture of skin and peripheral lymphocytes. *Dermatologica.* 1966; 132:189-92.

166. Lischka G. Lymphocytentransformationstest bei Chromatallergie. *Arch Derm Forsch.* 1971; 240: 212-8.

167. Christiansen K, Holmes K, Zilko PJ. Metal sensitivity causing loosened joint prostheses. *Ann Rheum Dis.* 1979; 38: 476-80.

168. Carando S, Cannas M, Rossi P, Portigliatti-Barbos M. The lymphocytic transformation test (L.T.T.) in the evaluation of intolerance in prosthetic implants. *Ital J Orthop Traumatol.* 1985; 11: 475-81.

169. Al-Tawil NG, Marcusson JA, Moller E. Lymphocyte stimulation by trivalent and hexavalent chromium compounds in patients with chromium sensitivity. *Acta Derm Venereol.* 1983; 63: 296-303.

170. Uter W, Hegewald J, Aberer W et al. The European standard series in 9 European countries, 2002/2003 – first results of the European Surveillance System on contact allergies. *Contact Dermatitis* 2005; 53:136–45.

171. Belsito DV. Occupational contact dermatitis: etiology, prevalence, and resultant impairment/disability. *J Am Acad Dermatol* 2005;53:303–13.

172. Keating SM, Bejon P, Berthoud T et al. Durable human memory T cells quantifiable by cultured enzyme-linked immunospot assays are induced by heterologous prime boost immunization and correlate with protection against malaria. *J Immunol* 2005; 175:5675–80.

173. Wilkinson DS, Fregert S, Magnusson B, Bandmann HJ, Calnan CD, Cronin E, Hjorth N, Maibach HJ, Malten KE, Meneghini CL, Pirilä V. Terminology of contact dermatitis. *Acta Derm Venereol.*1970; 50: 287-92.

174. Wahlkvist H, Masjedi K, Gruvberger B, Zuber B, Karlberg A-T, Bruze M, Ahlberg N. The lipophilic hapten parthenolide induces interferon- γ and interleukin-13 production by peripheral blood-derived CD8+ T cells from contact allergic subjects *in vitro*. *Br J Dermatol.* 2008;158:70-7.

175. Christiansen J, Färm G, Eid-Forest R, Anderson C, Cederbrant K, Hultman P. Interferon- γ secreted from peripheral blood mononuclear cells as a possible diagnostic marker for allergic contact dermatitis to gold. *Contact Dermatitis*. 2006;55:101–112.