



## ARTIGO ORIGINAL

# Metotrexato para dermatite atópica adulta refratária induz alterações na expressão cutânea de IL-31 e IL-31RA<sup>☆,☆☆</sup>



Luciana Paula Samorano <sup>ID</sup> <sup>a,\*</sup>, Kelly Cristina Gomes Manfrere <sup>ID</sup> <sup>b</sup>,  
 Naiura Vieira Pereira <sup>ID</sup> <sup>b</sup>, Roberto Takaoka <sup>ID</sup> <sup>a</sup>, Neusa Yuriko Sakai Valente <sup>ID</sup> <sup>a</sup>,  
 Mirian Nacagami Sotto <sup>ID</sup> <sup>c</sup>, Luiz Fernando Ferraz Silva <sup>ID</sup> <sup>c</sup>, Maria Notomi Sato <sup>ID</sup> <sup>b</sup>  
 e Valeria Aoki <sup>ID</sup> <sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Dermatologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

<sup>b</sup> Departamento de Dermatologia, Laboratório de Dermatologia e Imunodeficiências (LIM-56), Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

<sup>c</sup> Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Recebido em 29 de outubro de 2022; aceito em 9 de janeiro de 2023

## PALAVRAS-CHAVE

Dermatite atópica;  
 Inflamação;  
 Interleucinas;  
 Metotrexato;  
 Prurido;  
 Receptores de interleucina

## Resumo

**Fundamentos:** O metotrexato (MTX) é um tratamento alternativo para pacientes com dermatite atópica (DA) moderada/grave.

**Objetivo:** Avaliar o efeito do MTX na expressão cutânea de citocinas e quimiocinas envolvidas na resposta inflamatória em indivíduos adultos com DA tratados com metotrexato por 24 semanas.

**Métodos:** Foi realizado um estudo de coorte prospectivo em instituição única com 12 adultos com DA moderada/grave que receberam MTX oral (15 mg/semana por 24 semanas) e 10 controles pareados não atópicos. A comparação foi feita em biopsias de pele lesada e não lesada, pré e pós-tratamento com MTX. Foram analisadas a espessura epidérmica média e a expressão de IL-31, IL-31RA, OSMR, TSLP, Ki67, IL-4 mRNA, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TARC e CCL-22.

**Resultados:** Houve redução da espessura média da epiderme ( $p = 0,021$ ), aumento da expressão de IL-31RA (imuno-histoquímica) na epiderme ( $p = 0,016$ ) e diminuição da expressão gênica de IL-31 ( $p = 0,019$ ) na pele com lesada da DA pós-tratamento com MTX. Não foram identificadas alterações significantes na expressão cutânea dos demais marcadores avaliados.

**Limitações do estudo:** Pequeno tamanho da amostra e duração limitada do seguimento.

DOI referente ao artigo:

<https://doi.org/10.1016/j.abd.2023.01.002>

<sup>☆</sup> Como citar este artigo: Samorano LP, Manfrere KCG, Pereira NV, Takaoka R, Valente NYS, Sotto MN, et al. Methotrexate for refractory adult atopic dermatitis leads to alterations in cutaneous IL-31 and IL-31RA expression. An Bras Dermatol. 2024;99:72-9.

<sup>☆☆</sup> Trabalho realizado na Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

\* Autor para correspondência.

E-mail: [luciana.samorano@gmail.com](mailto:luciana.samorano@gmail.com) (L.P. Samorano).

**Conclusões:** O tratamento com MTX em adultos com DA moderada/grave reduziu a hiperplasia epidérmica e alterou a expressão cutânea de citocinas e receptores inflamatórios relacionados principalmente ao prurido, incluindo IL-31 e IL-31RA.

**Registro do estudo:** ClinicalTrials.gov Identificador: NCT03327116.

© 2023 Publicado por Elsevier España, S.L.U. em nome de Sociedade Brasileira de Dermatologia. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## Introdução

A dermatite atópica (DA) é doença cutânea crônica e pruriginosa com fisiopatologia complexa. Vários fatores estão envolvidos, incluindo defeitos fundamentais da barreira cutânea e disfunção imunológica que resulta em inflamação, bem como lesões eczematosas típicas.<sup>1-3</sup>

Aumento nas citocinas e quimiocinas Th2 (IL-4, IL-10, IL-13) e Th22 (IL-22)<sup>4,5</sup> é observado na fase aguda da DA. Além disso, ocorre aumento da expressão das citocinas Th1 (IL-12, IFN- $\gamma$ ) e Th17 (IL-17) na fase crônica. Essas observações são vistas principalmente em estudos com foco em crianças<sup>6</sup> e na população asiática.<sup>7</sup>

Outras citocinas foram identificadas na inflamação em DA. Essas incluem TSLP (linfopoietina estromal tímica) e IL-31. Os queratinócitos epidérmicos expressam TSLP, promovendo assim a ativação de células dendríticas mieloides, bem como células Th2 e Th22. Como resultado, há indução de prurido.<sup>8,9</sup> A expressão de IL-31 promove inflamação mediada por células Th2. Também pode haver aqui uma associação com prurido.<sup>10</sup> A sinalização ocorre por meio de um complexo receptor heterodimérico de subunidades do receptor M de oncostatina (OSMR) e do receptor alfa de IL-31 (IL-31RA).<sup>11</sup>

O tratamento da DA deve se concentrar no controle da inflamação e na reparação das alterações da barreira cutânea. Como resultado, o metotrexato (MTX) pode servir como tratamento para pacientes com DA que são refratários à terapia tradicional.<sup>2,12,13</sup> Os autores já demonstraram esse achado anteriormente.<sup>14</sup>

O efeito do MTX foi avaliado na expressão cutânea de citocinas e quimiocinas envolvidas na resposta inflamatória em indivíduos adultos com DA que receberam tratamento com MTX por um total de 24 semanas.

## Métodos

### Desenho do estudo e amostra

Um estudo prospectivo em instituição única foi realizado no Departamento de Dermatologia. A população do estudo incluiu 12 adultos (seis do sexo feminino; seis do masculino) com DA moderada a grave (de acordo com os critérios de Hanifin & Rajka). Foi avaliado o uso de MTX em um total de 24 semanas.

Os critérios de elegibilidade incluíram indivíduos com pelo menos 18 anos de idade, com DA moderada/grave com base nos escores de gravidade: EASI (Eczema Area and Severity Index)  $\geq 7,1$  e SCORAD (SCORing Atopic Dermatitis)  $\geq 25$ . Foi necessário que as mulheres em idade reprodutiva utilizassem métodos anticoncepcionais eficazes e fossem

confirmadas como não grávidas através de teste de gravidez no sangue negativo antes do início do tratamento. Os critérios de exclusão incluíram indivíduo com qualquer doença ou condição que contraindicasse o uso de MTX (p. ex., pancitopenia), infecção por HIV ou outra condição imunossupressora, fototerapia, uso de corticosteroide sistêmico, uso de ciclosporina e azatioprina ou terapia imunobiológica nas 12 semanas anteriores ao início do tratamento com MTX, como detalhado em outra publicação.<sup>14,15</sup>

O escore EASI inicial médio dos pacientes com DA foi de  $28,9 \pm 9,9$  e o SCORAD inicial médio foi de  $57,2 \pm 7,8$ .<sup>14</sup> A dose de MTX inicial (dose de teste oral) foi de 7,5 mg na semana 1, aumentada para 15 mg semanalmente. O ácido fólico oral foi administrado uma vez por semana (5 mg) 48 a 72 horas após a administração do MTX. Durante o tratamento, os indivíduos continuaram com as medicações tópicas padrão de tratamento da DA, incluindo corticosteroides tópicos, valerato de betametasona 0,1% creme, acetato de hidrocortisona 1,0% creme, inibidores de calcineurina e emolientes.

Os indivíduos foram biopsiados em dois locais diferentes (pele lesada e pele sem lesão clínica). Para a biopsia da pele lesada, foi selecionada uma região corporal não fotoexposta, principalmente na região lombar. A investigação foi realizada no pré-tratamento e após 24 semanas de uso de MTX. Amostras de pele de 10 controles não atópicos, pareados por sexo e idade, realizadas em local anatômico semelhante de pacientes com DA, foram utilizadas para padronizar as análises.

Todos os indivíduos leram o termo de consentimento livre e informado e concordaram em participar do estudo. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética local (CAPPEsq 13368); Identificador ClinicalTrial.gov NCT03327116.

### Espessura epidérmica média e imunohistoquímica

Amostras de pele de 4mm foram obtidas e incluídas em parafina para avaliação por imuno-histoquímica. DAB (3,3' diamibenzidina, D5637, Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi utilizado como solução cromógena, como descrito anteriormente.<sup>15,16</sup> Após a imunomarcagem, as lâminas foram escaneadas usando Panoramic Scan – 3Dhitech slide scanner (3Dhitech Ltd., Budapeste, Hungria).

As fotos foram avaliadas para marcações imuno-histoquímicas e espessura média da epiderme usando o programa Image-Pro Plus, versão 4.5.0.29 (Media Cybernetics Inc., Bethesda, Maryland, EUA).<sup>17</sup>

A espessura média da epiderme foi calculada traçando-se duas linhas: uma na parte superior da epiderme e outra na parte inferior da epiderme, seguindo a membrana basal. A distância média entre essas duas linhas foi obtida com a

**Tabela 1** Anticorpos utilizados para a análise imuno-histoquímica

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

DA, dermatite atópica.

função da distância média do programa Image-Pro-Plus. Essa função mede a distância ponto-a-ponto entre as duas linhas; a cada variação de ângulo, gera um valor médio e calcula a espessura média da epiderme.

Os anticorpos primários IL-31, IL-31RA, OSMR, TSLP e Ki-67 estão listados na [tabela 1](#).

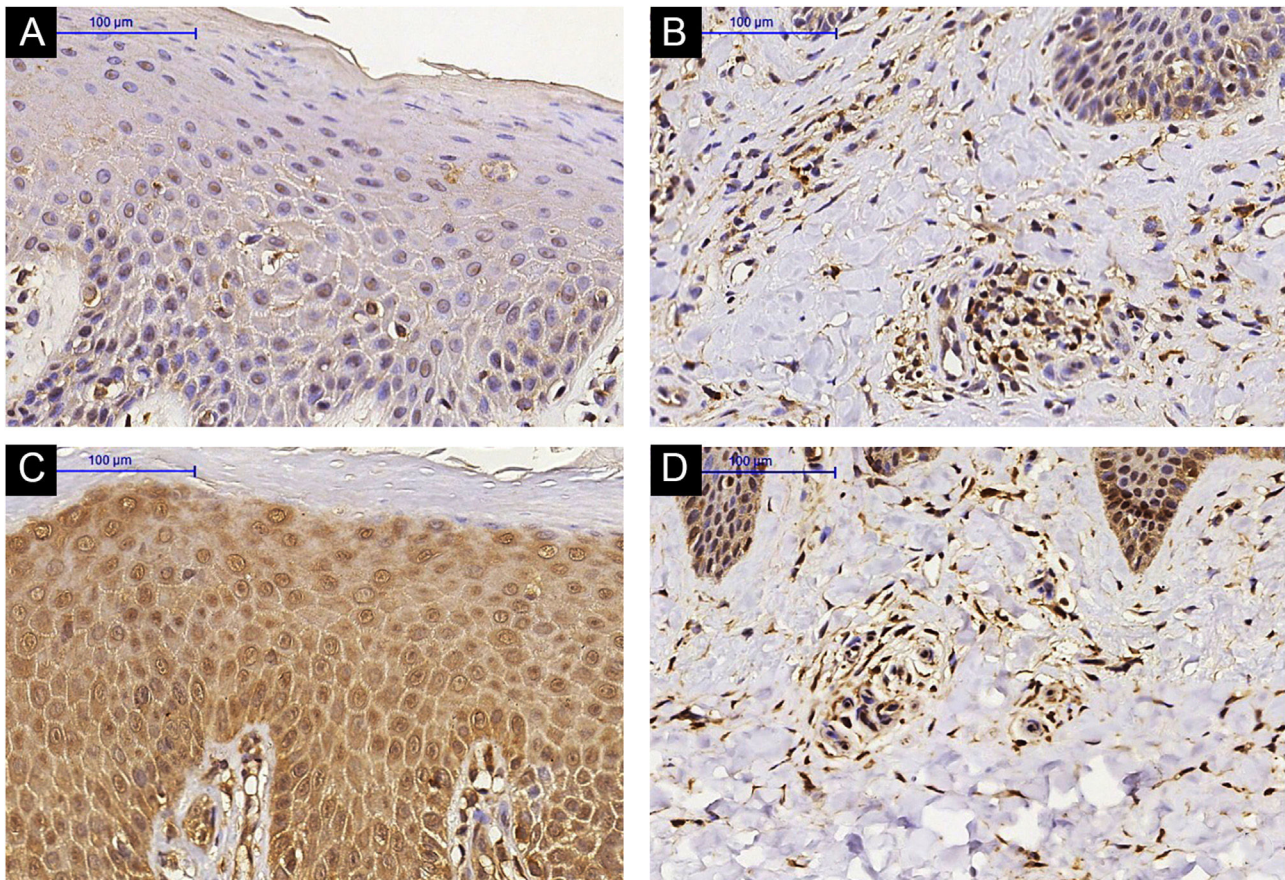
### PCR em tempo real

A expressão do mRNA por PCR em tempo real foi realizada utilizando amostras de pele que foram armazenadas em solução RNAlater (Sigma, Steinheim, Alemanha) e congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . O RNA total foi extraído utilizando um kit

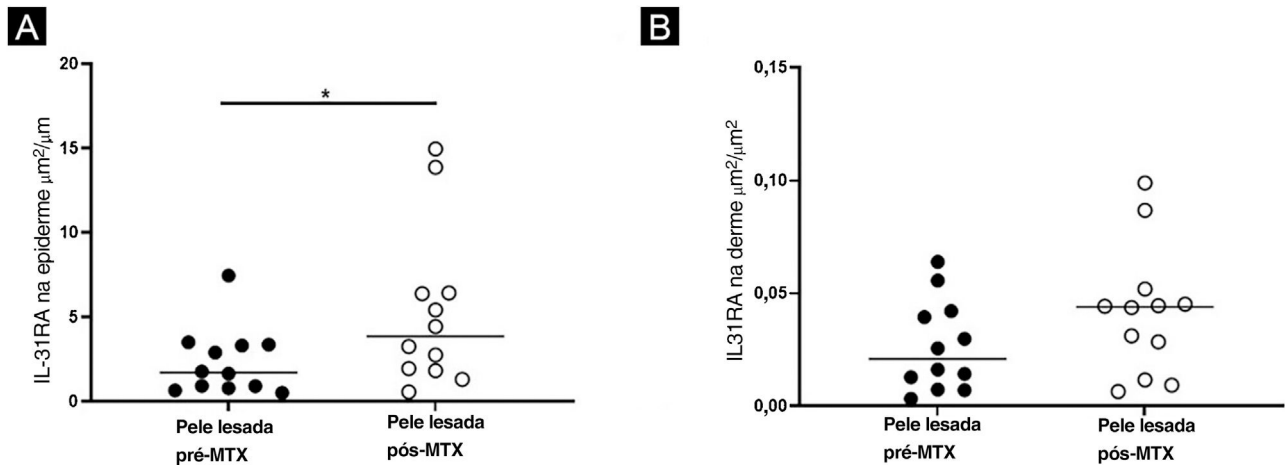
RNAeasy Plus Mini (Qiagen, Valencia, CA, EUA). O cDNA foi sintetizado utilizando o ISCRIP cDNA KIT (Bio-rad, Hercules, CA, EUA).

A síntese dos primers *sense* e *antisense* para IL-4, IL-6, IL-10, IL-31, IL-31RA, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TARC, CCL-22 e controles internos GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) foi realizada por Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA).<sup>15</sup>

A amplificação por PCR foi conduzida em um sistema Applied Biosystems 7500 usando os *primers* e reagentes de detecção por fluorescência SYBR Green (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA). O protocolo de ciclagem consistiu em 10 minutos a  $95^{\circ}\text{C}$ , seguidos de 40 ciclos de 15 segundos a  $95^{\circ}\text{C}$  e 60 segundos a  $60^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 1** Imuno-histoquímica de IL-31RA na pele lesada de um indivíduo com dermatite atópica (DA) na epiderme (A) e derme superficial (B). (A e B) Tratamento pré-metotrexato (MTX); pele lesada de indivíduo com DA, epiderme (C) e derme superficial (D). (C e D) Tratamento pós-MTX (ampliação de  $200\times$ ).



**Figura 2** Expressão de IL-31RA comparando a pele lesada antes e após o tratamento com MTX, demonstrando alteração estatisticamente significativa da expressão na epiderme (A) e sem diferença significativa na derme superficial (B). As linhas representam as medianas da citocina nas amostras (\* $p < 0,05$ ).

O *software* Sequence Detection System (SDS; Applied Biosystems) foi usado para analisar os resultados que foram normalizados.<sup>18</sup>

avaliados (IL-4, IL-6, IL-10, IL-31RA, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TARC e CCL-22) não apresentou resultados significantes (fig. 5).

### Análise estatística

A comparação entre amostras relacionadas (mesmo indivíduo, pré-tratamento vs. pós-tratamento) foi realizada utilizando o teste não paramétrico de Wilcoxon. Para amostras não relacionadas, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Um valor alfa de 0,05 foi utilizado em todas as amostras.

### Discussão

A DA é doença cutânea crônica pruriginosa comumente observada em crianças; entretanto, pode persistir ou ocorrer na idade adulta. A qualidade de vida é significativamente afetada.<sup>19,20</sup> O tratamento de primeira linha inclui corticosteroides tópicos e uso de emolientes. Em casos moderados a graves refratários ao tratamento convencional, medicamentos de segunda linha, como o MTX, podem ser utilizados.<sup>12,13</sup>

## Resultados

### Espessura média da epiderme

A espessura média da epiderme na pele lesada de indivíduos com DA antes do tratamento foi de  $127,6 \pm 194,3 \mu\text{m}$ . A espessura média da epiderme na pele lesada em indivíduos com DA após o tratamento com MTX foi de  $100,3 \pm 80,7 \mu\text{m}$ . A espessura média da epiderme foi significativamente menor na pele lesada pós-tratamento (diferença média =  $31,3 \mu\text{m}$ , IC 95%: 15,0–92,7;  $p = 0,021$ ).

Há poucos estudos avaliando o efeito do MTX nos mediadores inflamatórios cutâneos envolvidos em pacientes com DA. Schram et al. randomizaram adultos com DA para receber MTX ou azatioprina por 12 semanas e encontraram redução nos níveis séricos de TARC (quimiocina do timo regulada por ativação) em ambos os grupos.<sup>21</sup> Roekevisch et al. estudaram os efeitos de MTX e azatioprina em pacientes adultos com DA e observaram redução significativa em TARC, CTACK (quimiocina cutânea para atração de células T ou quimiocina [C-C motif] ligante 27 – CCL27), IL-13 e fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF).<sup>22</sup>

### Imuno-histoquímica

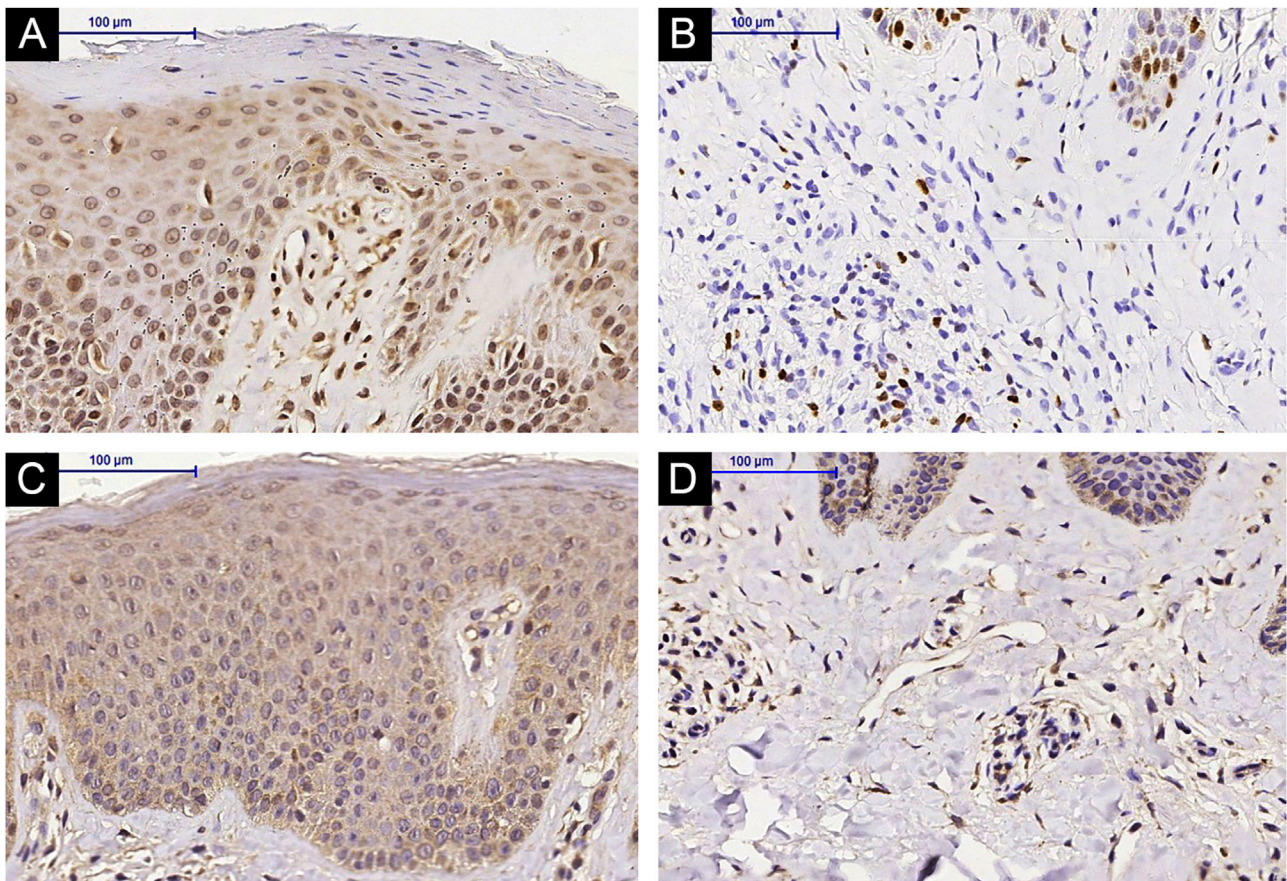
Houve aumento da expressão de IL-31RA na epiderme ( $p = 0,016$ ) de indivíduos com DA pós-tratamento com MTX e não foi observada nenhuma diferença significativa na derme superficial ( $p = 0,151$ ) – figuras 1 e 2. A expressão cutânea dos outros marcadores não revelou alterações significantes (figs. 3 e 4: IL-31; OSMR, TSLP e Ki-67).

Anteriormente, os autores demonstraram a eficácia do MTX na DA moderada/grave, encontrando redução nos escores de prurido e gravidade dos sintomas.<sup>14</sup> Aqui, os autores mostram que alterações cutâneas podem ser detectadas em indivíduos com DA que estão recebendo MTX. Também identificaram redução da espessura média da epiderme da pele com lesões de DA, aumento da expressão de IL-31RA por imuno-histoquímica e diminuição da expressão gênica de IL-31 por RT-PCR.

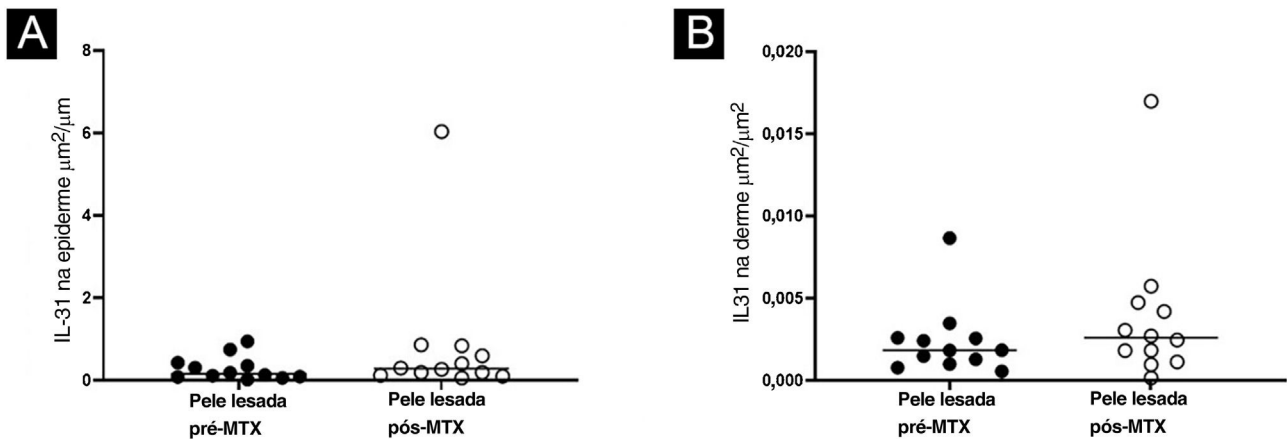
### PCR em tempo real

Houve diminuição na expressão gênica de IL-31 ( $p = 0,019$ ) na pele lesada de indivíduos com DA 24 semanas após a terapia com MTX. A expressão cutânea dos demais marcadores

A redução na espessura média da epiderme da pele lesada na DA não foi demonstrada anteriormente e pode estar associada à melhora dos sinais e sintomas (prurido) observada em pacientes com DA.<sup>14</sup> Resultados semelhantes foram relatados com outras modalidades de tratamento, incluindo fototerapia tópica (PUVA), *laser* excímero, crisaborol tópico e dupilumabe.<sup>23-26</sup>



**Figura 3** Imuno-histoquímica com IL-31 em pele lesada de indivíduo com dermatite atópica (DA) na epiderme (A) e derme superficial (B). (A e B) Tratamento pré-metotrexato (MTX); pele lesada de indivíduo com DA, epiderme (C) e derme superficial (D). (C e D) Tratamento pós-MTX (ampliação de 200 ×).

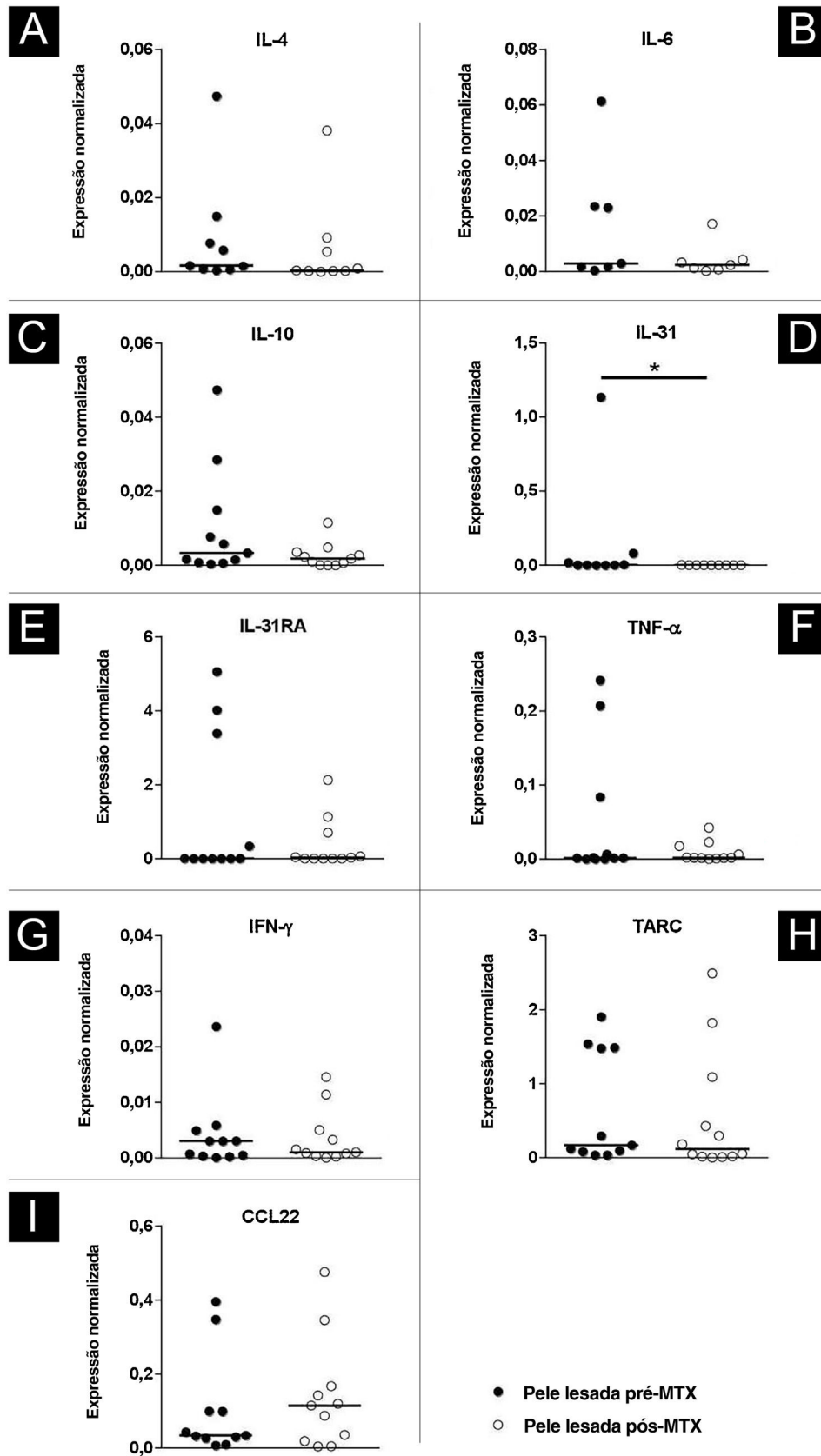


**Figura 4** Expressão de IL-31 comparando a pele lesada antes e após o tratamento com MTX, demonstrando alteração estatisticamente significativa da expressão na epiderme (A) e sem diferença significativa na derme superficial (B). As linhas representam as medianas da citocina nas amostras (\*p < 0,05).

A redução do prurido observada após o tratamento com MTX pode ser influenciada, em parte, pela redução da expressão gênica da IL-31. A IL-31 está envolvida na polarização imunológica para o perfil Th2 na fase aguda da DA, bem como no prurido de pacientes com DA.<sup>10,27,28</sup> A sinalização ocorre por meio de um receptor

heterodimérico. A subunidade IL-31RA parece desempenhar papel mais importante na patogênese da DA do que a subunidade OSMR.<sup>11,29,30</sup>

A identificação do aumento da expressão de IL-31RA na epiderme, evidenciada pela imuno-histoquímica, sugere mecanismo compensatório da IL-31RA, dada a redução da



**Figura 5** Perfil da expressão de IL-4 (A), IL-6 (B), IL-10 (C), IL-31(D), IL-31RA (E), TNF- $\alpha$  (F), IFN- $\gamma$  (G), TARC (H) e CCL22 (I) comparando a pele lesada de indivíduo com dermatite atópica (DA) pré-tratamento com metotrexato (MTX) e pós-tratamento com MTX utilizando PCR em tempo real. Houve diminuição estatisticamente significativa na expressão de IL-31 na pele lesada após o tratamento. A expressão normalizada foi calculada conforme descrito anteriormente.<sup>18</sup> As linhas representam as medianas das citocinas nas amostras de pele (\* $p < 0,05$ ).

expressão gênica de IL-31. A regulação positiva de IL-31RA pode ocorrer após alguns estímulos: Mike et al. demonstraram regulação positiva de IL-31RA após estimulação de IL-4 em células dendríticas derivadas da medula óssea de murinos.<sup>31</sup> Além disso, Edukulla et al. observaram que em camundongos IL-4 e IL-13 poderiam aumentar a expressão de IL-31RA em macrófagos da medula óssea e peritoneal.<sup>32</sup>

As limitações potenciais do presente estudo incluem o pequeno tamanho da amostra e duração limitada do seguimento. É possível que um estudo em larga escala com seguimento mais longo permitisse rastrear alterações na expressão cutânea de marcadores inflamatórios na DA em pacientes em uso de MTX. Novas terapias direcionadas em andamento e medicina de precisão podem melhorar o tratamento da DA,<sup>13</sup> aliviando o curso crônico e o estigma dessa doença recalcitrante e pruriginosa. Uma vez que o acesso a essas terapias direcionadas ainda é limitado, justifica-se a identificação do impacto imunológico das terapias disponíveis, como o MTX, para a DA.

## Conclusão

O MTX administrado a indivíduos com DA moderada/grave reduziu a hiperplasia epidérmica e alterou a expressão de citocinas e receptores inflamatórios relacionados ao prurido, incluindo IL-31 e IL-31RA.

## Suporte financeiro

Este estudo foi financiado pelo Fundo de Apoio à Dermatologia de São Paulo (23–2015).

## Contribuições dos autores

Luciana Paula Samorano: Revisão crítica da literatura; obtenção, análise e interpretação de dados; participação intelectual em conduta propedêutica e/ou terapêutica de casos estudados; elaboração e redação do manuscrito; análise estatística; concepção e planejamento do estudo.

Kelly Cristina Gomes Manfrere: Obtenção, análise e interpretação dos dados; participação efetiva na orientação da pesquisa.

Naiura Vieira Pereira: Obtenção, análise e interpretação dos dados; participação efetiva na orientação da pesquisa.

Roberto Takaoka: Obtenção, análise e interpretação de dados; participação efetiva na orientação da pesquisa.

Neusa Yuriko Sakai Valente: Obtenção, análise e interpretação dos dados; participação efetiva na orientação da pesquisa.

Mirian Nacagami Sotto: Obtenção, análise e interpretação dos dados; participação efetiva na orientação da pesquisa.

Luiz Fernando Ferraz Silva: Participação intelectual em conduta propedêutica e/ou terapêutica dos casos estudados; concepção e planejamento do estudo; participação efetiva na orientação da pesquisa.

Maria Notomi Sato: Obtenção, análise e interpretação dos dados; participação efetiva na orientação da pesquisa.

Valeria Aoki: Aprovação da versão final do manuscrito; revisão crítica da literatura; participação efetiva na

orientação da pesquisa; participação intelectual em conduta propedêutica e/ou terapêutica dos casos estudados; revisão crítica do manuscrito; concepção e planejamento do estudo.

## Conflito de interesses

Nenhum.

## Referências

1. Wollenberg A, Barbarot S, Bieber T, Christen-Zaech S, Deleuran M, Fink-Wagner A, et al. Consensus-based European guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) in adults and children: part I. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2018;32:657–82.
2. Aoki V, Lorenzini D, Orfali RL, Zaniboni MC, Oliveira ZNP, Rivitti-Machado MC, et al. Consensus on the therapeutic management of atopic dermatitis – Brazilian Society of Dermatology. *An Bras Dermatol*. 2019;94:67–75.
3. Batista DI, Perez L, Orfali RL, Zaniboni MC, Samorano LP, Pereira NV, et al. Profile of skin barrier proteins (filaggrin, claudins 1 and 4) and Th1/Th2/Th17 cytokines in adults with atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015;29:1091–5.
4. Niebuhr M, Scharonow H, Gathmann M, Mamerow D, Werfel T. Staphylococcal exotoxins are strong inducers of IL-22: A potential role in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126:1176–83, e4.
5. Gittler JK, Shemer A, Suarez-Farinas M, Fuentes-Duculan J, Gulewicz KJ, Wang CQ, et al. Progressive activation of T(H)2/T(H)22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130:1344–54.
6. Brunner PM, Israel A, Zhang N, Leonard A, Wen HC, Huynh T, et al. Early-onset pediatric atopic dermatitis is characterized by T(H)2/T(H)17/T(H)22-centered inflammation and lipid alterations. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141:2094–106.
7. Noda S, Suárez-Fariñas M, Ungar B, Kim SJ, Strong CG, Xu H, et al. The Asian atopic dermatitis phenotype combines features of atopic dermatitis and psoriasis with increased TH17 polarization. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136:1254–64.
8. Furue M, Chiba T, Tsuji G, Ulzii D, Kido-Nakahara M, Nakahara T, et al. Atopic dermatitis: immune deviation, barrier dysfunction, IgE autoreactivity and new therapies. *Allergol Int*. 2017;66:398–403.
9. Wilson SR, The L, Batia LM, Beattie K, Katibah GE, McClain SP, et al. The epithelial cell-derived atopic dermatitis cytokine TSLP activates neurons to induce itch. *Cell*. 2013;155:285–95.
10. Sonkoly E, Muller A, Lauerma AI, Pivarcsi A, Soto H, Kemeny L, et al. IL-31: a new link between T cells and pruritus in atopic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117:411–7.
11. Cevikbas F, Wang X, Akiyama T, Kempkes C, Savinko T, Antal A, et al. A sensory neuron-expressed IL-31 receptor mediates T helper cell-dependent itch: involvement of TRPV1 and TRPA1. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133:448–60.
12. Simpson EL, Bruin-Weller M, Flohr C, Ardern-Jones MR, Barbarot S, Deleuran M, et al. When does atopic dermatitis warrant systemic therapy? Recommendations from an expert panel of the International Eczema Council. *J Am Acad Dermatol*. 2017;77:623–33.
13. Werfel T, Heratizadeh A, Aberer W, Ahrens F, Augustin M, Biedermann T, et al. Update ‘‘Systemic treatment of atopic dermatitis’’ of the S2k-guideline on atopic dermatitis. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2021;19:151–68.
14. Samorano LP, Takaoka R, Zaniboni MC, Aoki V. Methotrexate for atopic dermatitis in adults: a prospective study from a reference center in Brazil. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2021;19:294–6.

15. Lima LPS. Effect of methotrexate on clinical manifestations and on the profile of cutaneous expression of cytokines and chemokines involved in the inflammatory response of adult atopic dermatitis [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2021.
16. Pagliari C, Fernandes ER, Stegun FW, da Silva WL, Seixas Duarte MI, Sotto MN. Paracoccidiodomycosis: cells expressing IL17 and Foxp3 in cutaneous and mucosal lesions. *Microb Pathog.* 2011;50:263-7.
17. Prasad K, Prabhu GK. Image analysis tools for evaluation of microscopic views of immunohistochemically stained specimen in medical research-a review. *J Med Syst.* 2012;36:2621-31.
18. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25:402-8.
19. Mortz CG, Andersen KE, Dellgren C, Barington T, Bindslev-Jensen C. Atopic dermatitis from adolescence to adulthood in the TOACS cohort: prevalence, persistence and comorbidities. *Allergy.* 2015;70:836-45.
20. Orfali RL, Shimizu MM, Takaoka R, Zaniboni MC, Ishizaki AS, Costa AA, et al. Atopic dermatitis in adults: clinical and epidemiological considerations. *Rev Assoc Med Bras.* 2013;59:270-5.
21. Schram ME, Roekevisch E, Leeftang MM, Bos JD, Schmitt J, Spuls PI. A randomized trial of methotrexate versus azathioprine for severe atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128:353-9.
22. Roekevisch E, Szegedi K, Hack DP, Schram ME, Res P, Bos JD, et al. Effect of immunosuppressive treatment on biomarkers in adult atopic dermatitis patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2020;34:1545-54.
23. Ogawa H, Yoshiike T. Atopic dermatitis: studies of skin permeability and effectiveness of topical PUVA treatment. *Pediatr Dermatol.* 1992;9:383-5.
24. Brenninkmeijer EE, Spuls PI, Lindeboom R, van der Wal AC, Bos JD, Wolkerstorfer A. Excimer laser vs. clobetasol propionate 0.05% ointment in prurigo form of atopic dermatitis: a randomized controlled trial, a pilot. *Br J Dermatol.* 2010;163:823-31.
25. Bissonnette R, Pavel AB, Diaz A, Werth JL, Zang C, Vranic I, et al. Crisaborole and atopic dermatitis skin biomarkers: An inpatient randomized trial. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;144:1274-89.
26. Guttman-Yassky E, Bissonnette R, Ungar B, Suárez-Fariñas M, Ardeleanu M, Esaki H, et al. Dupilumab progressively improves systemic and cutaneous abnormalities in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;143:155-72.
27. Feld M, Garcia R, Buddenkotte J, Katayama S, Lewis K, Muirhead G, et al. The pruritus- and TH2-associated cytokine IL-31 promotes growth of sensory nerves. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;138:500-8, e24.
28. Furue M, Yamamura K, Kido-Nakahara M, Nakahara T, Fukui Y. Emerging role of interleukin-31 and interleukin-31 receptor in pruritus in atopic dermatitis. *Allergy.* 2018;73:29-36.
29. Bilsborough J, Leung DY, Maurer M, Howell M, Boguniewicz M, Yao L, et al. IL-31 is associated with cutaneous lymphocyte antigen-positive skin homing T-cells in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117:418-25.
30. Nobbe S, Dziunycz P, Muhleisen B, Bilsborough J, Dillon SR, French LE, et al. IL-31 expression by inflammatory cells is preferentially elevated in atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol.* 2012;92:24-8.
31. Miake S, Tsuji G, Takemura M, Hashimoto-Hachiya A, Vu YH, Furue M, et al. IL-4 augments IL-31/IL-31 receptor alpha interaction leading to enhanced Ccl 17 and Ccl 22 production in dendritic cells: implications for atopic dermatitis. *Int J Mol Sci.* 2019;20:4053.
32. Edukulla R, Singh B, Jegga AG, Sontake V, Dillon SR, Madala SK. Th2 cytokines augment IL-31/IL-31RA interactions via STAT6-dependent IL-31RA expression. *J Biol Chem.* 2015;290:13510-20.