

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

MARIANA CARVALHO COSTA

MONÓCITOS E MARCADORES INFLAMATÓRIOS

EM PACIENTES COM PSORÍASE VULGAR:

Um estudo comparativo entre amostras sanguíneas e cutâneas e sobre correlações com a gravidade da doença e entre os parâmetros inflamatórios avaliados

BRASÍLIA

2018

MARIANA CARVALHO COSTA

MONÓCITOS E MARCADORES INFLAMATÓRIOS

EM PACIENTES COM PSORÍASE VULGAR:

Um estudo comparativo entre amostras sanguíneas e cutâneas e sobre correlações com a gravidade da doença e entre os parâmetros inflamatórios avaliados

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília para obtenção do título de Doutora em Medicina

Área de concentração: Medicina

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Licia Maria Henrique da Mota

BRASÍLIA

12 de dezembro de 2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Assinatura: _____ Data: ___/___/___

Catálogo na Publicação (CIP)

Biblioteca: Universidade de Brasília

Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília

Costa, Mariana Carvalho.

CM333m

MONÓCITOS E MARCADORES INFLAMATÓRIOS EM
PACIENTES COM PSORÍASE VULGAR; / Mariana
Carvalho Costa; orientador Lícia Maria Henrique da Mota. --
Brasília, 2018.
102 p.

Tese (Doutorado em Ciências Médicas)
Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, 2018.

1. Psoríase. 2. Monócitos 3. Marcadores inflamatório. I.
Mota, Lícia Maria Henrique, orient. II. Título

Aluna: Mariana Carvalho Costa

Título – MONÓCITOS E MARCADORES INFLAMATÓRIOS EM PACIENTES COM PSORÍASE VULGAR: um estudo comparativo entre amostras sanguíneas e cutâneas e sobre correlações com a gravidade da doença e entre os parâmetros inflamatórios avaliados

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília para obtenção do título de Doutora em Medicina

Aprovado em: ___/___/___

Banca Examinadora

Presidente:

Prof^a. Dr^a. Licia Maria Henrique da Mota (orientadora) Instituição: FM – UnB

Assinatura: _____

Membros:

Prof. Dr. Leopoldo Luis dos Santos Neto Instituição: FM – UnB

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dra. Carmem Dea Ribeiro de Paula Instituição: FUB - UnB

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Ricardo Romiti Instituição: FM - USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

À Luísa, minha filha, que também é a estrela mais brilhante, a felicidade imensurável com a qual eu sonhava sem saber, o aprendizado mais puro e divino que poderia receber.

Ao Marcus, meu companheiro de vida, com quem divido minhas angústias humanas e replico minhas alegrias e com quem almejo prosseguir eternamente.

À minha mãe Izelda, a fonte primeira de inspiração na carreira médica e acadêmica, influência inegável e inevitável por sua força tamanha, e sempre, ao lado da minha querida (fada) madrinha Luzia, figura apoiadora deste sonho.

Às minhas irmãs, Juliana e Luciana, ao meu pai Magno, a minha avó Hermínia e a minha doce afilhada Pilar, por serem parte indissociável da minha vida nesta jornada humana, ora me brindando com alegrias, ora me trazendo grandes aprendizados.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Licia M. Henrique da Mota, com quem tracei este sonho anos antes de realizá-lo, quem me aceitou como aluna com confiança irrestrita e incentivo perene, quem sempre soube ser suave e exigente em proporções perfeitas, quem soube ser exemplo e também conforto nesta caminhada desafiadora.

Ao Prof. Lucas P. Carvalho, pela extrema competência e disponibilidade, mas acima de tudo pela compreensão da distância física e pela convivência invariavelmente leve e feliz, o que tornou este percurso menos penoso e, sem dúvida, mais alegre.

Ao Prof. Edgar M. Carvalho, quem me abriu as portas neste campo de estudos e quem me acolheu em momentos pessoais delicados, me fazendo entender por meio de suas posturas e atitudes que um grande profissional de verdade só existe onde também coabita uma grande alma.

Ao amigo, “filho” e “irmão” Dr. Bruno Rocha, com quem há um bom tempo divido meus sonhos profissionais e pessoais. Aliás, quem não apenas escuta estes sonhos, mas faz parte da sua realização. Este projeto, em especial, não aconteceria sem a sua amizade e parceria.

Aos amigos, em especial Juliana Marques, Rafaela Oliveira, Álvaro Alaor e Grace Pauli, pelas risadas, pelas confidências e por torcerem de forma sincera e leal por este e outros sonhos.

À equipe do Serviço de Dermatologia da UFBA, em especial os colegas dermatologistas Gleison Duarte, Ivonise Follador, Vitoria Rego e Fátima Paim, esta última a grande incentivadora deste projeto.

À equipe do Serviço de Dermatologia da UnB, em especial Dra. Gladys Martins e Dra. Patrícia Shu, que me receberam no ambulatório de psoríase do Hospital Universitário de Brasília, com quem aprendo e divido experiências e que compreenderam meu período de ausência para a conclusão deste projeto.

À equipe do Serviço de Imunologia da UFBA, em especial os pesquisadores de bancada Camilla Paixão e Jessé Alves, que contribuíram e fizeram parte deste projeto no processamento do material e primeiras análises.

Aos guias espirituais e entidades protetoras, seres de luz que me guiam, orientam e protegem em todas as áreas desta vida, em especial São Miguel Arcanjo, Nossa Senhora das Graças, Nossa Senhora de Fátima, Pai Ogum e Mamãe Oxum.

Por fim, aos pacientes e voluntários que acreditaram neste projeto a ponto de permitirem a coleta de amostras sanguíneas e cutâneas e que, mesmo frente ao próprio sofrimento ou de seu semelhante, tiveram a generosidade de contribuir com este estudo.

“This skin is me, I can’t get out”

—John Updike¹,

From the Journal of a Leper

The New Yorker, 1976

¹ Autor americano (1932-2009), ganhador do prêmio Pulitzer (1982, 1991), portador de psoríase desde os 6 anos de idade.

RESUMO

Introdução – Há ainda lacunas no tocante ao completo entendimento da imunopatogênese da psoríase. Os monócitos ditos “inflamatórios”, que mostraram seus níveis aumentados em condições patológicas diversas, foram pouco avaliados na psoríase e com estudos restritos à análise sanguínea. Da mesma forma, marcadores de ativação monocítica foram escassamente pesquisados nestes pacientes. Ademais, é rara a análise, em nível sérico e cutâneo simultaneamente, das principais citocinas e quimiocinas envolvidas na psoríase. Tampouco se correlacionou estes parâmetros inflamatórios com a gravidade da doença e se pesquisou sobre possíveis inter-relações dos mesmos entre si. A partir destas ideias, elaborou-se o presente projeto, sem precedentes ao realizar coletas sanguíneas e cutâneas simultâneas, para o estudo tanto de subpopulações de monócitos como de biomarcadores inflamatórios, com adicionais pesquisas da correlação destes achados com a gravidade da doença e da inter-relação entre os parâmetros inflamatórios. **Metodologia** – Estudo transversal do qual participaram 32 pacientes portadores de psoríase vulgar em atividade e 32 indivíduos saudáveis. Foram coletados 15 ml de sangue periférico e fragmentos cutâneos (das lesões de psoríase dos pacientes e da pele normal dos controles) obtidos por biópsia por *punch*. A gravidade da psoríase foi avaliada através de aplicação do Índice de Gravidade e Área da Psoríase (PASI). Todas as amostras foram processadas conforme protocolos laboratoriais recomendados. Nas análises estatísticas, para variáveis contínuas, utilizou-se o teste t de Student (distribuição gaussiana) e o de Mann-Whitney (distribuição não gaussiana). Para as variáveis qualitativas, elegeu-se o teste de qui-quadrado. Para pesquisa de correlação entre variáveis quantitativas, elegeu-se o coeficiente de correlação de Spearman. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor de “p” foi menor que 0,05. **Resultados** – Na análise das subpopulações de monócitos, não houve diferença estatística entre pacientes e controles, tanto em nível sanguíneo quanto cutâneo. A frequência dos monócitos não clássicos no sangue periférico se correlacionou positivamente com os pacientes de PASI 10-20 ($r = 0,81467$ e $p = 0,0073$) e a expressão de CCL2 das lesões cutâneas. Os marcadores de ativação monocítica CD14s e CD163s no soro apresentaram maior expressão nos pacientes ($p = 0,0113$ e $p < 0,0001$, respectivamente). A expressão de CD14s no soro se correlacionou positivamente com a de CD14s nas lesões de pele ($r = 0,89925$ e $p < 0,0001$). Quanto às expressões das citocinas avaliadas, a de IL-17 (soro) apresentou correlação positiva com a expressão de CX3CL1 (soro) ($r = 0,43450$ e $p = 0,0492$); a de IL-1beta (pele) foi maior em pacientes ($p = 0,0089$); a de TNF (soro) apresentou correlação positiva com a expressão de CX3CL1 (soro) ($r = 0,45674$ e $p = 0,0496$); a de TNF (pele) foi maior nos pacientes ($p < 0,0001$); a de IFN (pele) apresentou correlação positiva com os pacientes de PASI > 20 ($r = 0,81743$ e $p = 0,0148$). Quanto às expressões das quimiocinas avaliadas, a de CCL2 (soro) apresentou correlação positiva com pacientes de PASI 10-20 ($r = 0,80168$ e $p = 0,0094$) e a de CCL2 (pele) apresentou correlação positiva com pacientes de PASI < 10 ($r = 0,64813$ e $p = 0,0161$). A de CXCL9 (soro) foi maior em pacientes ($p = 0,0453$) e se correlacionou positivamente com a expressão de IL-17 (soro) ($r = 0,49239$ e $p = 0,0192$) e de CX3CL1 (soro) ($r = 0,52571$ e $p = 0,0203$). A de CXCL9 (pele) foi maior nos pacientes ($p = 0,0002$) e apresentou correlação positiva com: IL-17 (soro) ($r = 0,88244$ e $p < 0,0001$), TNF (soro) ($r = 0,83157$ e $p < 0,0001$), IFN (pele) ($r = 0,41550$ e $p = 0,0486$) e CX3CL1 (soro) ($r = 0,57658$ e $p = 0,0044$). A de CX3CL1 (soro) apresentou correlação positiva com pacientes de PASI > 20 ($r = 0,96944$ e $p = 0,0247$). **Conclusão** – As subpopulações de monócitos inflamatórios, a despeito de outras condições patológicas, não se mostraram aumentadas nas amostras sanguíneas e cutâneas de pacientes. Por outro lado, os marcadores de ativação monocítica (CD14 s e CD163s), ainda pouco estudados na psoríase,

podem ser promissores biomarcadores da doença. Algumas citocinas e quimiocinas – INF, CCL2 e CX3CL1 – se correlacionaram positivamente com a gravidade da doença, podendo ser potenciais biomarcadores no acompanhamento dos pacientes. A expressão de CXCL9, comparativamente maior nos pacientes tanto em nível sérico quanto cutâneo, apresentou o maior número de inter-relações com outros parâmetros inflamatórios e pode vir a ser um biomarcador superior aos demais avaliados.

Palavras-chave: psoríase; monócitos; biomarcadores.

ABSTRACT

Introduction - There are still gaps in the full understanding of psoriasis immunopathogenesis. Inflammatory monocytes, that showed increased levels in diverse pathological conditions, were poorly evaluated in psoriasis and the studies were restricted to blood analysis. Similarly, monocytic activation markers were scarcely assessed in these patients. In addition, the main cytokines and chemokines involved in psoriasis were rarely analyzed at serum and cutaneous levels simultaneously. Nor were these parameters correlated to disease severity and the interrelations between them were investigated. Based on that, the present project was developed for the study of both subpopulations of monocytes and inflammatory biomarkers, unprecedentedly collecting simultaneous blood and cutaneous samples, additionally evaluating the correlation with disease severity and the interrelation between these inflammatory parameters.

Methodology - A cross-sectional study involving 32 patients with active psoriasis and 32 healthy individuals was performed. Fifteen milliliters of peripheral blood and cutaneous fragments (from patients' psoriatic lesions and from the normal skin of controls) obtained from punch biopsy were collected. The severity of psoriasis was assessed using the Psoriasis Area and Severity Index (PASI). All samples were processed according to recommended laboratorial protocols. Statistical analyzes were performed using Student's t-test (Gaussian distribution) and Mann-Whitney test (non-Gaussian distribution). For the qualitative variables, the chi-square test was chosen. To evaluate the correlation between quantitative variables, the Spearman correlation coefficient was opted. The differences were considered statistically significant when the "p" value was lower than 0.05.

Results - About the analysis of monocyte subpopulations, there was no statistical difference between patients and controls, at both blood and cutaneous levels. The frequency of non-classical monocytes in peripheral blood was positively correlated with PASI 10-20 patients ($r = 0.81467$ and $p = 0.0073$) and with CCL2 expression of cutaneous lesions. Seric monocyte activation markers CD14s and CD163s showed higher expression in patients ($p = 0.0113$ and $p < 0.0001$, respectively). Seric expression of CD14s was positively correlated with CD14s from skin lesions ($r = 0.89925$ and $p < 0.0001$). Regarding the expression of the evaluated cytokines, seric IL-17 showed a positive correlation with seric CX3CL1 ($r = 0.43450$ and $p = 0.0492$); cutaneous IL-1beta was higher in patients ($p = 0.0089$); seric TNF showed positive correlation with seric CX3CL1 ($r = 0.45674$ and $p = 0.0496$); cutaneous TNF was higher in patients ($p < 0.0001$); cutaneous presented a positive correlation with PASI > 20 patients ($r = 0.81743$ and $p = 0.0148$). Regarding chemokine expression, seric CCL2 presented positive correlation with PASI 10-20 patients ($r = 0.80168$ and $p = 0.0094$) and cutaneous CCL2 presented positive correlation with PASI < 10 patients ($r = 0.64813$ and $p = 0.0161$). Seric CXCL9 was higher in patients ($p = 0.0453$) and positively correlated with seric IL-17 and CX3CL1 ($r = 0.499239$ and $p = 0.0192$, $r = 0.52571$ and $p = 0.0203$, respectively). CXCL9 from skin was higher in the patients ($p = 0.0002$) and presented positive correlation with: seric IL-17 ($r = 0.88244$ and $p < 0.0001$), seric TNF ($r = 0.83155$ and $p < 0.0001$), cutaneous IFN ($r = 0.41550$ and $p = 0.0486$) and seric CX3CL1 ($r = 0.57658$ and $p = 0.0044$). Seric CX3CL1 presented positive correlation with PASI > 20 patients ($r = 0.96944$ and $p = 0.0247$).

Conclusions - Subpopulations of inflammatory monocytes, despite other pathological conditions, were not shown to be increased in the blood and cutaneous samples of psoriatic patients. On the other hand, monocyte activation markers (CD14 s and CD163s), still poorly studied in psoriasis, may be promising biomarkers of the disease. Some cytokines and chemokines - INF, CCL2 and CX3CL1 - correlated positively with disease severity and may be potential biomarkers for patient's follow-up. The expression of CXCL9, which was higher in patients at both serum and cutaneous levels, presented the highest number of interrelations

with other inflammatory parameters and might be a superior biomarker in relation to the others evaluated.

Keywords: psoriasis; monocytes; biomarkers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Paciente portador de psoríase vulgar atendido no Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, da Universidade Federal da Bahia (2014). Placas eritematodescamativas, com distribuição simétrica. O paciente apresentava associadamente obesidade central e transtorno de humor.	18
Figura 2 – Autorretrato do artista plástico Mc Willie Chambers, portador de psoríase.	19
Figura 3 – Resposta imune inata e adaptativa na psoríase.	21
Figura 4 – Ilustração sobre a imunopatogênese da psoríase.	23
Figura 5 – Esquema ilustrativo da distribuição das subpopulações de monócitos em condições fisiológicas (balança à esquerda) e em condições inflamatórias (balança à direita).	25
Figura 6 – Coleta de amostra de sangue periférico (à direita) e de pele por “punch” (à esquerda).	34
Figura 7A – Análise por citometria de fluxo de amostra representativa de um paciente do estudo, no sangue periférico, mostrando aumento das subpopulações “inflamatórias”.	40
Figura 7B – Análise por citometria de fluxo de amostra representativa de um paciente do estudo, na amostra de lesão cutânea, sem diferença nas subpopulações de monócitos.	40
Figura 8 – Achados positivos quanto a subpopulações de monócitos e marcadores de ativação monocítica no presente estudo.	74
Figura 9 – Achados positivos quanto a quimiocinas no presente estudo.	75
Figura 10 – Achados positivos quanto a citocinas no presente estudo.	77
Gráfico 1 – Frequências das subpopulações de monócitos na amostra de sangue periférico de pacientes x controles, sem diferença estatística significativa.	42
Gráfico 2 – Frequências das subpopulações de monócitos na amostra cutânea de pacientes x controles, sem diferença estatística significativa.	43
Gráfico 3 – Expressão de IL-1 beta nas lesões cutâneas de pacientes (grupo paciente) x na pele normal de indivíduos saudáveis (grupo controle), com diferença estatística significativa.	48
Gráfico 4 – Expressão de TNF nas lesões cutâneas de pacientes (grupo paciente) x na pele normal de indivíduos saudáveis (grupo controle), com diferença estatística significativa.	49

Gráfico 5 – Expressão de CXCL9 nas lesões cutâneas de pacientes (grupo paciente) x na pele normal de indivíduos saudáveis (grupo controle), com diferença estatística significativa.	50
Gráfico 6 – Expressão de CXCL9 no soro de pacientes (grupo paciente) x de indivíduos saudáveis (grupo controle), com diferença estatística significativa.	50
Gráfico 7 – Expressão de CD14s no soro de pacientes (grupo paciente) x de indivíduos saudáveis (grupo controle), com diferença estatística significativa.	51
Gráfico 8 – Expressão de CD163s no soro de pacientes (grupo paciente) x de indivíduos saudáveis (grupo controle), com diferença estatística significativa.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição de sexo e idade dos pacientes e controles do estudo.	38
Tabela 2 – Médias do PASI e do tempo de doença apresentadas pelos pacientes do estudo.	39
Tabela 3 – Distribuição dos pacientes estudados de acordo com os valores do PASI apresentados.	39
Tabela 4 – Média das frequências de subpopulações de monócitos, em nível de sangue periférico e cutâneos, nos indivíduos saudáveis (controles) e pacientes do estudo.	42
Tabela 5 – Correlação entre as frequências de subpopulações de monócitos e o PASI, em nível de sangue periférico e cutâneos.	44
Tabela 6 – Correlação entre as frequências de subpopulações de monócitos e o PASI < 10, em nível de sangue periférico e cutâneos.	45
Tabela 7 – Correlação entre as frequências de subpopulações de monócitos e o PASI entre 10 e 20, em nível de sangue periférico e cutâneos.	46
Tabela 8 – Correlação entre as frequências de subpopulações de monócitos e o PASI > 20, em nível de sangue periférico e cutâneos.	47
Tabela 9 – Valores médios da expressão das citocinas nos grupos controles x pacientes, em nível sérico e cutâneo.	48
Tabela 10 – Valores médios da expressão das quimiocinas nos grupos controles x pacientes, em nível sérico e cutâneo.	49
Tabela 11 – Valores médios da expressão dos marcadores de ativação monocítica nos grupos controles x pacientes, em nível sérico e cutâneo.	51
Tabela 12 – Correlação entre a expressão de citocinas, quimiocinas e marcadores de ativação monocítica, em nível sérico e cutâneo e o PASI.	52
Tabela 13 – Correlação entre a expressão de citocinas, quimiocinas e marcadores de ativação monocítica, em nível sérico e cutâneo e o PASI < 10,	54
Tabela 14 – Correlação entre a expressão de citocinas, quimiocinas e marcadores de ativação monocítica, em nível sérico e cutâneo e o PASI entre 10 a 20, ..	55
Tabela 15 – Correlação entre a expressão de citocinas, quimiocinas e marcadores de ativação monocítica, em nível sérico e cutâneo e o PASI > 20,	57
Tabela 16 – Parâmetros inflamatórios que apresentaram correlação positiva entre si nas amostras séricas e cutâneas dos pacientes.	60
Tabela 17 – Achados observados no estudo quanto às subpopulações de monócitos e aos marcadores de ativação monocítica.	61
Tabela 18 – Achados observados no estudo quanto às citocinas e quimiocinas.	61

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	A doença psoriásica: uma visão geral.....	17
1.2	Patogênese da psoríase.....	21
1.3	As subpopulações de monócitos: ainda poucos estudos na psoríase.....	24
1.4	Expressão de quimiocinas e de marcadores de ativação monocítica na psoríase	26
1.5	O PASI como medida para aferição gravidade clínica da psoríase.....	27
1.6	Um estudo que contemple as lacunas dos anteriores.....	29
2	JUSTIFICATIVA	30
3	OBJETIVOS	31
3.1	Principal	31
3.2	Secundários	31
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1	Tipo de estudo e população estudada	32
4.2	Local de realização do estudo e comitê de ética	32
4.3	Cálculo amostral e coleta das amostras	33
4.4	Processamento da amostra do sangue periférico.....	34
4.4.1	Separação de células mononucleares do sangue periférico	34
4.5	Processamento da amostra cutânea.....	34
4.6	Marcação de superfície celular para FACS (“separação de célula pela atividade de fluorescência”).....	35
4.7	Dosagem dos níveis de citocinas e quimiocinas	36
4.8	Análises estatísticas	36
5	RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
5.1	Dados epidemiológicos da amostra estudada.....	38
5.2	Frequências das subpopulações de monócitos na amostra estudada	39
5.3	Correlação entre a frequências das subpopulações de monócitos na população estudada e a gravidade da doença aferida pelo PASI	43
5.4	Expressão das citocinas nos pacientes e controles	47
5.5	Expressão das quimiocinas nos pacientes e controles	49
5.6	Expressão dos marcadores de ativação monocítica nos pacientes e controles.....	50
5.7	Correlação entre a expressão de citocinas, quimiocinas e marcadores de ativação monocítica e a gravidade da doença aferida pelo PASI.....	52

5.8	Correlações adicionais entre todos os parâmetros inflamatórios	59
5.9	Resumo dos achados positivos do estudo	60
6	DISCUSSÃO	64
6.1	Sobre os dados epidemiológicos das amostras.....	64
6.2	Sobre as limitações do presente estudo: possíveis implicações e repercussões nos resultados	64
6.3	Sobre os achados referentes as subpopulações de monócitos nas amostras sanguíneas e cutâneas: comparação entre pacientes e controles e correlação com a gravidade da doença	65
6.4	Sobre os achados referentes as expressões de citocinas, quimiocinas e marcadores de ativação de monócitos nas amostras sanguíneas e cutâneas: comparação entre pacientes e controles e correlação com a gravidade da doença.....	67
6.5	Sobre as inter-relações entre todos os parâmetros inflamatórios estudados	73
6.6	Sobre todos os achados positivos do estudo	74
7	CONCLUSÃO.....	78
	REFERÊNCIAS.....	80
	ANEXOS	90
	Anexo 1 – PASI.....	90
	Anexo 2 – Ficha para coleta de dados	91
	Anexo 3 – Termo de consentimento livre e esclarecido	92
	Anexo 4 – Número de pacientes e controles avaliados por parâmetro inflamatório.....	93
	Anexo 5 – Tabela completa das correlações pesquisada entre todos os marcadores inflamatórios avaliados neste estudo.	94
	Anexo 6 – Artigos publicados e/ou submetidos até o momento	101

1 INTRODUÇÃO

1.1 A doença psoriásica: uma visão geral

A psoríase, do grego “psora” (prurido), é uma doença inflamatória imunomediada(1), de curso crônico, que se manifesta por acometimento da pele e/ou das articulações e afeta aproximadamente 2-3% dos adultos no mundo, embora este valor varie de acordo com a população estudada: é considerada muito rara ou ausente em povos ameríndios, rara em orientais, mas nos EUA atinge 2,5% da população e, na Noruega, 4,8%. No Brasil, estima-se que a prevalência seja de 1,3%(2). Não há predileção por sexo ou idade – embora seja relatado dois picos de incidência: um na juventude (16-22 anos) e outro mais próximo à senilidade (60 anos) (3)(4)(5). Na pele, a apresentação mais comum é a psoríase vulgar (FIGURA 1), também denominada psoríase em placas, caracterizada por pápulas e placas eritematosas, escamosas, infiltradas, bem delimitadas, de extensões diversas e distribuídas simetricamente, associadas a prurido variável(6)(7).

A doença foi, até meados do século XVIII, agrupada junto à hanseníase(4), sendo seus portadores alvo de grande estigma e marginalização, embora estes sejam obstáculos ainda hoje enfrentados, em diferentes graus, pelos doentes. O médico inglês Robert William (1757-1812), um dos fundadores da Dermatologia como especialidade médica, foi quem inicialmente tentou distingui-la da lepra em uma época em que predominavam nomenclaturas confusas como *lepra graecorum* e *psora leprosa*. Ferdinand Von Hebra, grande dermatologista vienense, após trabalhar sobre as anotações de Robert Willian, em 1841, designou o termo “psoríase”, separando estas dermatoses em definitivo(3)(5).

Figura 1 – Paciente portador de psoríase vulgar atendido no Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, da Universidade Federal da Bahia (2014). Placas eritematodescamativas, com distribuição simétrica. O paciente apresentava associadamente obesidade central e transtorno de humor.



Fonte: arquivo pessoal da aluna

Além da manifestação cutânea, cerca de 20-30% dos pacientes com psoríase desenvolvem a forma artropática em algum momento da vida, que pode resultar em deformidades irreversíveis(5). Tanto a doença cutânea como a artropática interferem dramaticamente na qualidade de vida dos pacientes(8), trazendo grande isolamento social, afastando-os muitas vezes de suas atividades laborativas, desportivas, familiares e interpessoais (FIGURA 2). Além disso, nos últimos anos, a psoríase tem sido considerada como um distúrbio inflamatório sistêmico associado a doenças cardiometabólicas, gastrointestinais e renais, infecções e transtornos de humor.(9)

Figura 2 – Autorretrato do artista plástico Mc Willie Chambers, portador de psoríase.²



Fonte: <http://mcwilliechambers.com/>

A psoríase é considerada uma doença multifatorial na qual acontece uma associação genética (poligênica) com fatores externos desencadeadores como trauma físico, estresse emocional, infecções, obesidade, tabagismo e uso de drogas tais como beta-bloqueadores, lítio, indometacina, tetraciclina e antimaláricos(10)(11). A influência hereditária empiricamente observada há séculos foi comprovada em um estudo sueco com mais de 3.000 famílias(12), que demonstrou que o risco de uma criança desenvolver psoríase seria de 65% se ambos os pais apresentassem a doença; 28% se apenas um dos pais apresentasse e 4% se nenhum parente apresentasse. O gene PSORS1 (HLA-Cw6) é o principal gene marcador de risco para a doença e tem sido implicado com formas relacionadas à hereditariedade, início mais precoce (antes dos 40 anos) e maior gravidade da doença. A homozigose para este alelo tem sido relacionada a melhor prognóstico nos pacientes psoriásicos com história de infecção estreptocócica na orofaringe após serem submetidos à tonsilectomia.(13) Fora da região do complexo principal de histocompatibilidade, estudos de associação genômica identificaram mais de 60 variantes de genes comuns associadas à psoríase, as quais exerceriam apenas efeitos

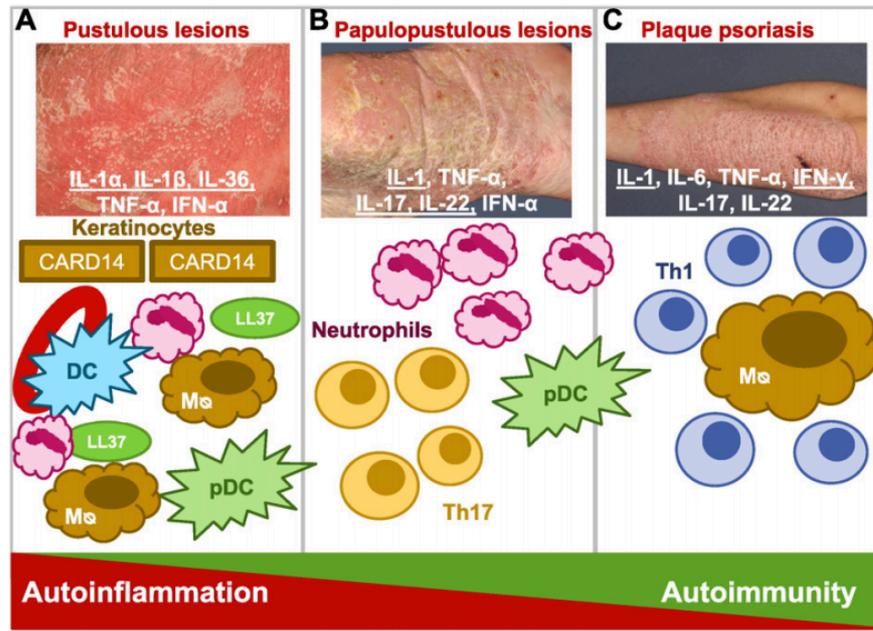
² Em entrevista conduzida por Darwin Cyphers Manning em 2009, o artista americano, nascido em 1951, relata: “Psoriasis is a very isolating condition. I realize that these paintings of men I have been doing for the last 20 years are a real search for companionship” / “A psoríase é uma condição muito isoladora. Percebo que aquelas pinturas de homens que eu tenho feito nos últimos 20 anos são na verdade uma busca por companhia”.

individuais modestos e estariam relacionadas principalmente à ativação imune inata e à via IL-23 / Th17.(14)

Na pele psoriásica, encontram-se componentes tanto da resposta imune inata quanto da adaptativa. Acredita-se, inclusive, que a resposta imune adaptativa predomine nas formas crônicas em placas (psoríase vulgar) e que a resposta imune inata, nas formas pustulosas(15). As demais apresentações clínicas da doença estariam no espectro entre estes dois polos. Na verdade, a psoríase tem sido considerada como uma doença de caráter peculiar, na qual ambas as respostas auto-inflamatórias e auto-ímmunes coexistam e que, a depender do desbalanço entre elas, surgiria determinada forma clínica.(16) Postula-se que nos estágios iniciais da doença ou naqueles de alta atividade nos quais alguns pacientes exibem lesões pustulosas, haveria predominância de infiltrados de células ímmunes do mecanismo de resposta inata como neutrófilos, células dendríticas (DC) e macrófagos/monócitos (M ϕ) (FIGURA3). Nas lesões papulopustulosas, células do sistema ímmune adaptativo, principalmente células Th17, passam a infiltrar a pele e a expressão de citocinas efetoras de células T desempenha um papel mais predominante. Na psoríase em placas, por sua vez, as células Th1 constituem o infiltrado celular predominante. Ainda no sentido de se reforçar esta interação entre respostas inata e adaptativa, um estudo com pacientes portadores de psoríase vulgar tratados

com anticorpos anti-IL-17A (interleucina relacionada à resposta Th17) mostrou redução do número de neutrófilos e microabscessos epidérmicos nas amostras cutâneas coletadas antes e após tratamento(17).

Figura 3 – Resposta imune inata e adaptativa na psoríase.



Fonte: “Shaping the spectrum - from autoinflammation to autoimmunity. In: Hedrich CM. Clin Immunol. 2016;165:21–8.”

1.2 Patogênese da psoríase

A despeito dos avanços no entendimento da sua patogênese nas últimas décadas, ainda permanece desconhecido o fator desencadeante da doença. Acredita-se que após gatilho(s) ainda indeterminado(s) (trauma físico, estresse, infecções, drogas), ocorra o estímulo de células apresentadoras de antígeno³ e ativação das células T, seguido da liberação de citocinas como interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF- α ou TNF⁴)(18). Com referência a resposta imune adaptativa, esta é do tipo Th1 (T helper-1), com expressão aumentada de interferon-gama (IFN- γ), TNF, IL-2 e IL-12 nas lesões cutâneas da psoríase. Estas citocinas

³ São exemplos de células apresentadoras de antígeno que participam na imunopatogênese da psoríase as células dendríticas imaturas e células de Langerhans, localizadas na camada basal e suprabasal da epiderme e do epitélio de mucosas, que subsequentemente migram para os linfonodos e ativam células T.

⁴ A família TNF é composta por diversos subtipos de citocinas. O seu principal representante é o fator de necrose tumoral do tipo alfa (TNF- α) ou cachectina, também conhecido simplesmente como fator de necrose tumoral (TNF), e é produzido principalmente por macrófagos. O fator de necrose tumoral do tipo β (TNF- β), também conhecido como linfotóxina, é uma citocina produzida por linfócitos e apresenta funções diferentes do TNF- α .

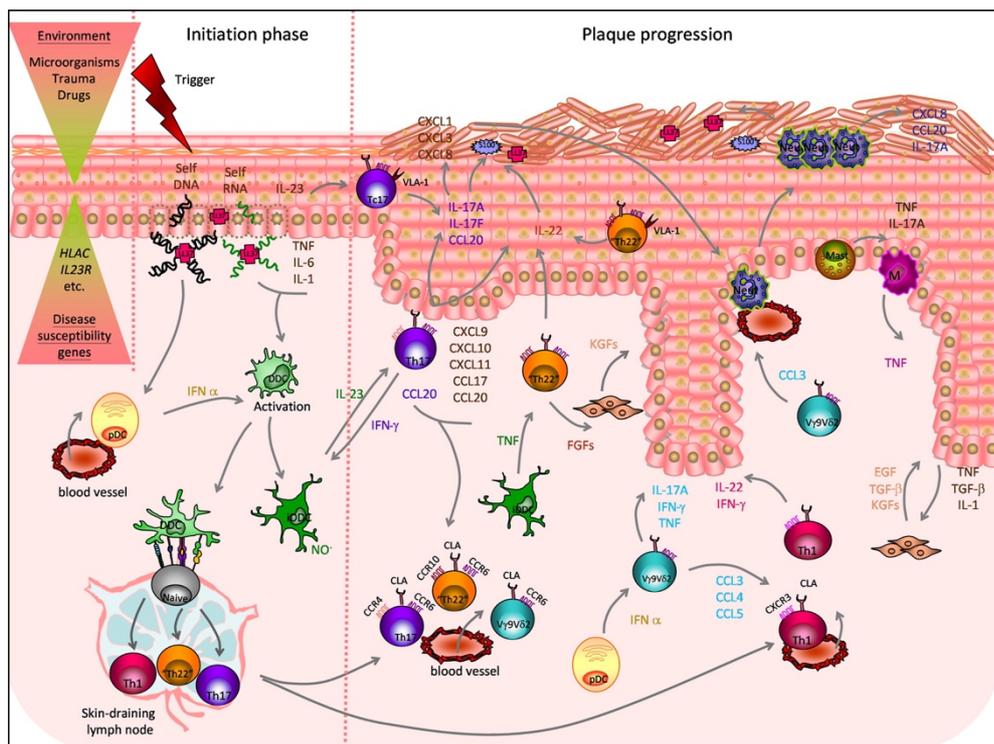
induzem hiperproliferação da epiderme, de vasos sanguíneos e outros efeitos pró-inflamatórios que são mais evidentes em pacientes com maior gravidade da doença(5)(6). Várias reações em cascata acontecem a partir da liberação destes mediadores inflamatórios iniciais. Por exemplo, o TNF induz a expressão da IL-6 e da proteína C-reativa. A IL-6 media a ativação de células T e a resposta de fase aguda e estimula a proliferação de queratinócitos. A liberação tanto de IFN- γ como de TNF ativa também os queratinócitos, que passam a secretar IL-8, que tem potente ação quimiotática para neutrófilos(21). No interior da epiderme, os neutrófilos liberam mediadores que agem em células endoteliais, os quais por sua vez expressam moléculas de adesão. Isto permite um influxo crescente de leucócitos que perpetua o processo inflamatório. Ressalta-se que o TNF desempenha papel fundamental na patogênese da psoríase, ao ser uma das citocinas primeiramente secretadas por um grande número de células – macrófagos, células T, células *natural killer* (NK) e queratinócitos. A extensa documentação sobre a eficácia terapêutica de drogas inibidoras desta citocina (anti-TNF) no tratamento de doentes psoriásicos corroboram inegavelmente para este fato(22).

Mais recentemente, surgiram estudos que apontam para a importância das respostas imunes Th17 e Th22 para a psoríase(23)(24)(25). A expressão de IL-23, citocina secretada por queratinócitos, células de Langerhans, macrófagos e células dendríticas, está aumentada nas lesões de psoríase e está envolvida com a secreção de IL-17 por células Th17(26). A resposta Th17 é particularmente importante devido aos seus efeitos pró-inflamatórios e no “loop” inflamatório integrado a queratinócitos e células dendríticas.(27) As células Th22 são uma nova população de linfócitos descrita e expressam IL-22 e TNF(18)(FIGURA 4).

Embora o papel das células T na patogênese da psoríase seja indiscutível e de grande relevância, não são elas as únicas implicadas neste processo. Dentre outras populações celulares que influenciam em diferentes níveis o desencadeamento e a intensidade clínica da doença(28), estão os monócitos, que são leucócitos mononucleares que têm origem de um precursor

mieloide comum da medula óssea e que, nos tecidos, se diferenciam em macrófagos e células dendríticas. São células caracterizadas por sua capacidade fagocítica e apresentadora de antígenos. Ao apresentarem antígenos aos linfócitos T, os monócitos assumem uma importante ação tanto na imunidade inata quanto na adaptativa(29). Nas lesões cutâneas de psoríase, é documentada a infiltração de monócitos e células T, e admite-se que as células Th1 e Th17 interajam com os monócitos, induzindo sua diferenciação em células dendríticas especializadas(30). Adicionalmente, os monócitos são as principais células produtoras de IL-1, IL-6 e TNF, citocinas de reconhecida importância na psoríase(10)(12).

Figura 4 – Ilustração sobre a imunopatogênese da psoríase.



Fonte: “Immunopathogenesis of Psoriasis”. In: *Di Meglio P e cols. Immunity. 2011;35(6):857–69 (1)*

1.3 As subpopulações de monócitos: ainda poucos estudos na psoríase

Nas últimas duas décadas, com o emprego da citometria de fluxo usando anticorpos para CD14 (receptor para lipossacarídeo) e para CD16 (receptor de baixa afinidade para IgG), os monócitos sanguíneos humanos foram classificados primeiramente em duas subpopulações, que apresentam características funcionais e fenotípicas distintas, baseando-se na expressão de CD16: subgrupo CD14+CD16- e subgrupo CD14+CD16+(13)(14). Diversos estudos subsequentes, no entanto, identificaram heterogeneidade no subgrupo CD16+, com uma subpopulação intermediária com expressão relativamente mais alta de CD14 associada à expressão mais baixa de CD16 e outra subpopulação não clássica com expressão relativamente mais baixa de CD14 associada à expressão mais alta de CD16. Com isso, uma nova nomenclatura foi proposta, agrupando estas células em três subpopulações, sendo a mais utilizada nos estudos científicos até o presente momento(31,33):

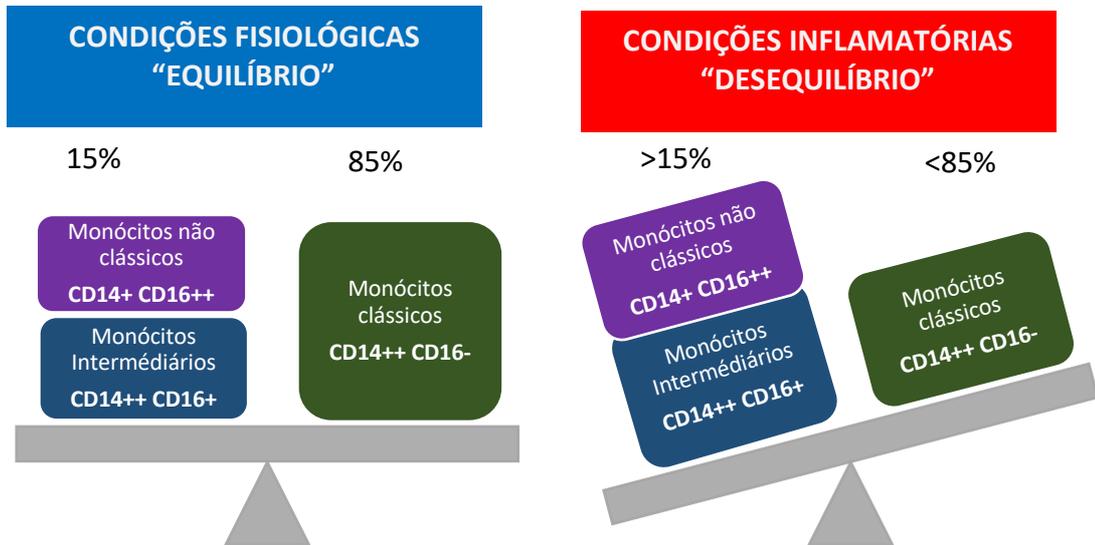
- a) **monócitos clássicos** CD14++CD16- (alta expressão de CD14 sem expressão de CD16);
- b) **monócitos intermediários** CD14++CD16+ (alta expressão de CD14 com baixa expressão de CD16); e
- c) **monócitos não clássicos** CD14+CD16++ (baixa expressão de CD14 com alta expressão de CD16).

Em termos de porcentagem, acredita-se que, em condições normais, a população de monócitos clássicos corresponderia a cerca de 85%, enquanto os intermediários a 5,4% e os não clássicos a 9,2%(34). Atualmente, permanece obscuro se os monócitos intermediários representam apenas um tipo de célula em transição ou realmente se constituem uma população celular distinta(35). Do ponto de vista clínico, os monócitos intermediários estão aumentados em situações variadas como na asma moderada a grave(36), no câncer colorretal(37) e na artrite

reumatoide(38) (FIGURA 5). Nesta última, a frequência elevada de monócitos intermediários também foi associada à resposta terapêutica diminuída ao metotrexato(38). Estudos também relacionam os monócitos intermediários como preditores de desfecho desfavorável em pacientes com doença cardiovascular(21)(22). Em estudo de tráfico transendotelial, demonstrou-se que os monócitos intermediários e não clássicos (CD16+), ditos inflamatórios ou pró-inflamatórios, seriam capazes de se diferenciar em células dendríticas migratórias, sugerindo-se serem os precursores sanguíneos fisiológicos das mesmas(41).

Nos pacientes psoriásicos, as pesquisas das subpopulações foram realizadas em raríssimas ocasiões(42)(43)(44), em nível sanguíneo, e não seguindo exatamente a classificação atualmente mais utilizada e acima mencionada. Nestes estudos, os níveis de monócitos com expressão positiva para CD16 (pró-inflamatórios) se mostraram maiores nos pacientes que em controles.

Figura 5 – Esquema ilustrativo da distribuição das subpopulações de monócitos em condições fisiológicas (balança à esquerda) e em condições inflamatórias (balança à direita).



Fonte: aluna.

1.4 Expressão de quimiocinas e de marcadores de ativação monocítica na psoríase

As quimiocinas são pequenos peptídeos reconhecidos por mediar a quimiotaxia dirigida em células responsivas próximas, isto é, por orientar a migração das células. Elas são classificadas em quatro subfamílias principais – CC, CXC, CX3C e XC – de acordo com o espaço entre os dois primeiros resíduos de cisteína. Existem quimiocinas homeostáticas, que controlam as células durante os processos de vigilância imunológica; quimiocinas que desempenham papel no desenvolvimento (indução de angiogênese ou direcionamento para a maturação celular); e quimiocinas inflamatórias. Estas últimas são liberadas a partir de uma ampla variedade de células em resposta a estímulos como infecção, danos físicos ou mesmo fatores desconhecidos. Funcionam como quimioatrativos para leucócitos, recrutando monócitos, neutrófilos e outras células efectoras do sangue para locais de infecção ou dano tecidual. Na verdade, são liberadas por tipos celulares diferentes e servem para guiar as células tanto do sistema imune inato quanto do adaptativo(45).

Com relação à psoríase, estão entre as principais quimiocinas apontadas: CCL2, CXCL9 e CX3CL1 (fractalquina) (46)(47)(48). A CCL2, também conhecida como MCP1 (*monocyte chemoattractant protein 1*), é responsável por recrutar monócitos, células T de memória e células dendríticas para os locais de inflamação. É secretada na pele por queratinócitos, macrófagos e células dendríticas. Níveis de expressão elevados de CCL2 têm sido encontrados em pacientes com psoríase, embora também ela tenha sido implicada na patogênese de muitas doenças caracterizadas por infiltrado monocítico, como artrite reumatoide e aterosclerose.(49) A CXCL9, ou monoquina induzida por IFN-gama, recruta células T e é induzida por IFN-gama e diversos estudos reportam sua expressão elevada em tumores epiteliais da cavidade oral, condições patológicas cardiovasculares e nos pacientes psoriásicos(50)(51)(47). A CX3CL1 é uma quimiocina atípica com um papel documentado no desenvolvimento de várias doenças inflamatórias, incluindo a aterosclerose, osteoartrite e também psoríase(52)(53)(54).

Biomarcadores de ativação celular, especificamente monocítica, por sua vez, tem sido alvo, em sua maioria, de estudos bastante recentes em doenças infecciosas e inflamatórias. O CD163 é uma glicoproteína expressa na superfície da membrana de monócitos e macrófagos para posteriormente induzir sua forma solúvel, o CD163s, em resposta a condições patológicas variadas. O CD163s tem sido apontado como biomarcador para diversas doenças auto-imunes(55). Nos pacientes portadores de psoríase, contudo, os estudos ainda são poucos e com conclusões controversas(56)(57). O CD14, também presente na superfície da membrana de várias células como monócitos, macrófagos e granulócitos, apresenta formas solúveis produzidas e liberadas na circulação tanto após fagocitose como pela clivagem proteolítica de monócitos ativados. Estas formas solúveis tem sido associados a sepse em adultos e neonatos e a outras condições infecciosas(58)(59)(60). Até a presente data, não foram encontradas publicações recentes nas quais se tratasse especificamente de CD14s em pacientes portadores de psoríase. Há, contudo, uma publicação da década de 1990, com amostras cutâneas colhidas por bolhas de sucção e amostras séricas de pacientes psoriásicos, na qual seus autores encontraram aumento dos níveis de CD14s somente nas amostras séricas(61).

1.5 O PASI como medida para aferição gravidade clínica da psoríase

O PASI (*Psoriasis Area and Severity Index*) é um instrumento universalmente empregado(62) para se avaliar a gravidade da doença, tendo uso frequente na prática diária – em verdade, muito facilitado pelos aplicativos recentes de dispositivos portáteis como *tablets* e *smartphones* – e especialmente em estudos clínicos(63), o que fez dele um método altamente validado e confiável.

Este método surgiu no final dos anos 70 (1978), quando os pesquisadores Fredriksson e Pettersson(64) o propuseram enquanto realizavam um dos primeiros ensaios clínicos com derivados do ácido retinoico para a doença. Esta ferramenta tem como propósito a avaliação

quantitativa do acometimento cutâneo baseada na porcentagem da superfície corporal acometida e no grau de eritema, infiltração e descamação das lesões, ponderados pelas regiões corpóreas nas quais se localizam.(65)(66)(62) Este sistema é composto por 4 itens – área acometida, grau do eritema, grau da infiltração e grau da descamação – pesquisados em 4 regiões corporais (cabeça, tronco, membros superiores e membros inferiores). Cada região é ponderada por uma constante diferente (cabeça = 0,1; membros superiores = 0,2; tronco = 0,3 e membros inferiores = 0,4). O grau do eritema, infiltração e descamação em cada região é julgado em uma escala de varia de 0-4 (0 = ausente; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = grave e 4 = muito grave). A avaliação da área se dá da seguinte forma: 1 = menos de 10%; 2 = de 10 a 30%; 3 = de 30 a 50%; 4 = de 50 a 70%; 5 = de 70 a 90% e 6 = mais de 90%. Estes escores corporais são somados e então multiplicados pelo grau de acometimento da superfície e pela constante referente a cada área. Ao final, soma-se os valores encontrados em cada uma das 4 áreas, sendo que o resultado final pode variar de 0 a 72. (ANEXO 1)

O PASI pode ser utilizado como parâmetro de gravidade para a psoríase vulgar (em placas), mas não serve para avaliação de psoríase pustulosa, psoríase invertida, psoríase palmoplantar, artrite psoriásica ou ungueal. Outra limitação do método é a possível variabilidade de escores entre avaliadores distintos frente ao mesmo paciente ou a possível variabilidade de escores obtidos pelo mesmo avaliador em momentos diferentes, ou seja, elementos que podem comprometer a validade ou a reprodutibilidade do método. Há também questionamentos sobre sua aplicação nos casos de doença leve. Apesar dessas ressalvas, ainda assim é o método mais empregado no caso de publicações científicas e para uma avaliação objetiva quanto a resultados terapêuticos na prática clínica.

Grande parte das publicações define o PASI superior a 10 como critério para rotular de moderado a grave o quadro clínico da psoríase(67). Alguns autores(68), utilizam o critério de PASI entre 7 a 12 para psoríase moderada e maior que 12 para grave, embora seja menos

comum. No presente estudo, nas análises estatísticas em que foram investigadas correlações da gravidade da doença com os parâmetros inflamatórios, optou-se por categorizar os pacientes da seguinte forma: PASI < 10 (doença leve a moderada); PASI entre 10-20 (doença moderada a grave) e PASI > 20 (doença grave).

1.6 Um estudo que contemple as lacunas dos anteriores

Até o momento, embora considerada uma doença de natureza inflamatória, são escassos os estudos que avaliam a frequência das subpopulações de monócitos em pacientes com psoríase e são eles restritos a análise sanguínea(29)(30). São igualmente incomuns e não avaliam, em sua maioria, amostras cutâneas os estudos de citocinas, quimiocinas e marcadores de ativação monocítica em pacientes portadores de psoríase(47)(69). Tampouco os estudos existentes correlacionam estes marcadores inflamatórios com o PASI (gravidade da doença) ou aferem a possível inter-relação entre os principais parâmetros inflamatórios nesta doença. Desta forma, estudos que contemplem estas faltas podem trazer importantes contribuições.

2 JUSTIFICATIVA

Há ainda lacunas no tocante ao completo entendimento da imunopatogênese da psoríase. O comportamento das subpopulações de monócitos, que se mostrou alterado em condições patológicas diversas, foi estudado na psoríase em raros estudos, sendo eles restritos à análise sanguínea. Acredita-se que a proposta de avaliar subpopulações de monócitos na psoríase, em pacientes e em indivíduos saudáveis, em nível sérico e adicionalmente cutâneo, possa, ao trazer dados mais completos, certamente contribuir para melhor compreensão do mecanismo da doença. Ademais, supõe-se que a frequência dos monócitos ditos “inflamatórios” (não clássicos e intermediários) se correlacione diretamente com a gravidade da doença e com níveis elevados de marcadores inflamatórios e não há até a presente data informações neste sentido.

Por outro lado, a análise comparativa da expressão de citocinas, quimiocinas e marcadores de ativação monocítica, igualmente com avaliação sérica e cutânea e entre grupos de doentes e controles, poderá não apenas confirmar como oferecer novas afirmativas relevantes nos processos imunopatogênicos da psoríase. Aliás, parece interessante o questionamento sobre correlações entre os níveis de expressão de biomarcadores com a gravidade clínica dos pacientes, feito de igual maneira inédito. Adicionalmente, a investigação a respeito da inter-relação entre tais marcadores inflamatórios corroborará provavelmente para melhor esclarecer a complexidade dos eventos imunológicos relacionados à doença.

A partir destas ideias, elaborou-se o presente projeto, de caráter inédito ao realizar coletas sanguíneas e cutâneas simultâneas, para o estudo tanto de subpopulações de monócitos como de biomarcadores inflamatórios em pacientes e indivíduos saudáveis, com adicionais pesquisas da correlação destes achados com a gravidade clínica dos pacientes e da inter-relação entre os parâmetros inflamatórios.

3 OBJETIVOS

3.1 Principal

Identificar as frequências das subpopulações de monócitos (monócitos clássicos, intermediários e não clássicos), em nível sanguíneo e cutâneo, nos pacientes portadores de psoríase vulgar, comparando-as com as frequências observadas em indivíduos saudáveis.

3.2 Secundários

1. Avaliar a expressão de citocinas (IL-1beta, IL-6, TNF, IFN- γ , IL-17A) e quimiocinas (CCL2, CX3CL1 – fractalquina – e CXCL9), relevantes no desencadeamento e perpetuação do processo inflamatório, nos pacientes e controles, em nível sérico e cutâneo.
2. Avaliar a expressão de marcadores de ativação mononuclear (formas solúveis de CD14 e CD163) no soro e na pele de pacientes e controles.
3. Correlacionar a frequência de subpopulações de monócitos, no sangue periférico e na pele, com a gravidade da doença aferida pelo PASI.
4. Correlacionar a expressão de citocinas, quimiocinas e marcadores de ativação monocítica, no soro e na pele, com a gravidade da doença aferida pelo PASI.
5. Investigar possíveis inter-relações entre os parâmetros inflamatórios elegidos no presente estudo (monócitos pró-inflamatórios, citocinas, quimiocinas e marcadores de ativação monocítica).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo e população estudada

Trata-se de estudo de corte transversal do qual participaram pacientes portadores de psoríase vulgar em atividade, maiores de 18 anos, e que se encontravam sem uso de medicações sistêmicas / fototerapia há um mês ou mais, considerando-se a meia-vida da droga do regime previamente utilizado, ou que nunca tivessem sido submetidos a estes tratamentos. Os pacientes elegidos para estudo também não poderiam apresentar outras comorbidades de repercussão sistêmica como: outras doenças inflamatórias e doenças infecciosas ou neoplásicas. O grupo controle foi formado por indivíduos sadios voluntários, que eram acompanhantes dos pacientes sem grau de parentesco natural (consanguíneo) ou que eram pacientes assistidos ambulatorialmente no serviço onde foram realizadas as coletas devido a dermatoses não inflamatórias, localizadas e sem repercussões sistêmicas (como onicomiose ou melasma facial). A gravidade da psoríase foi avaliada através de aplicação do Índice de Gravidade e Área da Psoríase (*Psoriasis Area and Severity Index – PASI*), método validado, considerado padrão-ouro(62) e largamente utilizado no acompanhamento clínico e em estudos científicos (ANEXO 1).

4.2 Local de realização do estudo e comitê de ética

A coleta e processamento do material dos pacientes e controles ocorreram no Serviço de Dermatologia do Hospital Universitário Professor Edgar Santos (HUPES) e no Setor de Imunologia do HUPES, respectivamente, ambos pertencentes à Universidade Federal da Bahia (UFBA). Este projeto foi submetido para análise do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Bahia da UFBA (CAAE 40868614.0.0000.5577 na Plataforma Brasil) em 23

julho de 2014, tendo sido aprovado sem pendências em 12 de junho de 2015. A ficha de protocolo e o termo de consentimento livre e esclarecidos, assinado por todos os sujeitos do estudo, estão disponibilizados ao final desta obra (ANEXOS 2 e 3). A coleta das amostras aconteceu no período compreendido entre junho de 2015 até dezembro de 2016.

Os recursos utilizados foram oriundos do Serviço de Imunologia do HUPES, sem financiamento exclusivo para este projeto. Todos autores envolvidos no projeto declararam ausência de conflitos de interesse.

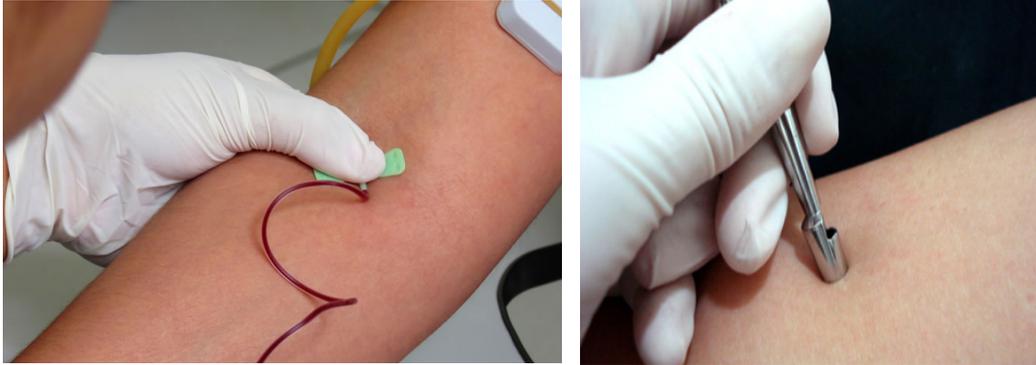
4.3 Cálculo amostral e coleta das amostras

O cálculo amostral deste trabalho foi estimado levando-se em conta que a frequência da população monócitos inflamatórios (não clássicos e intermediários) em pacientes com psoríase seria duas vezes mais elevada do que em controles, a exemplo do que acontece em outras condições inflamatórias (38). A partir desta diferença estimada e estabelecendo um poder de 80% e significância ($p = 0,01$), ao inserir tais dados em um “software” estatístico de livre acesso *online* – OpenEpi⁵ – encontrou-se que seriam necessários um total de 24 indivíduos por grupo.

Para amostra do sangue periférico, foram coletados 15 ml de sangue periférico de cada paciente e cada indivíduo sadio (controle). A amostra cutânea foi coletada por meio da realização de biópsia com “punch” de 3 mm de diâmetro (FIGURA 6) de lesões características da doença nos pacientes (placas eritematodescamativas) e de pele aparentemente normal nos controles. Os protocolos laboratoriais detalhados a seguir foram os adotados pelo respaldo de terem sido previamente utilizados em outros estudos do Serviço de Imunologia do HUPES(70)(71)(72).

⁵ Dean AG, Sullivan KM, Soe MM. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Version. www.OpenEpi.com, atualizado em 06/04/2013, acessado em 21/06/2018.

Figura 6 – Coleta de amostra de sangue periférico (à direita) e de pele por “punch” (à esquerda).



Fonte: aluna.

4.4 Processamento da amostra do sangue periférico

4.4.1 Separação de células mononucleares do sangue periférico

O sangue foi coletado em tubo *Falcon* estéril contendo heparina (1000U/ml). As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram isoladas por meio de gradiente de concentração com FicollPaque™ Plus (GE Healthcare, Biosciences AB Durhman, NC, EUA). Após centrifugação a 1450 rpm durante 30 minutos a 25° C, um anel de CMSP foi obtido entre a mistura de Ficoll-Hypaque™ e o plasma. Em seguida, as CMSP foram centrifugadas duas vezes a 1290 rpm durante 10 minutos, com solução salina (0,9% de cloreto de sódio). As CMSP foram contadas em câmara de *Newbauer*, ajustando-se a concentração de interesse de acordo com cada ensaio realizado. Os resultados foram expressos em *pg/ml*.

4.5 Processamento da amostra cutânea

As amostras cutâneas obtidas, após remoção da camada de tecido adiposo, foram colocadas inteiras sem nenhum procedimento de maceração, em tubos estéreis com 1ml de

RPMI⁶-1640 (GibcoLaboratories, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB 12657 GibcoLaboratories, InvitrogenTM América do Sul), 10 IU/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina. A cultura foi realizada por 48 horas a 37°C e 5% de gás carbônico (CO₂). Após a cultura, os fragmentos de biópsias foram picotados e incubados com *liberase*⁷ (Roche Diagnostics, Alemanha) por uma hora a 37°C. Em seguida, foram maceradas e filtradas com filtro de 40 µm (BD Falcon cell strainer, BD PharmingenTM).

4.6 Marcação de superfície celular para FACS (“separação de célula pela atividade de fluorescência”)

As CMSP foram ressuspensas em solução salina e ajustadas para a concentração de 1x10⁶ células/ml, colocadas em tubos de poliestireno de 5 ml. As células das amostras cutâneas foram ressuspensas em RPMI, ajustadas para 1x10⁶ seguido o mesmo protocolo posteriormente. Foi realizada a marcação de superfície celular “ex-vivo” utilizando os anticorpos monoclonais anti-CD14 – APC (BD PhamingenTM), anti-CD16 – PE⁸ (BD PhamingenTM) e anti-HLA-DR – FITC⁹ (BD PhamingenTM)¹⁰ após a adição dos anticorpos diluídos na concentração 1:10 os tubos foram deixados a 4°C, protegidos da luz, por 15 minutos. Em seguida, as CMSP foram lavadas com solução salina (0,9% de cloreto de sódio) e fixadas com paraformaldeído a 2%.

⁶ RPMI: meio de uso geral com uma vasta gama de aplicações para células de mamíferos, especialmente células hematopoiéticas

⁷ Liberase: misturas enzimáticas para isolar grupos celulares de uma ampla gama de tipos de tecidos

⁸ PE ou ficoeritrina, proteína da família das ficobiliproteínas, muito utilizada como fluorocromo nos estudos de citometria de fluxo.

⁹ FITC (*fluorescein isothiocyanate*): marcador derivado da fluoresceína também muito utilizado nos estudos de citometria de fluxo.

¹⁰ Anti-HLA-DR: utilizado para avaliar a expressão das moléculas de ativação celular.

4.7 Dosagem dos níveis de citocinas e quimiocinas

Os níveis de TNF, IL-1 β , IFN- γ , IL-6, IL-17 (IL-17A), CCL2, CX3CL1, CXCL9, sCD14 e sCD16, foram determinados no soro e no sobrenadante da cultura de amostra cutânea pela técnica de ELISA. Para as dosagens destas citocinas foram utilizados *kits* da R&D Systems (R&D Systems Inc. Minneapolis, MN, EUA) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante, e padronizado para 50ul como descrito brevemente a seguir. As placas foram sensibilizadas com anticorpo anti-TNF, anti-IL-1 β , anti-IFN γ , anti-IL-6, anti-IL-17A, anti-CCL2, anti-CX3CL1, anti-sCD14 e anti-sCD16 e incubadas *overnight* em temperatura ambiente. Após incubação as placas foram bloqueadas com reagente diluente (1% BSA¹¹ em PBS pH 7.4) em temperatura ambiente por uma hora. Após o bloqueio, os sobrenadantes (50ul/poço) foram adicionados à placa e incubados em temperatura ambiente por duas horas. Após esse período, as placas foram incubadas com anticorpo de detecção por duas horas em temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se estreptavidina¹² por 20 minutos em temperatura ambiente. Entre cada etapa, foram realizadas três lavagens com tampão de lavagem (Tween 0,05% em PBS pH 7.4). A reação foi revelada com uma solução de substrato enzimático TMB¹³ e interrompida com uma solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄). Os resultados foram expressos em pg/ml.

4.8 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa SAS 9.4 (*SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA*). Inicialmente, empregou-se o teste da normalidade de

¹¹ 1% BSA em PBS: 1% *bovine serum albumin* em *phosphate-buffered solution* – solução para bloqueio de ensaio a fim de se melhorar a sensibilidade do mesmo ao reduzir a interferência de fundo.

¹² Estreptavidina: proteína tetramérica utilizada para ensaios imunológicos.

¹³ Substrato TMB: contém 3,3',5,5'-tetrametilbencidina em um tampão ligeiramente ácido.

D'Agostino-Pearson para verificar quais variáveis apresentavam distribuição gaussiana. Nas comparações entre grupos para variáveis contínuas que apresentaram distribuição gaussiana, foi utilizado o teste t de Student (idade e tempo de doença dos sujeitos avaliados); e, para aquelas que não apresentavam distribuição gaussiana, as análises foram realizadas com o teste de Mann-Whitney. Para comparações entre grupos de variáveis qualitativas, empregou-se o teste de qui-quadrado (sexo dos sujeitos avaliados). O coeficiente de correlação de Spearman foi elegido para avaliar o grau de correlação das variáveis quantitativas. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor de “p” foi menor que 0,05.

5 RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

5.1 Dados epidemiológicos da amostra estudada

No total, foram coletadas amostras de 32 pacientes e 32 controles, com distribuição de idade e sexo conforme TABELA 1. O percentual de indivíduos da amostra do sexo masculino ou feminino não difere significativamente entre os grupos ($p = 0,0729$). A idade média dos pacientes é significativamente maior do que dos indivíduos do grupo controle ($p < 0,0001$).

Tabela 1 – Distribuição de sexo e idade dos pacientes e controles do estudo.

Gênero	Pacientes (n = 32)	Controles (n = 32)	p[#]
Feminino	16 (50,00)	23 (71,88)	0,0729
Masculino	16 (50,00)	9 (28,13)	
Idade* (anos)	48,06 ± 16,92	31,34 ± 6,46	< 0,0001

* Valores expressos em frequência (%) ou média ± desvio padrão.

p-valor obtido pelos testes de qui-quadrado ou t de Student.

O valor médio do PASI apresentado pelos pacientes foi de 12,09. O tempo de doença em média foi de 13,5 anos (TABELA 2). Observou-se que 13 pacientes (40,63%) apresentavam PASI menor que 10 (doença leve a moderada), enquanto 12 pacientes (37,50%) apresentavam PASI entre 10 e 20 (doença moderada a grave), e 7 pacientes (21,88%) apresentavam PASI > 20 (doença grave). (TABELA 3).

Tabela 2 – Médias do PASI e do tempo de doença apresentadas pelos pacientes do estudo.

Variável	Média	Desvio padrão
PASI	12,09	8,30
Tempo de doença (anos)	13,50	7,11

Tabela 3 – Distribuição dos pacientes estudados de acordo com os valores do PASI apresentados.

PASI	n	%	Frequência cumulativa	% cumulativo
< 10	13	40,63	13	40,63
10-20	12	37,50	25	78,13
> 20	7	21,88	32	100,00

5.2 Frequências das subpopulações de monócitos na amostra estudada

Sobre o estudo da frequência das subpopulações de monócitos, no sangue periférico de um paciente encontrou-se alterações na distribuição das populações, com aumento de subpopulações consideradas inflamatórias (intermediários e não clássicos) – FIGURA 6A, o que não se repetiu quando avaliadas na lesão cutânea do mesmo paciente – FIGURA 6B.

Figura 7A – Análise por citometria de fluxo de amostra representativa de um paciente do estudo, no sangue periférico, mostrando aumento das subpopulações “inflamatórias”.

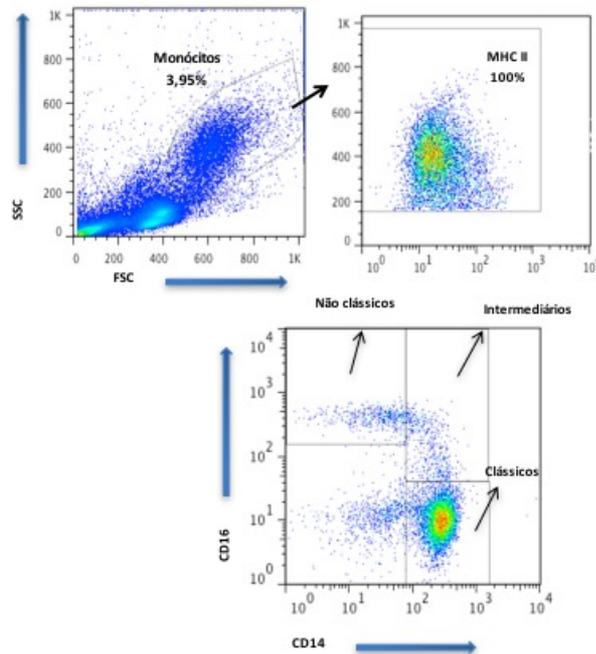
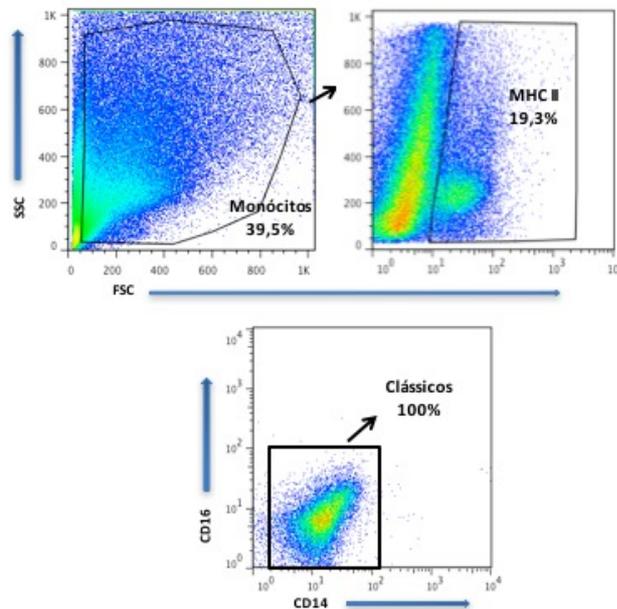


Figura 7B – Análise por citometria de fluxo de amostra representativa de um paciente do estudo, na amostra de lesão cutânea, sem diferença nas subpopulações de monócitos.



Nos resultados a seguir, ressalta-se que, devido à limitação de recursos materiais (quantidade de reagentes disponíveis no laboratório para realização do processamento e exame das amostras estudadas), o número de pacientes e controles avaliados em cada exame não foi

uniforme e não contemplou o total de 32 sujeitos avaliados por grupo. Apesar deste fato, acredita-se que o prejuízo seja mínimo diante da diversidade de parâmetros e do reduzido, mas ainda considerável, número de sujeitos em cada exame conforme pode ser verificado no ANEXO 4.

A análise estatística das subpopulações de monócitos, tanto no sangue periférico quanto na amostra cutânea, expressas em valores médios das frequências apresentadas pelos indivíduos saudáveis e pacientes portadores de psoríase, não mostrou diferença estatística significativa entre os grupos estudados (TABELA 4, GRÁFICOS 1 e 2).

Tabela 4 – Média das frequências de subpopulações de monócitos, em nível de sangue periférico e cutâneos, nos indivíduos saudáveis (controles) e pacientes do estudo.

Subpopulações de monócitos*	Pacientes	Controles	p [#]
SANGUE PERIFÉRICO			
Clássicos	61,64 ± 16,24	55,41 ± 19,14	0,2841
Intermediários	7,61 ± 4,04	10,88 ± 11,93	0,9498
Não clássicos	9,36 ± 6,47	9,90 ± 3,53	0,3891
PELE			
Clássicos	48,68 ± 30,40	66,05 ± 14,34	0,2863
Intermediários	0,33 ± 0,88	0,98 ± 1,25	0,0629
Não clássicos	0,26 ± 0,92	0,00 ± 0,00	0,4367

* Valores percentuais expressos em média ± desvio padrão

p – valor calculado pelo teste de Mann-Whitney

Gráfico 1 – Frequências das subpopulações de monócitos na amostra de sangue periférico de pacientes x controles, sem diferença estatística significativa.

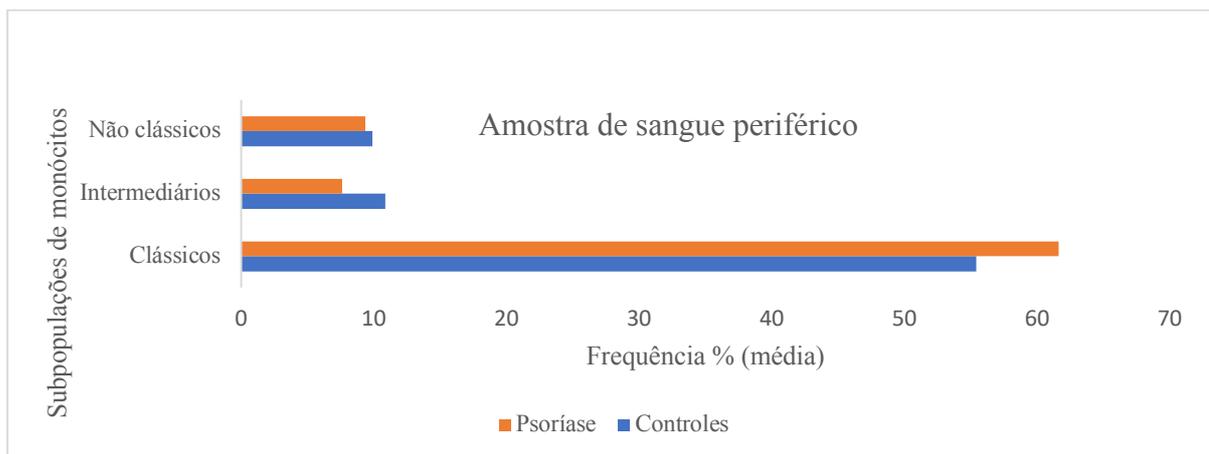
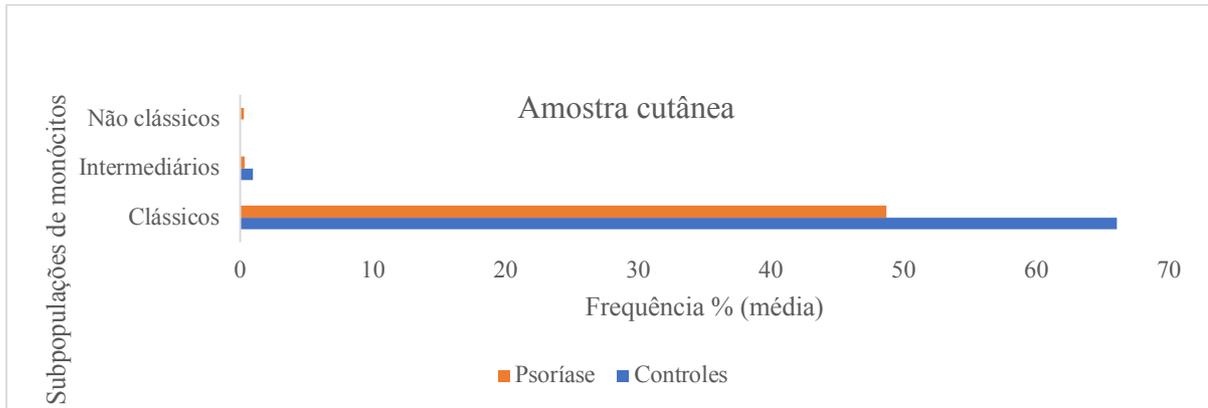


Gráfico 2 – Frequências das subpopulações de monócitos na amostra cutânea de pacientes x controles, sem diferença estatística significativa.



5.3 Correlação entre a frequências das subpopulações de monócitos na população estudada e a gravidade da doença aferida pelo PASI

Ainda sobre o estudo das subpopulações de monócitos, mais especificamente no grupo de pacientes, pesquisou-se sobre possível relação com a gravidade da doença, aferida pelo PASI (TABELA 5), a qual não foi significativa quando analisado o grupo completo de todos os pacientes (considerou-se inicialmente para correlação todos os valores de PASI; em seguida, os pacientes foram divididos em subgrupos segundo a gravidade como pode ser averiguado abaixo).

Com o intuito de análise mais detalhada, os pacientes foram divididos em 3 subgrupos de acordo com a intensidade do PASI e, em seguida, pesquisou-se possível correlação com as frequências das subpopulações de monócitos. Neste sentido, os pacientes foram subdivididos em: 1) doença leve a moderada (PASI < 10); 2) doença moderada a grave (PASI entre 10 e 20) e 3) doença grave (PASI > 20). Desta forma, encontrou-se relação positiva entre a pacientes com doença moderada a grave (grupo com PASI 10 a 20) e o aumento da subpopulação de monócitos não clássicos nas amostras de sangue periférico ($r = 0,81467$; $p = 0,0073$) (TABELAS 6, 7 e 8).

Tabela 5 – Correlação entre as frequências de subpopulações de monócitos e o PASI, em nível de sangue periférico e cutâneos.

Variável dependente	Variável independente (subpopulações de monócitos)	N	Coefficiente de correlação (r)*	Intervalo de confiança 95%		p
SANGUE PERIFÉRICO						
PASI	Clássicos	25	-0,26960	-0,600736	0,140498	0,1857
PASI	Intermediários	25	-0,12806	-0,497994	0,281302	0,5374
PASI	Não clássicos	25	-0,03632	-0,425346	0,364036	0,8618
PELE						
PASI	Clássicos	24	-0,36576	-0,670265	0,044146	0,0727
PASI	Intermediários	24	-0,14229	-0,516062	0,277010	0,5022
PASI	Não clássicos	24	0,28644	-0,132236	0,618384	0,1677

* Coeficiente de correlação de Pearson

Tabela 6 – Correlação entre as frequências de subpopulações de monócitos e o PASI < 10, em nível de sangue periférico e cutâneos.

Variável Dependente	Variável Independente (subpopulações de monócitos)	N	Coefficiente de correlação (r)*	Intervalo de confiança 95%		p
SANGUE PERIFÉRICO						
PASI < 10	Clássicos	12	0,37476	-0,222081	0,767307	0,1946
PASI < 10	Intermediários	12	-0,01224	-0,559452	0,542404	0,9678
PASI < 10	Não clássicos	12	-0,34882	-0,754746	0,250267	0,2305
PELE						
PASI < 10	Clássicos	12	-0,50287	-0,835613	0,099853	0,0836
PASI < 10	Intermediários	12	0,41167	-0,212416	0,797222	0,1703
PASI < 10	Não clássicos	12	0,41939	-0,203486	0,800598	0,1614

* Coeficiente de correlação de Pearson

Tabela 7 – Correlação entre as frequências de subpopulações de monócitos e o PASI entre 10 e 20, em nível de sangue periférico e cutâneos.

Variável Dependente	Variável Independente (subpopulações de monócitos)	N	Coefficiente de correlação (r)*	Intervalo de confiança 95%		p
SANGUE PERIFÉRICO						
PASI 10-20	Clássicos	7	-0,26886	-0,818467	0,537683	0,5078
PASI 10-20	Intermediários	7	0,23576	-0,562338	0,806453	0,5635
<u>PASI 10-20</u>	<u>Não clássicos</u>	<u>7</u>	<u>0,81467</u>	<u>0,258261</u>	<u>0,965229</u>	<u>0,0073</u>
PELE						
PASI 10-20	Clássicos	7	0,45915	-0,449237	0,900757	0,2827
PASI 10-20	Intermediários	7	0,02112	-0,743768	0,762058	0,9632
PASI 10-20	Não clássicos	7	0,45915	-0,449237	0,900757	0,2827

* Coeficiente de correlação de Pearson

Tabela 8 – Correlação entre as frequências de subpopulações de monócitos e o PASI > 20, em nível de sangue periférico e cutâneos.

Variável Dependente	Variável Independente (subpopulações de monócitos)	N	Coefficiente de correlação (r)*	Intervalo de confiança 95%		p
SANGUE PERIFÉRICO						
PASI > 20	Clássicos	6	-0,30236	-0,978965	0,928562	0,7104
PASI > 20	Intermediários	6	-0,61980	-0,990728	0,844104	0,4015
PASI > 20	Não clássicos	6	-0,44842	-0,985001	0,900949	0,5697
PELE						
PASI > 20	Clássicos	5	-0,51956	-0,961215	0,669684	0,3602
PASI > 20	Intermediários		**			
PASI > 20	Não clássicos	5	0,11806	-0,853062	0,905961	0,8481

* Coeficiente de correlação de Pearson

** Não foi possível calcular a correlação entre monócitos intermediários na amostra cutânea e PASI por ausência de informação

5.4 Expressão das citocinas nos pacientes e controles

Sobre a expressão das citocinas comparada entre pacientes e controles, em nível sérico e cutâneo, observou-se maior expressão com significância estatística para IL-1beta e TNF na pele de pacientes ($p = 0,0089$ e $p < 0,0001$, respectivamente) (TABELA 9)(GRÁFICOS 3 e 4). As citocinas IFN e IL-6 só foram analisadas nas amostras de pele por limitação na disponibilidade de reagente.

Tabela 9 – Valores médios da expressão das citocinas nos grupos controles x pacientes, em nível sérico e cutâneo.

Variáveis	Pacientes	Controles	p [#]
SORO			
IL-17	2,29 ± 6,80	14,00 ± 40,63	0,0661
IL-1beta	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,0000
TNF	2,85 ± 7,56	0,20 ± 0,42	0,8748
PELE			
IL-17	42,31 ± 21,28	40,71 ± 11,02	0,6294
<u>IL-1beta</u>	<u>77,19 ± 101,12</u>	<u>32,07 ± 61,88</u>	<u>0,0089</u>
<u>TNF</u>	<u>134,22 ± 217,35</u>	<u>0,00 ± 0,00</u>	<u>≤ 0,0001</u>
IFN	28,79 ± 19,30	28,33 ± 36,56	0,1582
IL-6	665,46 ± 105,93	645,57 ± 111,58	0,5420

* Valores médios ± desvio padrão, em pg/ml

p – valor calculado pelo teste de Mann-Whitney

Gráfico 3 – Expressão de IL-1 beta nas lesões cutâneas de pacientes (grupo paciente) x na pele normal de indivíduos saudáveis (grupo controle), com diferença estatística significativa.

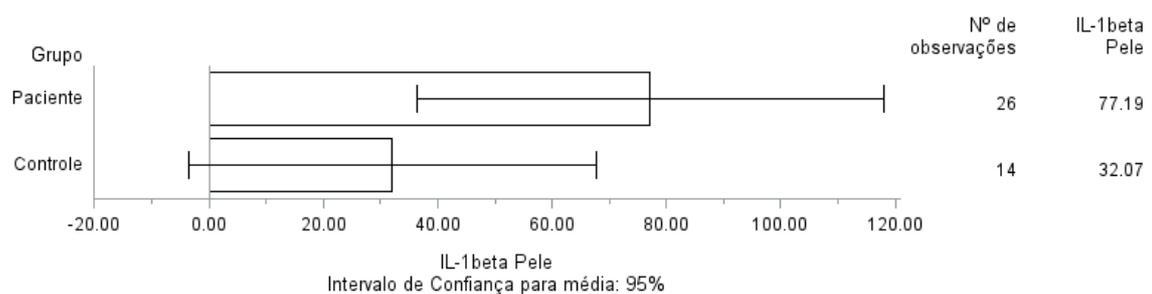
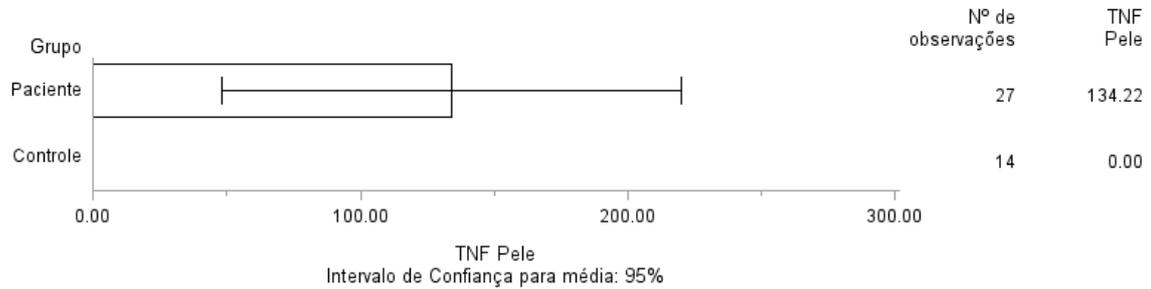


Gráfico 4 – Expressão de TNF nas lesões cutâneas de pacientes (grupo paciente) x na pele normal de indivíduos saudáveis (grupo controle), com diferença estatística significativa.



5.5 Expressão das quimiocinas nos pacientes e controles

No tocante à expressão das quimiocinas em pacientes e controles, em nível sérico e cutâneo, observou-se maior expressão com significância estatística para CXCL9 tanto em amostras sanguíneas (soro) quanto de pele (TABELA 10) (GRÁFICOS 5 e 6).

Tabela 10 – Valores médios da expressão das quimiocinas nos grupos controles x pacientes, em nível sérico e cutâneo.

Variáveis*	Pacientes	Controles	p [#]
SORO			
CCL2	356,20 ± 356,45	406,46 ± 213,78	0,0508
<u>CXCL9</u>	<u>1388,56 ± 267,14</u>	<u>1267,33 ± 208,61</u>	<u>0,0453</u>
CX3CL1	190,22 ± 16,80	198,25 ± 19,30	0,2016
PELE			
CCL2	1596,50 ± 2100,57	2071,29 ± 2706,05	0,8758
<u>CXCL9</u>	<u>6129,38 ± 2328,58</u>	<u>4375,93 ± 1313,44</u>	<u>0,0002</u>
CX3CL1	217,30 ± 29,08	204,43 ± 15,99	0,0880

* Valores médios ± desvio padrão, em pg/ml

p – valor calculado pelo teste de Mann-Whitney.

Gráfico 5 – Expressão de CXCL9 nas lesões cutâneas de pacientes (grupo paciente) x na pele normal de indivíduos saudáveis (grupo controle), com diferença estatística significativa.

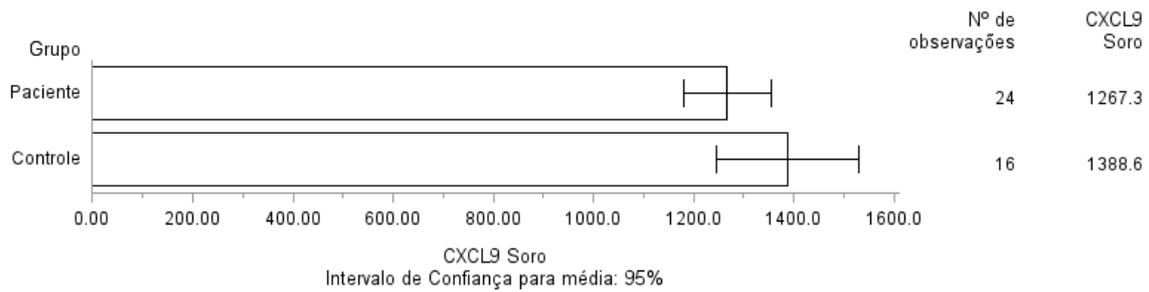
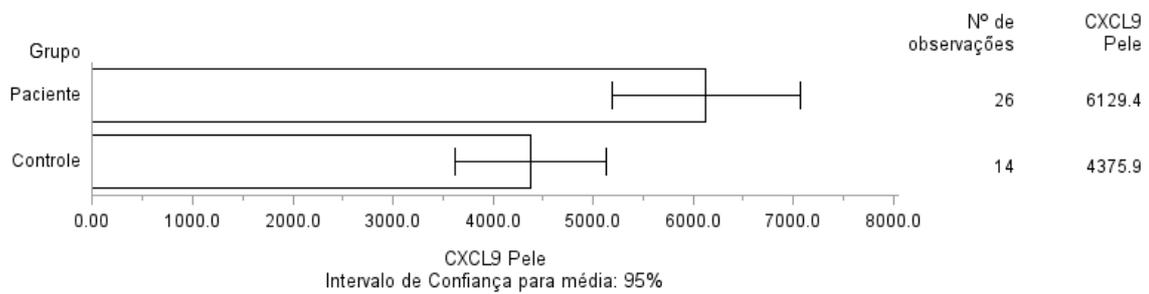


Gráfico 6 – Expressão de CXCL9 no soro de pacientes (grupo paciente) x de indivíduos saudáveis (grupo controle), com diferença estatística significativa.



5.6 Expressão dos marcadores de ativação monocítica nos pacientes e controles

No estudo da expressão dos marcadores de ativação de monócitos (CD14s e CD163s), notou-se relevância estatística quando estes foram analisados em nível sérico ($p = 0,0113$ e $p < 0,0001$, respectivamente) (TABELA 11) (GRÁFICOS 7 e 8).

Tabela 11 – Valores médios da expressão dos marcadores de ativação monocítica nos grupos controles x pacientes, em nível sérico e cutâneo.

Variáveis*	Pacientes	Controles	p [#]
SORO			
CD14s	2579,33 ± 931,34	2071,29 ± 2706,05	0,0113
CD163s	15480,26 ± 1530,29	406,23 ± 213,98	< 0,0001
PELE			
CD14s	2794,56 ± 923,15	2962,33 ± 1440,81	0,4453
CD163s	12574,21 ± 2474,36	10314,25 ± 6438,50	0,7246

* Valores médios ± desvio padrão, em pg/ml

p – valor calculado pelo teste de Mann-Whitney

Gráfico 7 – Expressão de CD14s no soro de pacientes (grupo paciente) x de indivíduos saudáveis (grupo controle), com diferença estatística significativa.

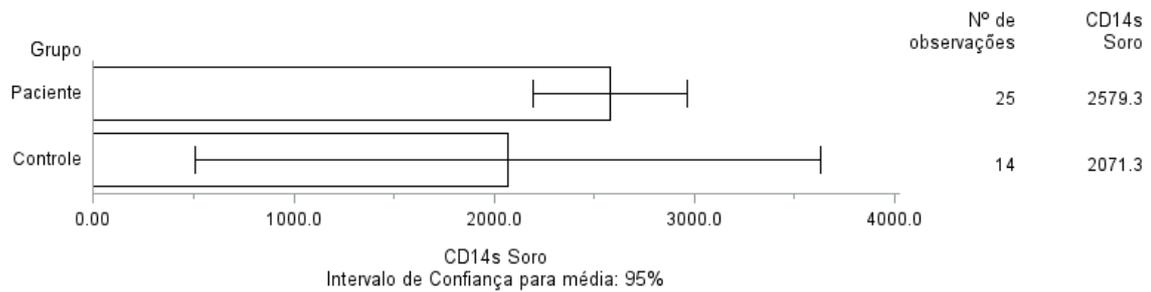
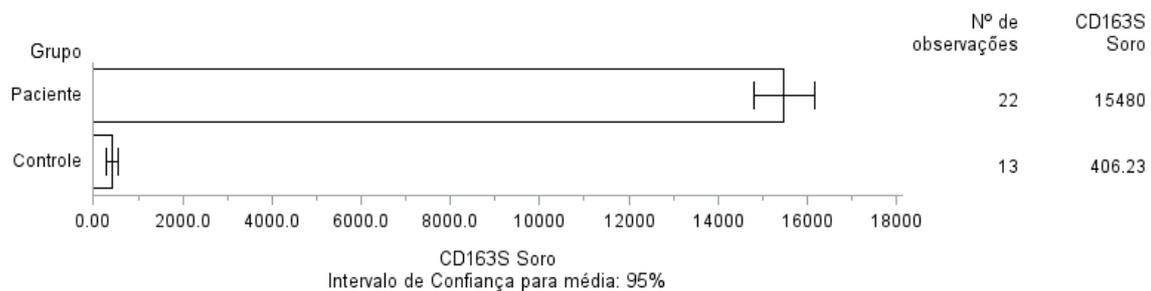


Gráfico 8 – Expressão de CD163s no soro de pacientes (grupo paciente) x de indivíduos saudáveis (grupo controle), com diferença estatística significativa.



5.7 Correlação entre a expressão de citocinas, quimiocinas e marcadores de ativação monocítica e a gravidade da doença aferida pelo PASI

A correlação da gravidade da doença (PASI) também foi pesquisada no que se refere a expressão de citocinas, quimiocinas e marcadores de ativação de monócitos. Não se detectou correlação significativa do PASI com tais parâmetros quando avaliados todos os pacientes (TABELA 12).

Tabela 12 – Correlação entre a expressão de citocinas, quimiocinas e marcadores de ativação monocítica, em nível sérico e cutâneo e o PASI.

Variável Dependente	Variável Independente	N	Coefficiente de correlação (r)*	Intervalo de confiança 95%		p
SORO - Citocinas						
PASI	IL-17	24	-0,04218	-0,438125	0,367466	0,8433
PASI	IL-1beta		**			
PASI	TNF	20	0,06202	-0,391239	0,491063	0,7926
SORO - Quimiocinas						
PASI	CCL2	25	0,26154	-0,148988	0,595165	0,1999
PASI	CXCL9	24	-0,17965	-0,543650	0,241226	0,3950
PASI	CX3CL1	23	0,05639	-0,364284	0,457944	0,7962
SORO - Marcadores de ativação monocítica						
PASI	CD14s	25	-0,02011	-0,411968	0,378024	0,9232
PASI	CD163s	22	-0,05044	-0,462216	0,379236	0,8217

Variável Dependente	Variável Independente	N	Coefficiente de correlação (r)*	Intervalo de confiança 95%		p
----------------------------	------------------------------	----------	--	-----------------------------------	--	----------

PELE - Citocinas

PASI	IL-17	26	-0,03730	-0,418601	0,355187	0,8551
PASI	IL-1beta	26	0,26601	-0,135279	0,592330	0,1825
PASI	TNF	27	0,03747	-0,347489	0,411626	0,8514
PASI	IFN	24	0,13588	-0,283029	0,511254	0,5219
PASI	IL-6	26	-0,08615	-0,458210	0,311602	0,6726

PELE - Quimiocinas

PASI	CCL2	26	0,17439	-0,228389	0,526198	0,3887
PASI	CXCL9	26	-0,04248	-0,422874	0,350641	0,8352
PASI	CX3CL1	27	0,16097	-0,233319	0,509797	0,4174

PELE - Marcadores de ativação monocítica

PASI	CD14s	21	-0,18756	-0,572863	0,265636	0,4090
PASI	CD163s	21	-0,02508	-0,451874	0,411058	0,9131

* Coeficiente de correlação de Pearson

**Não foi possível calcular a correlação entre IL-1beta (soro) e PASI por ausência de informação

Quando subdivididos em grupos de acordo com o valor do PASI, encontrou-se relevância estatística, no subgrupo de doença leve a moderada (PASI < 10), com correlação positiva entre a gravidade da doença e a expressão de CCL2 na amostra lesional (cutânea) ($r = 0,64813$ e $p = 0,0161$) (TABELA 13).

Tabela 13 – Correlação entre a expressão de citocinas, quimiocinas e marcadores de ativação monocítica, em nível sérico e cutâneo e o PASI <10,

Variável Dependente	Variável Independente	N	Coefficiente de correlação (r)*	Intervalo de confiança 95%		p
SORO - Citocinas						
PASI <10	IL-17	12	-0,12672	-0,653123	0,482254	0,6889
PASI <10	IL-1beta		**			
PASI <10	TNF	11	-0,55072	-0,864873	0,073405	0,0669
SORO - Quimiocinas						
PASI <10	CCL2	11	-0,24225	-0,735277	0,418428	0,4623
PASI <10	CXCL9	11	0,17264	-0,476590	0,700021	0,6038
PASI <10	CX3CL1	13	0,06968	-0,500523	0,597716	0,8179
SORO - Marcadores de ativação monocítica						
PASI <10	CD14s	11	-0,16616	-0,696600	0,481733	0,6177
PASI <10	CD163s	11	0,01307	-0,591440	0,608179	0,9689
PELE - Citocinas						
PASI <10	IL-17	12	-0,03540	-0,597173	0,549665	0,9114
PASI <10	IL-1beta	12	-0,15987	-0,672106	0,455857	0,6125
PASI <10	TNF	12	-0,08123	-0,625949	0,516764	0,7981
PASI <10	IFN	10	-0,18925	-0,731691	0,499947	0,5918
PASI <10	IL-6	12	0,13634	-0,474702	0,658703	0,6664

Variável Dependente	Variável Independente	N	Coefficiente de correlação (r)*	Intervalo de confiança 95%		p
---------------------	-----------------------	---	---------------------------------	----------------------------	--	---

PELE - Quimiocinas

PASI <10	<u>CCL2</u>	<u>12</u>	<u>0,64813</u>	<u>0,118195</u>	<u>0,890718</u>	<u>0,0161</u>
PASI <10	CXCL9	12	-0,17142	-0,678568	0,446394	0,5865
PASI <10	CX3CL1	13	-0,13929	-0,641077	0,445915	0,6437

PELE - Marcadores de ativação monocítica

PASI <10	CD14s	10	-0,11935	-0,696628	0,551737	0,7370
PASI <10	CD163s	10	0,01423	-0,620961	0,638138	0,9682

* Coeficiente de correlação de Pearson

**Não foi possível calcular a correlação entre IL-1beta (soro) e PASI < 10 por ausência de informação

No subgrupo de doença moderada a grave (PASI entre 10 e 20), por sua vez, a correlação positiva com a gravidade foi confirmada com relação a mesma quimiocina em nível sérico (CCL2) ($r = 0,80168$ e $p = 0,0094$), porém, em nível sérico (TABELA 14).

Tabela 14 – Correlação entre a expressão de citocinas, quimiocinas e marcadores de ativação monocítica, em nível sérico e cutâneo e o PASI entre 10 a 20,

Variável Dependente	Variável Independente	N	Coefficiente de correlação (r)*	Intervalo de confiança 95%		p
SORO - Citocinas						
PASI 10-20	IL-17	8	0,01852	-0,695224	0,713878	0,9644
PASI 10-20	IL-1beta			**		
PASI 10-20	TNF	8	-0,11455	-0,758035	0,641939	0,7818

Variável Dependente	Variável Independente	N	Coefficiente de correlação (r)*	Intervalo de confiança 95%		p
---------------------	-----------------------	---	---------------------------------	----------------------------	--	---

SORO - Quimiocinas

PASI 10-20	<u>CCL2</u>	<u>8</u>	<u>0,80168</u>	<u>0,222969</u>	<u>0,962574</u>	<u>0,0094</u>
PASI 10-20	CXCL9	10	0,16571	-0,517957	0,720195	0,6396
PASI 10-20	CX3CL1	6	0,15980	-0,748884	0,859848	0,7567

SORO - Marcadores de ativação monocítica

PASI 10-20	CD14s	9	0,28134	-0,470734	0,796619	0,4509
PASI 10-20	CD163s	7	-0,69681	-0,950897	0,118345	0,0653

PELE - Citocinas

PASI 10-20	IL-17	7	-0,40689	-0,887889	0,499097	0,3490
PASI 10-20	IL-1beta	7	0,05034	-0,730408	0,774054	0,9125
PASI 10-20	IFN	7	0,23787	-0,627612	0,840390	0,5975
PASI 10-20	IL-6	7	0,21093	-0,644502	0,831855	0,6409
PASI 10-20	TNF	8	-0,38342	-0,856642	0,440181	0,3327

PELE - Quimiocinas

PASI 10-20	CCL2	7	0,21268	-0,643431	0,832417	0,6380
PASI 10-20	CXCL9	7	0,12251	-0,694632	0,801614	0,7883
PASI 10-20	CX3CL1	7	-0,61228	-0,934470	0,261225	0,1254

PELE - Marcadores de ativação monocítica

Variável Dependente	Variável Independente	N	Coefficiente de correlação (r)*	Intervalo de confiança 95%		p
PASI 10-20	CD14s	5	0,80599	-0,264018	0,986651	0,0844
PASI 10-20	CD163s	5	-0,27750	-0,931668	0,800832	0,6467

* Coeficiente de correlação de Pearson

**Não foi possível calcular a correlação entre IL-1beta (soro) e PASI entre 10 e 20 por ausência de informação

Por último, no subgrupo de doença grave (PASI > 20), contudo, observou-se que, quanto maior o valor da expressão da quimiocina CX3CL1 no soro ($r = 0,96944$ e $p = 0,0247$) e da citocina IFN na pele ($r = 0,81743$ e $p = 0,0148$) e, maior a gravidade da doença (TABELA 15).

Tabela 15 – Correlação entre a expressão de citocinas, quimiocinas e marcadores de ativação monocítica, em nível sérico e cutâneo e o PASI > 20,

Variável Dependente	Variável Independente	N	Coefficiente de correlação (r)*	Intervalo de confiança 95%		p
SORO - Citocinas						
PASI > 20	IL-17	4	-0,50965	-0,987192	0,884856	0,5102
PASI > 20	IL-1beta			**		
PASI > 20	TNF			**		
SORO - Quimiocinas						
PASI > 20	CCL2	6	-0,35815	-0,906290	0,639199	0,4734
PASI > 20	CXCL9			**		
PASI > 20	<u>CX3CL1</u>	<u>4</u>	<u>0,96944</u>	<u>0,122408</u>	<u>0,999384</u>	<u>0,0247</u>

SORO - Marcadores de ativação monocítica

Variável Dependente	Variável Independente	N	Coefficiente de correlação (r)*	Intervalo de confiança 95%		p
SORO - Marcadores de ativação monocítica						
PASI > 20	CD14s	5	-0,46978	-0,955867	0,704467	0,4164
PASI > 20	CD163s	4	0,21429	-0,940492	0,974647	0,7948
PELE - Citocinas						
PASI > 20	IL-17	7	0,11569	-0,698196	0,799127	0,7999
PASI > 20	IL-1beta	7	0,63073	-0,233003	0,938176	0,1106
PELE - Quimiocinas						
PASI > 20	<u>IFN</u>	<u>7</u>	<u>0,81743</u>	<u>0,167452</u>	<u>0,972094</u>	<u>0,0148</u>
PASI > 20	IL-6	7	0,01643	-0,745859	0,760082	0,9714
PASI > 20	TNF	7	-0,02255	-0,762657	0,743128	0,9608
PELE - Marcadores de ativação monocítica						
PASI > 20	CCL2	7	0,15004	-0,679831	0,811417	0,7417
PASI > 20	CXCL9	7	-0,09944	-0,793107	0,706526	0,8277
PASI > 20	CX3CL1	7	-0,34003	-0,870249	0,555194	0,4417
PASI > 20	CD14s	6	-0,19828	-0,869865	0,730895	0,6995
PASI > 20	CD163s	6	-0,16081	-0,860121	0,748424	0,7552

* Coeficiente de correlação de Pearson

**Não foi possível calcular a correlação entre IL-1beta, TNF e CXCL9 (soro) e PASI > 20 por ausência de informação

5.8 Correlações adicionais entre todos os parâmetros inflamatórios

Além do recém-exposto, pesquisou-se, por análise estatística, possíveis correlações positivas entre os parâmetros inflamatórios das amostras séricas e cutâneas nos pacientes: a frequência das subpopulações de monócitos intermediários e não clássicos e as expressões dos marcadores inflamatórios (citocinas, quimiocinas e marcadores de ativação monocítica) (ANEXO 5).

A TABELA 16 mostra as que apresentaram relevância estatística. A frequência dos monócitos não clássicos se correlacionou positivamente com a expressão de CCL2 nas lesões cutâneas ($r = 0,48180$, $p = 0,0140$). A expressão da citocina IFN nas lesões cutâneas de psoríase revelou correlação (positiva) com a expressão da quimiocina CXCL9 também das lesões ($r = 0,41550$, $p = 0,0486$); a expressão da citocina IL-17 em nível sérico se correlacionou com a expressão das quimiocinas CX3CL1 ($r = 0,43450$, $p = 0,0492$) e CXCL9 ($r = 0,49239$, $p = 0,0192$) também séricas; e a expressão da citocina TNF sérica se correlacionou com a da citocina CX3CL1 sérica ($r = 0,45674$, $p = 0,0496$). Por sua vez, a expressão da quimiocina CXCL9 nas lesões de pele se correlacionou positivamente com as expressões as citocinas IL-17 ($r = 0,86244$, $p = <.0001$) e TNF ($r = 0,83157$, $p = <.0001$) séricas e com a da quimiocina CX3CL1 sérica ($r = 0,57658$, $p = 0,0044$). Também foi demonstrada correlação positiva da expressão de CX3CL1 sérica com a de CXCL9 sérica ($r = 0,52517$, $p = 0,0203$). Por último, a expressão do marcador de ativação monocítica CD14s da pele dos pacientes se correlacionou positivamente com a sua expressão no soro dos mesmos ($r = 0,89925$, $p = <.0001$).

Tabela 16 – Parâmetros inflamatórios que apresentaram correlação positiva entre si nas amostras séricas e cutâneas dos pacientes.

Variável	Com variável	Coeficiente de correlação (r)*	Intervalo		p
			de confiança 95%		
Monócitos não clássicos (pele)	CCL2 (pele)	r = 0,48180	0,097317	0,741149	0,0140
IL-17 (soro)	CX3CL1 (soro)	0,43450	-0,009933	0,735584	0,0492
TNF (soro)	CX3CL1 (soro)	0,45674	-0,012879	0,761275	0,0496
CXCL9 (pele)	IL-17 (soro)	0,86244	0,686237	0,943031	<.0001
CXCL9 (pele)	IFN (pele)	0,41550	-0,007407	0,712324	0,0486
CXCL9 (pele)	TNF (soro)	0,83157	0,584575	0,937504	<.0001
CXCL9 (pele)	CX3CL1 (soro)	0,57658	0,192911	0,807323	0,0044
CXCL9 (soro)	CX3CL1 (soro)	0,52517	0,077238	0,796700	0,0203
CXCL9 (soro)	IL-17 (soro)	0,49239	0,077090	0,762089	0,0192
CD14s (pele)	CD14s (soro)	0,89925	0,745277	0,962171	<.0001

r = coeficiente de correlação de Pearson

IC = intervalo de confiança

p = p-valor calculado com o teste de Mann-Whitney

5.9 Resumo dos achados positivos do estudo

Por fins didáticos, resume-se a seguir os achados positivos do presente estudo. Primeiramente, demonstra-se os dados relativos a subpopulações de monócitos e a marcadores de ativação monocítica (TABELA 17). A seguir, os dados relativos a citocinas e quimiocinas (TABELA 18).

Tabela 17 – Achados observados no estudo quanto às subpopulações de monócitos e aos marcadores de ativação monocítica.

Parâmetro	Tipo de amostra	Achado	Estatística
Monócitos não clássicos	Sangue periférico	Correlação positiva com pacientes que apresentaram PASI 10-20 (doença moderada a grave)	r = 0,81467 IC (0,258261-0,965229) p = 0,0073
	Pele	Correlação positiva com a expressão de CCL2 nas lesões de pele	r = 0,48180 IC (0,097317-0,741149) p = 0,0140
sCD14	Soro	Maior expressão nos pacientes que em controles	Pts = 2579.33 ± 931.34 Cts = 2071.29 ± 2706.05 p = 0,0113
		Correlação positiva com sCD14 nas lesões de pele	r = 0,89925 IC (0,745277-0,962171) p < 0,0001
sCD163	Soro	Maior expressão nos pacientes que em controles	Pts = 15480,26 ± 1530,29 Cts = 406.23 ± 213.98 p < 0,0001

r = coeficiente de correlação de Pearson

IC = intervalo de confiança

p = p-valor calculado com o teste de Mann-Whitney

Pts = pacientes +- desvio padrão

Cts = controles +- desvio padrão

Tabela 18 – Achados observados no estudo quanto às citocinas e quimiocinas.

Parâmetro	Tipo de amostra	Achado	Estatística
IL-17	Soro	Correlação positiva com a expressão de CX3CL1 no soro dos pacientes	r = 0,43450 IC (-0,009933-0,735584) p = 0,0492
IL-1 beta	Pele	Maior expressão nos pacientes que em controles	Pts = 77.19 ± 101.12 Cts = 32.07 ± 61.88 p = 0,0089
TNF	Soro	Correlação positiva com a expressão de CX3CL1 no soro dos pacientes	r = 0,45674 IC (-0,012879-0,761275) p = 0,0496

Parâmetro	Tipo de amostra	Achado	Estatística
TNF	Pele	Maior expressão nos pacientes que em controles	Pts = 134.22 ± 217.35 Cts = 0,00±0,00 p < 0,0001
IFN	Pele	Correlação positiva com pacientes apresentando PASI > 20 (doença grave)	r = 0,81743 IC (0,167452-0,972094) p = 0,0148
CCL2	Soro	Correlação positiva com pacientes apresentando PASI 10-20 (doença moderada a grave)	r = 0,80168 IC (0,222969-0,962574) p = 0,0094
	Pele	Correlação positiva com pacientes apresentando PASI < 10 (doença leve a moderada)	r = 0,64813 IC (0,118195-0,890718) p = 0,0161
CXCL9	Soro	Maior expressão nos pacientes que em controles	Pts = 1267.33 ± 208.61 Cts = 1388.56 ± 267.14 p = 0,0453
		Correlação positiva com a expressão de IL-17 no soro dos pacientes	r = 0,49239 IC (0,077090-0,762089) p = 0,0192
		Correlação positiva com a expressão de CX3CL1 no soro dos pacientes	r = 0,52571 IC (0,077238-0,796700) p = 0,0203
	Pele	Maior expressão nos pacientes que em controles	Pts = 6129.38 ± 2328.58 Cts = 4375.93 ± 1313.44 p = 0,0002
		Correlação positiva com a expressão de IL-17 no soro dos pacientes	r = 0,88244 IC (0,686237-0,943031) p < 0,0001
		Correlação positiva com a expressão de TNF no soro dos pacientes	r = 0,83157 IC (0,584575-0,937504) p < 0,0001
		Correlação positiva com a expressão de IFN nas lesões de pele	r = 0,41550 IC (0,007407-0,712324) p = 0,0486

Parâmetro	Tipo de amostra	Achado	Estatística
CXCL9	Pele	Correlação positiva com a expressão de CX3CL1 no soro dos pacientes	r = 0,57658 IC (0,192911-0,807323) p = 0,0044
CX3CL1	Soro	Correlação positiva com pacientes apresentando PASI > 20 (doença grave)	r = 0,96944 IC (0,122408-0,999384) p = 0,0247

r = coeficiente de correlação de Pearson

IC = intervalo de confiança

p = p-valor calculado com o teste de Mann-Whitney

Pts = pacientes +- desvio padrão

Cts = controles +- desvio padrão

6 DISCUSSÃO

6.1 Sobre os dados epidemiológicos das amostras

No tocante às amostras estudadas, os pacientes (n = 32) e controles (n = 32) estavam pareados quanto ao sexo, mas não por idade. No entanto, acredita-se que diferença estatística entre as idades dos pacientes e indivíduos saudáveis não seja um fator que interfira negativamente na validade dos resultados, considerando que a psoríase é uma doença que pode acometer pessoas de qualquer idade, sem predileção por faixa etária(3,9).

6.2 Sobre as limitações do presente estudo: possíveis implicações e repercussões nos resultados

O período de coleta das amostras dos pacientes e controles se deu de junho de 2015 a dezembro de 2016. Neste intervalo de tempo, a disponibilidade de recursos, em especial de reagentes para os experimentos, foi variável e progressivamente reduzida, motivo pelo qual os sujeitos do estudo foram avaliados de maneira não uniforme quanto aos parâmetros (ANEXO 4). Acredita-se que esta limitação, possa ter afetado alguns de nossos resultados como será referido a seguir, a exemplo da análise das subpopulações de monócitos, na qual obteve-se os resultados de 25 pacientes e 8 controles. Ou a exemplo da expressão de duas citocinas, IFN e IL-6, das quais somente as amostras cutâneas foram avaliadas, na tentativa de se priorizar resultados de maior confiabilidade e reprodutibilidade considerando que alguns autores alegam superioridade das análises de pele em relação às séricas(73).

A não concretização das análises completas como idealizaram os autores no momento do desenho do estudo, entretanto, não deve dirimir o valor do mesmo uma vez que o número de sujeitos, em especial o de controles, embora reduzido, ainda pode ser considerado

satisfatório. E, embora deva ser levada em consideração tal redução diante dos resultados encontrados e apresentada como possível fator contribuinte para achados inesperados ou divergentes da literatura atual, o presente estudo trata de forma inédita, em um número considerável de pacientes e indivíduos saudáveis, não apenas de parâmetros inflamatórios já consagrados para a doença, mas também de muitos ainda pouco avaliados em pacientes psoriásicos, em amostras tanto sanguíneas / séricas quanto cutâneas, relacionando-os com a gravidade da doença e entre si.

6.3 Sobre os achados referentes as subpopulações de monócitos nas amostras sanguíneas e cutâneas: comparação entre pacientes e controles e correlação com a gravidade da doença

Os monócitos são células mononucleares circulantes considerados precursoras sistêmicas de macrófagos teciduais e células dendríticas inflamatórias. Além desse papel, os monócitos funcionam como importantes efetores inatos contra patógenos por meio da fagocitose, da produção de espécies reativas de oxigênio¹⁴ e da liberação de citocinas pró-inflamatórias. Devido a isso, recentemente, vários estudos têm procurado entender a participação das células monocíticas na patogênese de muitas doenças inflamatórias crônicas, como artrite reumatóide(74), Doença de Crohn(75), doenças cardiovasculares(39) e esclerose múltipla múltipla (60).

No presente estudo, buscou-se investigar o comportamento das subpopulações de monócitos na psoríase vulgar, que é uma doença inflamatória de curso crônico. O primeiro paciente avaliado, por meio da citometria de fluxo, demonstrou aumento das subpopulações

¹⁴ Espécies reativas de oxigênio: são compostos químicos resultantes da ativação ou redução do oxigênio molecular, como o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio, o radical hidroxila e o deoxigênio singlete. O seu aumento está relacionado ao estresse oxidativo, que pode acarretar em danos nas estruturas celulares desde membranas lipídicas até o DNA.

monocíticas inflamatórias, ou seja, de monócitos não clássicos e intermediários, no sangue periférico. Contudo, ao comparar as amostras sanguíneas e cutâneas de pacientes e indivíduos saudáveis, não foram detectadas diferenças estatísticas significantes entre os grupos. Apesar disso, e embora os dados sobre as subpopulações de monócitos nos pacientes portadores de psoríase ainda sejam muito escassos, pesquisadores na Grécia(42), ao avaliarem, também por citometria de fluxo, 15 pacientes psoriásicos e 15 controles, em nível sanguíneo somente, encontraram diferença estatística. Como mencionado anteriormente, acredita-se que uma das possíveis limitações do estudo em questão, embora pioneiro ao avaliar amostras não apenas amostras sanguíneas como também cutâneas, foi quanto ao número de sujeitos avaliados ao final (25 pacientes e 8 controles) (TABELA 4 e ANEXO 4), o que aconteceu devido à menor disponibilidade de recursos materiais do laboratório no qual se realizaram os experimentos e é pertencente a instituição pública e, por vezes, trabalha-se herculeamente com fomentos demasiadamente reduzidos. Um número maior de pacientes e, especialmente de controles em um próximo estudo, poderia trazer maiores esclarecimentos sobre esta questão.

Ainda com relação as subpopulações de monócitos, ao correlacioná-las com a gravidade da doença, aferida pelo PASI, não houve diferença estatística em primeira análise. Posteriormente, ao subdividir os pacientes em 3 grupos de acordo com os valores do PASI – em doença leve a moderada (PASI < 10), doença moderada a grave (PASI entre 10 e 20) e doença grave (PASI > 20) – **encontrou-se relevância estatística com correlação positiva entre monócitos não clássicos no sangue periférico e pacientes portadores de doença moderada a grave** (PASI entre 10 e 20) (TABELA 7). Este achado positivo aponta para o fato esperado de que quanto maior a gravidade da doença, maior a frequência de monócitos inflamatórios, ou seja, intermediários ou não clássicos. Todavia, as demais correlações, mesmo em pacientes com maior gravidade (PASI > 20), não foram confirmadas, o que mais uma vez leva a crer que o número de pacientes estudados precise ser aumentado em um estudo

subsequente – atentando ao fato de que, ao subdividir os pacientes conforme gravidade, reduziu-se sobremaneira o “n” de cada subgrupo. Ressalta-se, entretanto, que esta análise de correlação entre gravidade da doença e subpopulações de monócitos é feito totalmente inédito, não havendo, até a presente data, relatos de estudos semelhantes que possam ser mencionados e comparados a este.

6.4 Sobre os achados referentes as expressões de citocinas, quimiocinas e marcadores de ativação de monócitos nas amostras sanguíneas e cutâneas: comparação entre pacientes e controles e correlação com a gravidade da doença

Como citado anteriormente, os avanços nas últimas três décadas na imunopatogênese da psoríase, foram marcantes, em especial no tocante a participação dos linfócitos(4) e citocinas como TNF e IFN(7). Mais recentemente, outros marcadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas passaram a ser apontadas neste campo, trazendo não apenas maior entendimento da complexa cascata inflamatória que acontece na doença como também perspectivas de novos alvos terapêuticos(76).

Citocinas

Neste estudo, foram selecionadas para análise citocinas com papel bem documentado em doenças inflamatórias. Como citado anteriormente, acredita-se que, na psoríase, um antígeno ainda desconhecido funcione como “gatilho” e faça com que células NK, células dendríticas plasmocitoides e macrófagos secretem TNF, IL-1beta, IFN e IL-6 em pacientes geneticamente suscetíveis(77). A diferenciação de células T CD4+ *naïve* em Th17 acontece sob estímulo de TBG-beta e IL-6, o que acarreta na expressão da citocina IL-17, uma glicoproteína de 15 kDa e cuja desregulação favorece a inflamação crônica, doença autoimune e desenvolvimento tumoral(78). Da família de citocinas das IL-17 (A-F)(79), a IL-17A é

conhecida por ser a mais potente na regulação de genes e por desempenhar um papel no recrutamento de neutrófilos, na defesa do hospedeiro contra patógenos extracelulares e no processo imuno-inflamatória(80), e com isso, é de grande importância para diversos distúrbios imunomediados além da psoríase, como a artrite reumatoide, a Doença de Crohn, a esclerose múltipla e a encefalomielite autoimune(23)(77). Estudos prévios demonstraram elevação no nível sanguíneo de células Th17 IL-17+ de pacientes psoriásicos em comparação com indivíduos controles(81). Entretanto, na análise proposta neste projeto, não se encontrou diferença estatística entre a expressão de IL-17 entre pacientes e controles, seja em nível sérico (24 pacientes x 15 controles), seja em nível cutâneo (26 pacientes x 14 controles), e tampouco foi verificada alguma correlação desta citocina com a gravidade da doença. Novamente, postula-se que se necessite de um “n” maior de sujeitos para que se esclareça a questão.

Outra citocina da qual se avaliou a expressão neste trabalho, foi a IL-1beta (26 pacientes x 14 controles, tanto na análise cutânea quanto na sérica), da família das interleucinas 1 (IL-1), sendo produzida por macrófagos ativados. É reconhecida como citocina biomarcadora da psoríase(82) e artrite psoriásica(83), com sua expressão aumentada em nível sérico, cutâneo e também no líquido sinovial. Autores brasileiros(84), em um estudo restrito a nível sérico, com 53 pacientes e 35 controles, não encontraram significância estatística para esta citocina. Na presente análise, igualmente não se observou diferença nas amostras séricas. Contudo, **houve expressão aumentada da IL-1beta nas lesões cutâneas dos pacientes** em comparação a indivíduos saudáveis (pele aparentemente normal) (TABELA 9). Interessantemente, alguns autores alegam que, embora a coleta de sangue periférico seja mais prática e viável quando comparada à realização de uma biópsia cutânea, os resultados usando amostras séricas para certas citocinas e quimiocinas são comparativamente menos reprodutíveis que as cutâneas(73), o que pode ter acontecido nas presentes amostras estudadas.

O TNF, uma citocina que é secretada por um grande número de células (entre elas, macrófagos, células T, células NK e queratinócitos), tem seu papel bem documentado na patogênese da psoríase, corroborado pelo sucesso terapêutico bastante reconhecido das drogas inibidores de TNF na psoríase e artrite psoriásica(85). Numerosos estudos revelam níveis séricos significativamente aumentados desta citocina em pacientes psoriásicos quando comparados aos de amostras sem a doença(86). No presente projeto, não se encontrou diferença significativa nas amostras de soro (20 pacientes x 10 controles), o que também já foi relatado por outros autores(87). Novamente, como aconteceu com **a citocina IL-1beta, nas amostras cutâneas (27 pacientes x 14 controles), a diferença foi, todavia, significativa**. O número menor de indivíduos avaliados em nível sérico pode justificar a diferença que foi não observada. Ou, como postulado anteriormente, a reprodutibilidade das amostras cutâneas possa ser realmente superior quando comparadas as de nível sérico. Tal questionamento (sobre qual tipo de amostra seria mais adequada e teria maior acurácia) é de difícil conclusão dada a escassez de estudos que comparem amostras sanguíneas/séricas com cutâneas; afinal, a invasividade (que gera dano tecidual, dor e maior risco de complicações pós-procedimento) inerente às biópsias de pele é inegavelmente um entrave, uma dificuldade na coleta do material. Entretanto, estudos mais recentes apontam para novas formas promissoras não invasivas de se coletar amostras cutâneas. Exemplo disto seria o emprego da análise proteômica(88), para a qual um simples “raspado” ou uma amostra de pele colhida por fita adesiva seria suficiente.

O IFN, conhecido como interferon-gama ou interferon tipo II, é uma citocina com desempenho crítico na imunidade inata e adaptativa em humanos. É produzido, especialmente por linfócitos T e células NK, em resposta a IL-12 e também a estímulo microbiano, e é um importante ativador de macrófagos e uma das citocinas-chaves que levam a diferenciação de células T *naïve* em Th1(89), justificando assim sua participação na patogênese na doença psoriásica. Publicações anteriores demonstraram aumento nos níveis circulatórios de IFN (IFN-

gama) nos pacientes com psoríase comparados a controles(19)(90). No presente estudo, por limitação de recurso material e por haverem poucos estudos em amostras de pele, como justificado no início desta seção, os autores optaram por realizar unicamente análise cutânea (24 pacientes x 12 controles). Não foi observada diferença estatística entre os grupos. Contudo, ao se correlacionar com gravidade da doença, **notou-se que, nos pacientes com maior gravidade clínica (PASI > 20), os níveis lesionais (pele afetada) de IFN eram significativamente maiores** (TABELA 15), o que seria o esperado dentro do contexto clínico-patológico, ou seja, quanto maior a gravidade clínica, maiores as expressões de mediadores inflamatórios.

A última citocina contemplada por este estudo foi a IL-6 que, como já citado, apresenta papel fundamental na diferenciação de células T *naïve* em células Th17 e, por isso, tem sido apontada como promissor alvo terapêutico(91). Níveis séricos aumentados desta citocina já foram relatados em pacientes com psoríase vulgar(19) e, adicionalmente, formas consideradas mais graves, como as pustulosas, têm sido relacionados à IL-6 dada a sua capacidade de recrutamento de neutrófilos(92). Pelo mesmo motivo de limitação de recurso material acima mencionado, unicamente a análise de amostras cutâneas foi realizada (26 pacientes x 14 controles), não sendo, contudo, observada diferença estatística da sua expressão cutânea entre os grupos ou correlação com a gravidade da doença. Uma vez mais, acredita-se que o número de sujeitos avaliados possa ter comprometido os resultados encontrados.

Quimiocinas

Alguns autores consideram que as quimiocinas são encontradas, no sangue periférico, em níveis comparativamente maiores que as citocinas, tornando-as um alvo mais conveniente e confiável para a quantificação(93)(94). Estudos prévios relataram níveis aumentados de CCL2 em pacientes com psoríase e outros distúrbios cutâneos(95). Esta quimiocina é produzida pelos queratinócitos e sua ação é sinergicamente ampliada por citocinas como TNF e IFN-

gama(96). No projeto presente desenvolvido, não foi notada diferença estatística entre os níveis séricos (25 pacientes x 13 controles) ou cutâneos de CCL2 (26 pacientes x 14 controles), embora tenha sido encontrado um valor muito próximo à significância ($p = 0,0508$) na análise da expressão de CCL2 no soro (TABELA 10). No intuito de se correlacionar à gravidade da doença, contudo, **notou-se relação positiva entre a expressão de CCL2 das amostras cutâneas dos pacientes com doença leve a moderada (PASI < 10) e de CCL2 das amostras séricas dos pacientes com doença moderada a grave (PASI 10-20)** (TABELAS 13 e 14, respectivamente). Estes achados estão em concordância com a literatura, que aponta a CCL2 como um potencial biomarcador para monitorizar a progressão da psoríase(95).

A CXCL9 é uma das mais quimiocinas mais citadas na psoríase(47) e estudos prévios apontaram para níveis elevados da mesma em pacientes quando comparados a controles e também sua redução após tratamento(94). Acredita-se que os neutrófilos, trazidos ao tecido por ação quimiotática por estímulo da IL-8, além da capacidade de promover ruptura dos desmossomos de queratinócitos e formação dos microabcessos de Munro(97) característicos das lesões cutâneas de psoríase, também liberem mediadores quimiotáticos – entre eles, a CXCL9(52). Esta quimiocina tem ação inflamatória reconhecida uma vez que recruta leucócitos para os tecidos afetados, ajudando na perpetuação do processo inflamatório. Como esperado, neste estudo, **observou-se diferença estatística entre pacientes e controles tanto no nível sérico** (24 pacientes x 16 controles) **quanto cutâneo** (26 pacientes x 14 controles) (TABELA 10). Na correlação entre a gravidade da doença e a expressão de CXCL9, porém, não houve relevância estatística.

A quimiocina CX3CL1, também conhecida como fractalquina, representa o único membro conhecido da família CX3C e é um fator quimiotático único existente tanto na forma solúvel, quanto na forma ligada à membrana. Estudos prévios demonstraram a expressão de CX3CL1 nas células endoteliais ampliando a resposta das células Th1 e identificaram-na

altamente presente nas células dendríticas e queratinócitos de pacientes com psoríase(54,98,99). Neste projeto, não foram encontradas diferenças entre os níveis de CX3CL1, sejam séricos (23 pacientes x 12 controles) ou cutâneos (21 pacientes x 14 controles). Quando pesquisada a relação desta quimiocina com a gravidade da doença, **encontrou-se relação positiva entre elas nos pacientes de maior gravidade (PASI > 20) (TABELA 15).**

Marcadores de ativação monocítica

Especificamente com relação às formas solúveis dos marcadores CD14 e CD163, são escassas as publicações científicas sobre pacientes psoriásicos. O CD14 é um marcador de diferenciação mielóide encontrado primariamente em monócitos e macrófagos e, em menores níveis, em neutrófilos. No contexto de ativação celular, a expressão do CD14 de superfície diminui nos monócitos e a forma solúvel (CD14s) é liberada na circulação.(100) O CD14s tem sido apontado como biomarcador em diferentes situações, a exemplo de: doenças pulmonares(101), portadores do HIV(102), aterosclerose(103), neutropenia febril(104), etc. Em uma publicação mais antiga, datada do ano de 1993, na qual se coletou amostras séricas e cutâneas (por bolhas de sucção), os níveis de CD14s foram maiores no soro de portadores de psoríase em relação a controles, o que não se repetiu nas amostras de pele adquiridas. Nesta mesma publicação, não houve correlação dos níveis de CD14s com a gravidade da doença, aferida pelo PASI.(61)

O CD163 é um receptor expresso em monócitos, macrófagos e neutrófilos. A sua forma solúvel (CD163s), que pode ser liberada após proteólise por estímulos diversos, tem sido apontada como biomarcador e preditor prognóstico em condições inflamatórias como esclerose múltipla, sepse, doença hepática, hanseníase, leishmaniose e portadores do HIV(60)(105)(106)(107). Um estudo em pacientes com linfoma T cutâneo revelou maiores níveis de CD163s nas lesões e também no soro dos mesmos e que esta elevação se correlacionava a pior prognóstico da doença. Os mesmos autores encontraram que os níveis

séricos deste marcador também se encontravam aumentados em pacientes com dermatite atópica e psoríase quando comparados a indivíduos saudáveis(108). No presente projeto, **observou-se maior expressão de ambos os biomarcadores (CD14s e CD163s) no soro dos pacientes em relação aos indivíduos sem a doença** (CD14s: 25 pacientes x 14 controles; CD163s: 22 pacientes x 13 controles) (TABELA 11). Por serem biomarcadores na forma solúvel, era esperado que apresentassem maior expressão sérica que em nível cutâneo. Não foi observada diferença nas amostras cutâneas (CD14s: 21 pacientes x 17 controles; CD163s: 21 pacientes x 17 controles) e nem correlação da expressão CD14s e CD163s, sérico ou cutâneo, com a gravidade da doença aferida pelo PASI.

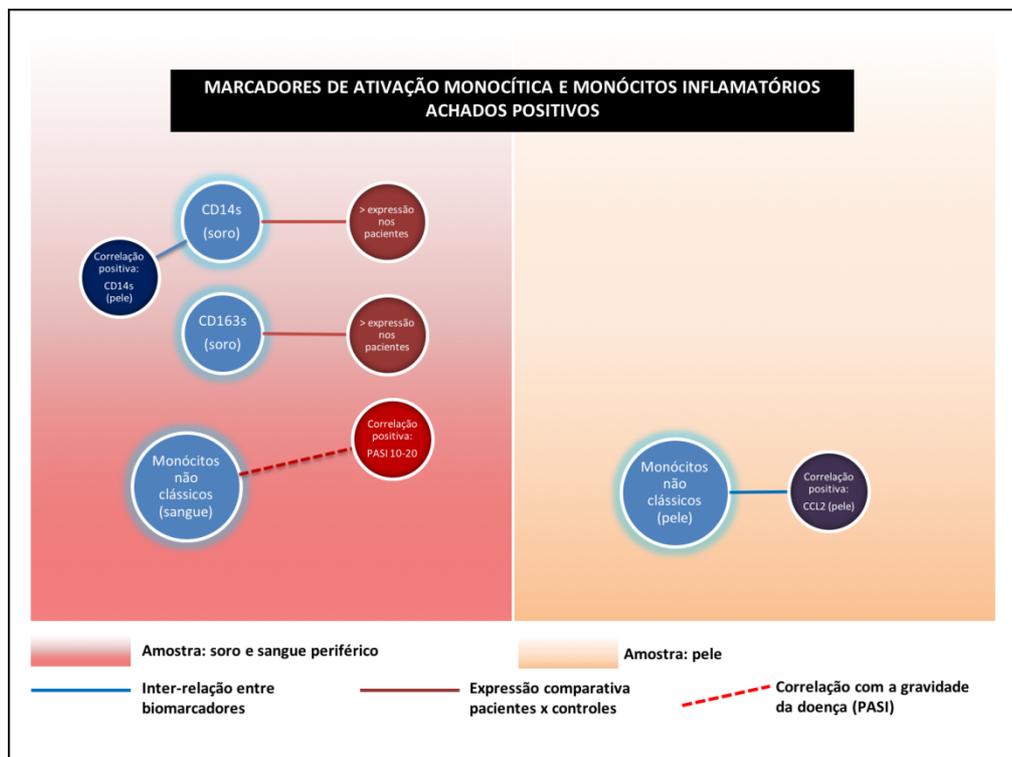
6.5 Sobre as inter-relações entre todos os parâmetros inflamatórios estudados

No grupo dos pacientes, pesquisou-se as correlações entre todos os parâmetros inflamatórios estudados: as frequências das subpopulações de monócitos pró-inflamatórios (intermediários e não clássicos) e as expressões dos biomarcadores inflamatórios (citocinas, quimiocinas e marcadores de ativação monocítica). Embora alguns autores tenham previamente aventado sobre as inter-relações existentes entre os mediadores inflamatórios, são poucas as publicações(109) neste campo e não foi encontrada, até o momento, alguma exclusivamente em pacientes com psoríase, como se realizou no presente estudo. As correlações apontadas na TABELA 16 corroboram para a atual crença de que a cascata inflamatória envolvida na imunopatogênese da psoríase é complexa e vários dos parâmetros de inflamação têm sua ação interferindo e sendo interferida entre si, um fenômeno denominado “cross talk” (“conversa cruzada” na tradução literal) e já relatado anteriormente em outros contextos inflamatórios(110). No contexto de psoríase, contudo, esta inter-relação foi aventada previamente entre queratinócitos e células T(111), sendo ainda feito inédito entre biomarcadores inflamatórios, como no presente estudo.

6.6 Sobre todos os achados positivos do estudo

Em última análise, diante do aparato de todos os achados positivos do estudo, notou-se que a maior parte dos parâmetros esteve correlacionado positivamente com pelo menos um marcador inflamatório ou com a gravidade da doença, ou que determinado(s) parâmetro(s) foi(foram) mais proeminente(s) nos pacientes do que nos controles (TABELAS 17 e 18) (FIGURAS 8-10).

Figura 8 – Achados positivos quanto a subpopulações de monócitos e marcadores de ativação monocítica no presente estudo.

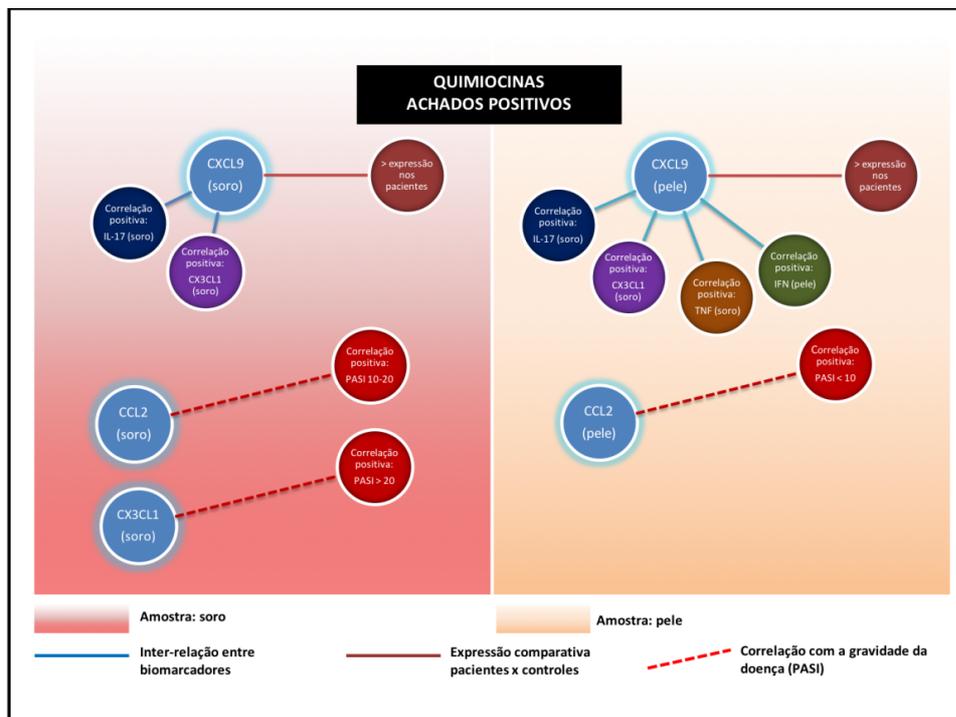


No tocante às subpopulações de monócitos e aos marcadores de ativação monocítica (TABELA 17) (FIGURA 8), encontrou-se relação positiva dos monócitos não clássicos do sangue periférico com os pacientes que apresentaram doença moderada a grave (PASI 10-20), com $r = 0,81467$ e $p = 0,0073$. Estes mesmos monócitos quando avaliados nas lesões cutâneas, apresentaram correlação positiva com a expressão da quimiocina CCL2 também nas lesões de psoríase ($r = 0,48189$, $p = 0,0140$). Não existem estudos semelhantes até a data atual, mas

acredita-se que estas informações de correlação possam ser úteis de alguma forma para o entendimento da complexidade do processo inflamatório que acontece na psoríase.

No que diz respeito a citocinas e quimiocinas (TABELA 18), observou-se que a expressão de CXCL9 apresentou o maior número de inter-relações com os demais parâmetros.

Figura 9 – Achados positivos quanto a quimiocinas no presente estudo.



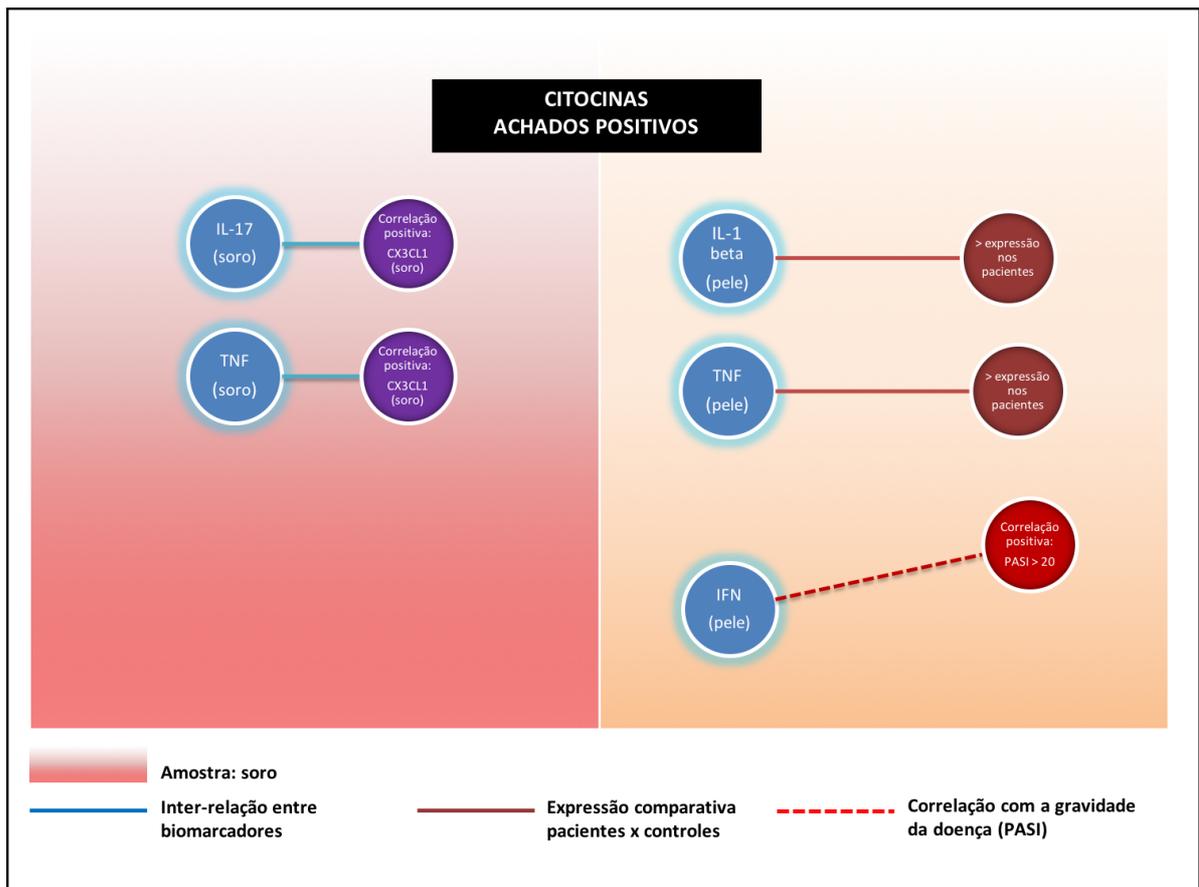
Como apontado anteriormente, esta quimiocina foi maior nas amostras de pele e soro de pacientes do que nas de indivíduos saudáveis (FIGURA 9). Além disso, a expressão de CXCL9 no soro se correlacionou positivamente com a expressão de IL-17 e CX3CL1 também séricos ($r = 0,49239$, $p = 0,0192$ / $r = 0,52571$, $p = 0,0203$, respectivamente). Por sua vez, a expressão de CXCL9 nas placas da pele correlacionou-se positivamente com: IL-17, TNF e CX3CL1 dos soros dos pacientes ($r = 0,88244$, $p < 0,001$ / $r = 0,83157$, $p < 0,001$ / $r = 0,57658$, $p = 0,0044$, respectivamente) e com o IFN das lesões cutâneas dos pacientes ($r = 0,41550$, $p = 0,0486$). Apesar da ausência de estudos prévios semelhantes, estes achados corroboram para a importância da quimiocina CXCL9 e seu potencial como biomarcador da doença. A expressão

da quimiocina CCL2 no soro e na pele se correlacionou positivamente com a gravidade da doença em pacientes com psoríase moderada a grave (PASI 10-20) ($r = 0,80168$, $p = 0,0094$) e com doença leve a moderada (PASI < 10) ($r = 0,64813$, $p = 0,0161$), respectivamente, e a expressão de CX3CL1 no soro com psoríase grave (PASI > 20) ($r = 0,96944$, $p = 0,0247$). Estes achados, embora demonstrem correlação positiva com a gravidade doença, o que seria esperado pelos autores do presente estudo, devem ser devidamente ponderados, pois podem ter surgido, contudo, pelo fato de se segmentar os pacientes segundo gravidade, acarretando em uma redução importante no número de pacientes por subgrupo. De qualquer forma, a positividade destes achados em espécimes cutâneos reforça a ideia já citada e defendida por alguns autores que acreditam na maior confiabilidade e reprodutibilidade das amostras de pele quando comparadas às amostras de soro na análise de quimiocinas (9). Reforça também a possibilidade destes parâmetros inflamatórios como importantes biomarcadores para a doença e a necessidade de esclarecimento sobre quais deveriam ser elencados para triagem, prognóstico e acompanhamento terapêutico de pacientes.

Das citocinas estudadas (FIGURA 10), a expressão de IL-17 e TNF em nível sérico se correlacionaram positivamente com a expressão da quimiocina CX3CL1 também sérica ($r = 0,43450$, $p = 0,0492$ / $r = 0,45674$, $p = 0,0496$, respectivamente). Por não existirem relatos prévios comparativos, este achado aventa novas possibilidades de inter-relações entre mediadores inflamatórios que precisam ser melhor conhecidas. Enquanto isso, IL-1 beta e TNF cutâneos foram mais expressivos no grupo de pacientes em comparação a indivíduos saudáveis ($p = 0,0089$ e $p < 0,0001$, respectivamente), observações esperadas pelos autores, mas que devem ser destacadas pelo fato das amostras serem cutâneas. Por último, a correlação positiva da expressão de IFN das amostras cutâneas com pacientes apresentando doença grave (PASI > 20) ($r = 0,81743$, $p = 0,0148$), em conjunto com os demais achados, trazem a atenção para pontos já destacados anteriormente como: a possibilidade da superioridade das amostras

cutâneas sobre as sanguíneas/séricas; a necessidade do esclarecimento de biomarcadores inflamatórios para a gravidade da doença; e a melhor compreensão da inter-relação dos mediadores de inflamação na psoríase.

Figura 10 – Achados positivos quanto a citocinas no presente estudo.



7 CONCLUSÃO

Dado o contexto clínico inflamatório da doença psoriásica, ao traçar o presente estudo, os autores esperavam inicialmente que os achados, em especial com relação às subpopulações de monócitos, fossem condizentes com aqueles encontrados em outras condições inflamatórias já citadas, ou seja, que os monócitos considerados inflamatórios (intermediários e não clássicos) estivessem aumentados nos pacientes, tanto em nível sanguíneo quanto cutâneo, quando comparados à controles (seção OBJETIVOS, item 3.1). O não cumprimento da expectativa pode ser justificado pelo número reduzido de controles estudados, fruto de limite imposto por condições materiais reduzidas. Contudo, uma parcela de tais monócitos (não clássicos, especificamente) mostrou correlação positiva dos seus níveis sanguíneos com a gravidade da doença (em pacientes com PASI 10-20) e dos seus níveis cutâneos com a expressão da quimiocina CCL2 nas lesões de psoríase (seção OBJETIVOS, itens 3.2.3 e 3.2.5). Estes últimos achados reforçam a necessidade de estudos posteriores sobre o comportamento das subpopulações de monócitos e até sua correlação com a gravidade da doença e com outros marcadores inflamatórios em maior número de pacientes e controles.

Além do mais, encontrou-se maior expressão nos pacientes quando avaliados marcadores de ativação monocítica (CD14s e CD163s), ainda muito pouco avaliados na psoríase, e que podem ser promissores biomarcadores da doença e que estão relacionados à atividade dos monócitos (seção OBJETIVOS, item 3.2.2).

Comparativamente entre pacientes e controles, as expressões de citocinas e quimiocinas aumentadas em pacientes apresentaram resultados irregulares (na pele: IL-1 beta, TNF, CXCL9; no soro: CXCL9) (seção OBJETIVOS, item 3.2.1), fato também contrário às expectativas iniciais dos autores e que pode mais uma vez ser justificados pelo tamanho das amostras, considerando que o número de pacientes e controles avaliados foi variável para cada parâmetro (ANEXO 4) por motivo já mencionado anteriormente. Na busca por correlações

destes mediadores inflamatórios com a gravidade da doença aferida pelo PASI (seção OBJETIVOS, item 3.2.4), entretanto, a expressão da citocina IFN (pele) e das quimiocinas CCL2 (pele e soro) e CX3CL1 (soro) mostraram relação positiva, o que pode indicar potencialidade como biomarcadores no acompanhamento da doença. Ademais, as correlações positivas entre as citocinas e quimiocinas avaliadas entre si (seção OBJETIVOS, item 3.2.5), com especial atenção à quimiocina CXCL9 por apresentar maior número de inter-relações, avaliadas em níveis séricos e lesionais (cutâneos), além de feito sem precedentes, apontam para a complexa interação entre os mediadores inflamatórios e para o destaque da CXCL9 como possível biomarcador da doença talvez com superioridade em relação às demais citocinas e quimiocinas avaliadas.

Conclui-se, assim, que, embora diferentes do que se esperava em determinados aspectos, os achados da presente investigação devam ser amplamente publicados e discutidos em comunidades científicas afins (ANEXO 6), ao se tratar de um estudo inédito em avaliar a inter-relação entre as citocinas, quimiocinas, marcadores de ativação monocítica e monócitos inflamatórios nos níveis sanguíneo / sérico e cutâneo, simultaneamente. Ademais, é um estudo que, também sem precedentes, relaciona os referidos parâmetros com a gravidade da doença.

Diante de todo o exposto, acredita-se que estudos posteriores devam ser executados para maiores esclarecimentos sobre a participação das subpopulações de monócitos inflamatórios na psoríase e sobre os papéis de citocinas, quimiocinas e marcadores de ativação monocítica no desenvolvimento e progressão da doença, incluído sua função como potenciais biomarcadores.

REFERÊNCIAS

1. Di Meglio P, Perera GK, Nestle FO. The Multitasking Organ: Recent Insights into Skin Immune Function. *Immunity*. 2011;35(6):857–69.
2. Romiti R, Helder L, Fabrício Z, Souza S, Galvão LO, Cesar C, et al. Assessment of psoriasis severity in Brazilian patients with chronic plaque psoriasis attending outpatient clinics: a multicenter, population-based cross-sectional study (APPISOT). *J Dermatolog Treat*. 2018;29(8).
3. Parisi R, Symmons DPM, Griffiths CEM, Ashcroft DM. Global Epidemiology of Psoriasis: A Systematic Review of Incidence and Prevalence. *J Invest Dermatol*. 2012;133(2):377–85.
4. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. *N Engl J Med*. 2009;361(3):496–509.
5. Menter A, Gottlieb A, Feldman SR, Van Voorhees AS, Leonardi CL, Gordon KB, et al. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis. Section 1. Overview of psoriasis and guidelines of care for the treatment of psoriasis with biologics. *J Am Acad Dermatol*. 2008;58(5):826–50.
6. Boehncke W-H, Boehncke S. More than skin-deep: the many dimensions of the psoriatic disease. *Swiss Med Wkly*. 2014;144(April):w13968.
7. Griffiths CEMC, Barker JJNWN. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet*. 2007;370(9583):263–71.
8. Hawro T, Zalewska A, Hawro M, Kaszuba A, Krölikowska M, Maurer M. Impact of psoriasis severity on family income and quality of life. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2015;29(3):438–43.
9. Takeshita J, Grewal S, Langan SM, Mehta NN, Ogdie A, Van Voorhees AS, et al. Psoriasis and comorbid diseases: Epidemiology. Vol. 76, *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2017.
10. Basavaraj KH, Ashok NM, Rashmi R, Praveen TK. The role of drugs in the induction and/or exacerbation of psoriasis. *Int J Dermatol*. 2010;49(12):1351–61.
11. Conrad C, Gilliet M. Psoriasis: from pathogenesis to targeted therapies. Vol. 54, *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. 2018. p. 102–13.
12. Swanbeck G, Inerot A, Martinsson T, Enerbäck C, Enlund F, Samuelsson L, et al. Genetic counselling in psoriasis: empirical data on psoriasis among first-degree relatives of 3095 psoriatic probands. *Br J Dermatol*. 1997;137(6):939–42.

13. Thorleifsdottir RH, Sigurdardottir SL, Sigurgeirsson B, Olafsson JH, Petersen H, Sigurdsson MI, et al. HLA-Cw6 homozygosity in plaque psoriasis is associated with streptococcal throat infections and pronounced improvement after tonsillectomy: A prospective case series. *J Am Acad Dermatol*. 2016;75(5).
14. Prinz JC. Human leukocyte antigen-class I alleles and the autoreactive T cell response in psoriasis pathogenesis. *Front Immunol*. 2018;9(APR):1–7.
15. Hedrich CM. Shaping the spectrum - From autoinflammation to autoimmunity. *Clin Immunol*. 2016;165:21–8.
16. Liang Y, Sarkar MK, Tsoi LC, Gudjonsson JE. Psoriasis: a mixed autoimmune and autoinflammatory disease. Vol. 49, *Current Opinion in Immunology*. 2017.
17. Reich K, Papp KA, Matheson RT, Tu JH, Bissonnette R, Bourcier M, et al. Evidence that a neutrophil-keratinocyte crosstalk is an early target of IL-17A inhibition in psoriasis. *Exp Dermatol*. 2015;24(7).
18. Mitra A, Fallen RS, Lima HC. Cytokine-based therapy in psoriasis. Vol. 44, *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. 2013. p. 173–82.
19. Arican O, Aral M, Sasmaz S, Ciragil P. Serum levels of TNF-alpha, IFN-gamma, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in patients with active psoriasis and correlation with disease severity. *Mediators Inflamm*. 2005;2005(5):273–9.
20. Jacob SE, Nassiri M, Kerdel FA, Vincek V. Simultaneous measurement of multiple Th1 and Th2 serum cytokines in psoriasis and correlation with disease severity. *Mediators Inflamm*. 2003;12(5):309–13.
21. Tonel G, Conrad C. Interplay between keratinocytes and immune cells-Recent insights into psoriasis pathogenesis. Vol. 41, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2009. p. 963–8.
22. Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG. Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature*. 2007;445(7130):866–73.
23. Lynde CW, Poulin Y, Vender R, Bourcier M, Khalil S. Interleukin 17A: Toward a new understanding of psoriasis pathogenesis. *J Am Acad Dermatol*. 2014;71(1):141–50.
24. Luan L, Han S, Wang H, Liu X. Down-regulation of the Th1, Th17, and Th22 pathways due to anti-TNF- α treatment in psoriasis. *Int Immunopharmacol*. 2015;29(2):278–84.
25. Campanati A, Orciani M, Consales V, Lazzarini R, Ganzetti G, Di Benedetto G, et al. Characterization and profiling of immunomodulatory genes in resident mesenchymal

- stem cells reflect the Th1-Th17/Th2 imbalance of psoriasis. *Arch Dermatol Res.* 2014;306(10):915–20.
26. Piskin G, Sylva-Steenland RMR, Bos JD, Teunissen MBM. In vitro and in situ expression of IL-23 by keratinocytes in healthy skin and psoriasis lesions: enhanced expression in psoriatic skin. *J Immunol.* 2006;176(3):1908–15.
 27. Deng Y, Chang C, Lu Q. The Inflammatory Response in Psoriasis: a Comprehensive Review. Vol. 50, *Clinical Reviews in Allergy and Immunology.* 2016.
 28. Coimbra S, Figueiredo A, Castro E, Rocha-Pereira P, Santos-Silva A, Santos Silva A. The roles of cells and cytokines in the pathogenesis of psoriasis. *Int J Dermatol.* 2012;51(4):389–98.
 29. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science.* 2010;327:656–61.
 30. Ueno H, Klechevsky E, Morita R, Aspord C, Cao T, Matsui T, et al. Dendritic cell subsets in health and disease. Vol. 219, *Immunological Reviews.* 2007. p. 118–42.
 31. Wong KL, Yeap WH, Tai JJY, Ong SM, Dang TM, Wong SC. The three human monocyte subsets: Implications for health and disease. *Immunol Res.* 2012;53(1–3):41–57.
 32. Wang G, Xia Z. Monocyte subsets and their differentiation tendency after burn injury. Vol. 7, *Frontiers of Medicine in China.* 2013. p. 397–400.
 33. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. Vol. 116, *Blood.* 2010.
 34. Wong KL, Tai JJ-Y, Wong W-C, Han H, Sem X, Yeap W-H, et al. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood.* 2011;118(5):e16-31.
 35. Ziegler-Heitbrock L, Hofer TPJ, Poli G. Toward a refined definition of monocyte subsets. 2010;
 36. Kowal K, Moniuszko M, Dabrowska M, Bodzenta-Lukaszyk A. Allergen Challenge Differentially Affects the Number of Circulating Monocyte Subsets. *Scand J Immunol.* 2012;75(5):531–9.
 37. Schauer D, Starlinger P, Reiter C, Jahn N, Zajc P, Buchberger E, et al. Intermediate Monocytes but Not TIE2-Expressing Monocytes Are a Sensitive Diagnostic Indicator for Colorectal Cancer. *PLoS One.* 2012;7(9).

38. Wijngaarden S, van Roon J a G, Bijlsma JWJ, van de Winkel JGJ, Lafeber FPJG. Fcγ receptor expression levels on monocytes are elevated in rheumatoid arthritis patients with high erythrocyte sedimentation rate who do not use anti-rheumatic drugs. *Rheumatology (Oxford)*. 2003;42(5):681–8.
39. Rogacev KS, Cremers B, Zawada AM, Seiler S, Binder N, Ege P, et al. CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes independently predict cardiovascular events: A cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60(16):1512–20.
40. Heine GH, Ortiz A, Massy ZA, Lindholm B, Wiecek A, Martinez-Castelao A, et al. Monocyte subpopulations and cardiovascular risk in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2012;8(6):362–9.
41. Strauss-Ayali D, Conrad SM, Mosser DM. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *J Leukoc Biol*. 2007;82(2):244–52.
42. Kouris A, Pistiki A, Katoulis A, Georgitsi M, Gitrakou S, Papadavid E, et al. Proinflammatory cytokine responses in patients with psoriasis. *Eur Cytokine Netw*. 2014;25(4):63–8.
43. Fujisawa T, Murase K, Kanoh H, Takemura M, Ohnishi H, Seishima M. Adsorptive depletion of CD14⁺CD16⁺ proinflammatory monocyte phenotype in patients with generalized pustular psoriasis: clinical efficacy and effects on cytokines. *Ther Apher Dial*. 2012 Oct;16(5):436–44.
44. Costa MC, Rocha B de O, Paixão CS, Oliveira M de FSP de, Mota LMH da, Carvalho LP de. Monocyte subpopulations study in patients with plaque psoriasis. *Med Hypotheses [Internet]*. 2017;104:101–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2017.05.031>
45. Legler D, Thelen M. Chemokines: Chemistry, Biochemistry and Biological Function. *Chim Int J Chem*. 2016;70(12):856–9.
46. Nedoszytko B, Sokołowska-Wojdyło M, Ruckemann-Dziurdzińska K, Roszkiewicz J, Nowicki RJ. Chemokines and cytokines network in the pathogenesis of the inflammatory skin diseases: Atopic dermatitis, psoriasis and skin mastocytosis. *Postep Derm Alergol*. 2014;31(2):84–91.
47. Duarte G V., Boeira V, Correia T, Porto-Silva L, Cardoso T, Macedo MN, et al. Osteopontin, CCL5 and CXCL9 are independently associated with psoriasis, regardless of the presence of obesity. *Cytokine*. 2015;74(2):287–92.
48. Flier J, DM B, van Beek PJ, Nieboer C, Stoof TJ, Willemze R, et al. Differential expression of CXCR3 targeting chemokines CXCL10, CXCL9, and CXCL11 in different types of skin inflammation. *J Pathol*. 2001;194:398–405.

49. Lembo S, Capasso R, Balato A, Cirillo T, Flora F, Zappia V, et al. MCP-1 in psoriatic patients: Effect of biological therapy. *J Dermatolog Treat*. 2014;25(1):83–6.
50. Faé KC, Palacios SA, Nogueira LG, Oshiro SE, Demarchi LMF, Bilate AMB, et al. CXCL9/mig mediates T cells recruitment to valvular tissue lesions of chronic rheumatic heart disease patients. *Inflammation*. 2013;36(4):800–11.
51. Chang KP, Wu CC, Fang KH, Tsai CY, Chang YL, Liu SC, et al. Serum levels of chemokine (C-X-C motif) ligand 9 (CXCL9) are associated with tumor progression and treatment outcome in patients with oral cavity squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2013;49(8):802–7.
52. Palomino DCT, Marti LC. Chemokines and immunity. *Einstein*. 2015;13(3):469–73.
53. Wojdasiewicz P, Poniatowski ŁA, Kotela A, Deszczyński J, Kotela I, Szukiewicz D. The Chemokine CX3CL1 (Fractalkine) and its Receptor CX3CR1: Occurrence and Potential Role in Osteoarthritis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2014;62(5):395–403.
54. Plant D, Young HS, Watson REB, Worthington J, Griffiths CEM. The CX3CL1-CX3CR1 system and psoriasis. *Exp Dermatol*. 2006;15(11):900–3.
55. Zhou D, Wang Y, Chen L, Zhang W, Luan J. Soluble CD163: A novel biomarker with diagnostic and therapeutic implications in autoimmune diseases. *J Rheumatol*. 2016;43(4):830.
56. Feighery C, Dunne J, Bingham EA, Feighery CF. Evaluation of soluble CD163 as a marker of inflammation in psoriasis. *Clin Exp Dermatol*. 2011;36(2):201–3.
57. Kondelkova K, Krejsek J, Borska L, Fiala Z, Hamakova K, Andrys C. Expression of soluble sCD163 in serum of psoriatic patients is modulated by Goeckerman therapy. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2013;41(3):158–62.
58. Wilson EMP, Singh A, Hullsiek KH, Gibson D, Henry WK, Lichtenstein K, et al. Monocyte-activation phenotypes are associated with biomarkers of inflammation and coagulation in chronic HIV infection. *J Infect Dis*. 2014;210(9):1396–406.
59. Mascia C, Pozzetto I, Kertusha B, Marocco R, Borgo C Del, Tieghi T, et al. Persistent high plasma levels of sCD163 and sCD14 in adult patients with measles virus infection. *PLoS One*. 2018;13(5):1–11.
60. Gjelstrup MC, Stilund M, Petersen T, Møller HJ, Petersen EL, Christensen T. Subsets of activated monocytes and markers of inflammation in incipient and progressed multiple sclerosis. *Immunol Cell Biol*. 2018;96(2):160–74.

61. Schopf R, Dobmeyer J, Dobmeyer T, B M. Soluble CD14 Monocyte Antigen in Suction Blister Fluid and Serum of Patients with Psoriasis. *Dermatology*. 1993;186:45–9.
62. Hagg D, Sundstrom A, Eriksson M, Schmitt-Egenolf M. Severity of Psoriasis Differs Between Men and Women: A Study of the Clinical Outcome Measure Psoriasis Area and Severity Index (PASI) in 5438 Swedish Register Patients. *Am J Clin Dermatol*. 2017;March 24 E.
63. Thaçi D, Blauvelt A, Reich K, Tsai TF, Vanaclocha F, Kingo K, et al. Secukinumab is superior to ustekinumab in clearing skin of subjects with moderate to severe plaque psoriasis: CLEAR, a randomized controlled trial. *J Am Acad Dermatol*. 2015;73(3):400–9.
64. Fredriksson T, Petterson U. Severe psoriasis - oral therapy with a new retinoid. *Dermatologica*. 1978;157(4):238–44.
65. Mattei PL, Corey KC, Kimball AB. Psoriasis Area Severity Index (PASI) and the Dermatology Life Quality Index (DLQI): The correlation between disease severity and psychological burden in patients treated with biological therapies. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2014;28(3):333–7.
66. Mease PJ. Measures of psoriatic arthritis: Tender and Swollen Joint Assessment, Psoriasis Area and Severity Index (PASI), Nail Psoriasis Severity Index (NAPSI), Modified Nail Psoriasis Severity Index (mNAPSI), Mander/Newcastle Enthesitis Index (MEI), Leeds. *Arthritis Care Res*. 2011;63(SUPPL. 11):64–85.
67. Kolios AGA, French LE, Navarini AA. Detection of small changes in psoriasis intensity with PrecisePASI. *Dermatology*. 2015;230(4):314–7.
68. Schmitt J, Wozel G. The psoriasis area and severity index is the adequate criterion to define severity in chronic plaque-type psoriasis. *Dermatology*. 2005;210(3):194–9.
69. Lima XT, Oliveira RTD, Braga FG, Magalhães RF, Mamoni RL, Blotta MHSL. Circulating levels of chemokines in psoriasis. *Autoimmunity*. 2015;48(1):57–60.
70. Fernandes JS, Araujo MI, Lopes DM, Souza P De, Carvalho EM, Cardoso LS, et al. Monocyte Subsets in Schistosomiasis Patients with Periportal Fibrosis. *Mediators Inflamm*. 2014;1–12.
71. Carvalho B, Santos SB, Amorim CF, Souza AS, Diniz AG, Carvalho EM. Functional Activity of Monocytes and Macrophages in HTLV-1 Infected Subjects. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(12):1–13.
72. Muniz AC, Bacellar O, Lago EL, Carvalho AM, Carneiro PP, Guimarães LH3, Rocha

- PN, Carvalho LP, Glesby M CE. Immunological markers of protection in *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* infection: A five years cohort study. *J Infect Dis*. 2016;214(4):570–6.
73. Linkov F, Gu Y, Arslan A a, Liu M, Shore RE, Koenig KL, et al. Related molecules in serum. *Cytokine*. 2010;20(1):21–6.
 74. Yoon BR, Yoo SJ, Choi YH, Chung YH, Kim J, Yoo IS, et al. Functional phenotype of synovial monocytes modulating inflammatory T-cell responses in rheumatoid arthritis (RA). *PLoS One*. 2014;9(10):1–13.
 75. Mowat AM, Bain CC. Mucosal Macrophages in Intestinal Homeostasis and Inflammation. *J Innate Immun*. 2011;3(6):550–64.
 76. Di Meglio P, Villanova F, Nestle FO. Psoriasis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;4(8):1–30.
 77. Wasilewska A, Winiarska M, Olszewska M, Rudnicka L. Interleukin-17 inhibitors. A new era in treatment of psoriasis and other skin diseases. *Postep Dermatologii i Alergol*. 2016;33(4):247–52.
 78. Gaffen SL. Structure and signaling in the IL-17 receptor superfamily. *Nat Rev Immunol*. 2010;9(8):1–24.
 79. Taams LS, Steel KJA, Srenathan U, Burns LA, Kirkham BW. IL-17 in the immunopathogenesis of spondyloarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2018;Epub ahead.
 80. Girolomoni G, Mrowietz U, Paul C. Psoriasis: Rationale for targeting interleukin-17. *Br J Dermatol*. 2012;167(4):717–24.
 81. Kagami S, Rizzo HL, Lee JJ, Koguchi Y. Circulating Th17, Th22, and Th1 Cells Are Increased in Psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2010;130(5):1373–83.
 82. Onderdijk AJ, Baerveldt EM, Kurek D, Kant M, Florencia EF, Debets R, et al. IL-4 Downregulates IL-1 β and IL-6 and Induces GATA3 in Psoriatic Epidermal Cells: Route of Action of a Th2 Cytokine. *J Immunol*. 2015;195(4):1744–52.
 83. Cubino N, Montilla C, Usategui-Martín R, Cieza-Borrela C, Carranco T, Calero-Paniagua I, et al. Association of IL1B (-511 A/C) and IL6 (-174 G > C) polymorphisms with higher disease activity and clinical pattern of psoriatic arthritis. *Clin Rheumatol*. 2016;35(7):1789–94.
 84. Cardoso PRG, Lima EV de A, Lima MM de A, Rego MJB de M, Marques CDL, Pitta I da R, et al. Clinical and cytokine profile evaluation in Northeast Brazilian psoriasis plaque-type patients. *Eur Cytokine Netw*. 2016;27(1):1–5.

85. Lin SH, Chuang HY, Ho JC, Lee CH, Hsiao CC. Treatment with TNF- α inhibitor rectifies M1 macrophage polarization from blood CD14⁺ monocytes in patients with psoriasis independent of STAT1 and IRF-1 activation. *Journal of Dermatological Science*. Japanese Society for Investigative Dermatology; 2018.
86. Kyriakou A, Patsatsi A, Vyzantiadis TA, Sotiriadis D. Serum levels of TNF- α , IL-12/23p40, and IL-17 in plaque psoriasis and their correlation with disease severity. *J Immunol Res*. 2014;2014.
87. Tigalnova M, Bjerke J, Gallati H, et al. Serum levels of interferons and TNF α are not correlated to psoriasis activity and therapy. *Acta Derm Venereol*. 1994;186:25–7.
88. Méhul B, Laffet G, Séraïdaris A, Russo L, Fogel P, Carlván I, et al. Noninvasive proteome analysis of psoriatic stratum corneum reflects pathophysiological pathways and is useful for drug profiling. *Br J Dermatol*. 2017;177(2):470–88.
89. Smith NLD, Denning DW. Clinical implications of interferon- γ genetic and epigenetic variants. *Immunology*. 2014;143(4):499–511.
90. Hwang YJ, Jung HJ, Kim MJ, Roh NK, Jung JW, Lee YW, et al. Serum levels of LL-37 and inflammatory cytokines in plaque and guttate psoriasis. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:1–6.
91. Saggini A, Chimenti S, Chiricozzi A. IL-6 as a druggable target in psoriasis: Focus on pustular variants. *J Immunol Res*. 2014;2014.
92. Croxford AL, Karbach S, Kurschus FC, Wörtge S, Nikolaev A, Yogev N, et al. IL-6 regulates neutrophil microabscess formation in IL-17A-driven psoriasiform lesions. *J Invest Dermatol*. 2014;134(3):728–35.
93. Sandberg M, Frykman A, Ernerudh J, Berg G, Matthiesen L, Ekerfelt C, et al. Cord blood cytokines and chemokines and development of allergic disease. *Pediatr Allergy Immunol*. 2009;20(6):519–27.
94. Ekman AK, Sigurdardottir G, Carlström M, Kartul N, Jenmalm MC, Enerbäck C. Systemically elevated Th1-, Th2- and Th17-associated chemokines in psoriasis vulgaris before and after ultraviolet B treatment. *Acta Derm Venereol*. 2013;93(5):527–31.
95. Behfar S, Hassanshahi G, Nazari A, Khorramdelazad H. A brief look at the role of monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2) in the pathophysiology of psoriasis. *Cytokine*. 2017;(December):0–1.
96. Giustizieri ML, Mascia F, Frezzolini A, De Pità O, Chinni LM, Giannetti A, et al. Keratinocytes from patients with atopic dermatitis and psoriasis show a distinct

- chemokine production profile in response to T cell-derived cytokines. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;107(5 SUPPL.):871–7.
97. Lima E de A, Lima M de A. Imunopatogênese da psoríase: Revisando conceitos. *An Bras Dermatol.* 2011;86(6):1151–8.
 98. Congjun J; Yanmei Z; Huiling J; Zhen Y; Shuo L. Elevated local and serum CX3CL1 (fractalkine) expression and its association with disease severity in patients with psoriasis. *Ann Clin Lab Sci.* 2015;45(5):556–61.
 99. Raychaudhuri SP, Jiang WY, Farber EM. Cellular localization of fractalkine at sites of inflammation: Antigen-presenting cells in psoriasis express high levels of fractalkine. *Br J Dermatol.* 2001;144(6):1105–13.
 100. Shive CL, Jiang W, Anthony DD, Lederman MM, Carolina S. Soluble CD14 is a nonspecific marker of monocyte activation. *AIDS.* 2015;29(10):1263–5.
 101. Marcos V, Latzin P, Hector A, Sonanini S, Hoffmann F, Lacher M, et al. Expression, regulation and clinical significance of soluble and membrane CD14 receptors in pediatric inflammatory lung diseases. *Respir Res.* 2010;11:1–13.
 102. Méndez-Lagares G, Romero-Sánchez MC, Ruiz-Mateos E, Genebat M, Ferrando-Martínez S, Muñoz-Fernández MA, et al. Long-term suppressive combined antiretroviral treatment does not normalize the serum level of soluble CD14. *J Infect Dis.* 2013;207(8):1221–5.
 103. Kelesidis T, Kendall MA, Yang OO, Hodis HN, Currier JS. Biomarkers of microbial translocation and macrophage activation: Association with progression of subclinical atherosclerosis in HIV-1 infection. *J Infect Dis.* 2012;206(10):1558–67.
 104. Korpelainen S, Intke C, Hämäläinen S, Jantunen E, Juutilainen A, Pulkki K. Soluble CD14 as a Diagnostic and Prognostic Biomarker in Hematological Patients with Febrile Neutropenia. *Dis Markers.* 2017;2017.
 105. Williams JC, Zhang X, Karki M, Chi YY, Wallet SM, Rudy BJ, et al. Soluble CD14, CD163, and CD27 biomarkers distinguish ART-suppressed youth living with HIV from healthy controls. *J Leukoc Biol.* 2018;103(4):671–80.
 106. Silva RLL, Santos MB, Almeida PLS, Barros TS, Magalhães L, Cazzaniga RA, et al. sCD163 levels as a biomarker of disease severity in leprosy and visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(3):1–13.
 107. Stilund M, Gjelstrup MC, Petersen T, Møller HJ, Rasmussen PV, Christensen T. Biomarkers of inflammation and axonal degeneration/damage in patients with newly diagnosed multiple sclerosis: Contributions of the soluble CD163 CSF/serum ratio to a

- biomarker panel. PLoS One. 2015;10(4):1–22.
108. Sugaya M, Miyagaki T, Ohmatsu H, Suga H, Kai H, Kamata M, et al. Association of the numbers of CD163+cells in lesional skin and serum levels of soluble CD163 with disease progression of cutaneous T cell lymphoma. *J Dermatol Sci.* 2012;68(1):45–51.
 109. Chiricozzi A, Romanelli P, Volpe E, Borsellino G, Romanelli M. Scanning the immunopathogenesis of psoriasis. Vol. 19, *International Journal of Molecular Sciences.* 2018. 1-31 p.
 110. Ka-Ming F, Luz NF, Moriwaki K. Programmed necrosis in the Cross Talk of Cell Death and Inflammation Francis. *Annu Rev Immunol.* 2015;33(1):79–106.
 111. Albanesi C, Madonna S, Gisondi P, Girolomoni G. The Interplay Between Keratinocytes and Immune Cells in the Pathogenesis of Psoriasis. *Front Immunol.* 2018;9(July):1–7.

ANEXOS

Anexo 1 – PASI

Unidade	Eritema	Infiltração	Descamação	Soma	% área	Produto	x Constante	Total
Cabeça	0 a 4	0 a 4	0 a 4	0 a 12	1 a 6	=	0,1	
Tronco	0 a 4	0 a 4	0 a 4	0 a 12	1 a 6	=	0,3	
MMSS	0 a 4	0 a 4	0 a 4	0 a 12	1 a 6	=	0,2	
MMII	0 a 4	0 a 4	0 a 4	0 a 12	1 a 6	=	0,4	
Total								0 a 72

<u>Avaliação do eritema, infiltração e descamação</u>	<u>Avaliação da área</u>
0 – ausente	1 – menos de 10%
1 – leve	2 – de 10 a 30%
2 – moderado	3 – de 30 a 50%
3 – grave	4 – de 50 a 70%
4 – muito grave	5 – de 70 a 90%
	6 – mais de 90%

Anexo 2 – Ficha para coleta de dados

FICHA DE COLETA DE DADOS ESTUDO DAS SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS EM PACIENTES COM PSORÍASE VULGAR	
Nome:	Num. no estudo
	Registro:
Cidade de procedência (UF):	Telefones:
Data:	Data de nascimento:
Raça (IBGE): Branco () Preta () Parda () Amarela () Indígena ()	
Gênero: M () F ()	Dados antropométricos: Peso(Kg): Altura (cm): IMC:
Psoríase:	Classificação da Psoríase:
Tempo de diagnóstico (anos) _____	PASI (pontos): _____ DLQI : _____
Tratamento prévio:	
Tópicos () MTX () Acitretina () Ciclosporina () FOTO () Biológico ()	
Nunca tratou () Sem tratamento por tempo suficiente para “wash out” da medicação: Sim () Não ()	
Tratamento atual:	
Tópicos () MTX () Acitretina () Ciclosporina () FOTO () Biológico ()	
Investigação imunológica	
Coleta de amostra sanguínea para estudo: Sim () Não () Data:	
Resultado:	
Coleta de amostra cutânea para estudo (biópsia) : Sim () Não () Data:	
Resultado:	
Outras observações:	
Ficha preenchida por (nome e assinatura):	

Anexo 3 – Termo de consentimento livre e esclarecido



Universidade Federal da Bahia
C-HUPES - Serviço de Imunologia
Rua João das Botas, s/n - Canela 40110-160 Salvador - Bahia - Brasil
Tel.: (55 71) 3237-7353/3283-8114 FAX: (55 71) 3245-7110
imuno@ufba.br / edgar@ufba.br



Edgar M. Carvalho
Chefe Serviço de Imunologia

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do Estudo: **Estudo de subpopulações de monócitos em pacientes com psoríase vulgar**
Pesquisador Responsável: Dr. Edgar Marcelino de Carvalho Filho

O (A) senhor (a) está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa. Por favor, leia este documento com bastante atenção antes de assiná-lo. Caso haja alguma palavra ou frase que o (a) senhor (a) não consiga entender, converse com o pesquisador responsável pelo estudo ou com um membro da equipe desta pesquisa para esclarecê-los.

A proposta deste termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) é explicar tudo sobre o estudo e solicitar a sua permissão para participar do mesmo.

Ao assinar este TCLE, o senhor(a) estará concordando em participar do referente estudo.

Este estudo foi submetido do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Bahia cujos contatos são os seguintes: 71-3283-5564 (telefone), cepfmb@ufba.br (e-mail) e Largo do Terreiro de Jesus, s/n - Centro Histórico - CEP 40026-010 - Salvador, BA, Brasil (endereço).

OBSERVAÇÃO: Caso o paciente não tenha condições de ler e/ou compreender este TCLE, o mesmo poderá ser assinado e datado por um membro da família ou responsável legal pelo paciente.

Objetivo do Estudo

O objetivo principal do estudo é avaliar o papel das subpopulações de monócitos na patogênese da psoríase, no intuito de melhor compreender a doença. Para isso, será necessário a frequência das subpopulações de monócitos (monócitos clássicos, intermediários e não clássicos) em pacientes com psoríase e controles (pacientes saudáveis). Também será avaliada a existência de associação destas células com doença e serão comparadas as amostras de sangue às de pele

Duração do Estudo

A duração total do estudo é de 1 a 2 anos (período de coleta), mas a participação de cada paciente no estudo acontece uma única vez.

Descrição do Estudo

Participarão do estudo aproximadamente 28 indivíduos com psoríase.

Este estudo será realizado no Setor de Imunologia e Setor de Dermatologia do C-HUPES.

O (a) Senhor (a) foi escolhido (a) a participar do estudo porque é portador de psoríase vulgar.

O (a) Senhor (a) não poderá participar do estudo se estiver sem tratamento sistêmico / fototerapia há menos de um mês.

Procedimento do Estudo

Após entender e concordar em participar, serão realizados: coleta de dados gerais (sexo, idade, tempo de doença, tratamentos prévios), coleta de 15 ml de sangue periférico e biópsia cutânea (por punch de 3 mm de uma das lesões cutâneas ativas)

Os resultados dos exames estarão disponíveis no Setor de Imunologia do C-HUPES, onde os mesmos serão processados.

1



Universidade Federal da Bahia
C-HUPES - Serviço de Imunologia
Rua João das Botas, s/n - Canela 40110-160 Salvador - Bahia - Brasil
Tel.: (55 71) 3237-7353/3283-8114 FAX: (55 71) 3245-7110
imuno@ufba.br / edgar@ufba.br



Edgar M. Carvalho
Chefe Serviço de Imunologia

Riscos Potenciais, Efeitos Colaterais e Desconforto

OS DESCONFORTOS POTENCIAIS SE REFEREM À PUNÇÃO E À REALIZAÇÃO DE BIÓPSIA CUTÂNEA (DOR / DESCONFORTO LOCAL, PEQUENOS HEMATOMAS). LIMPEZA SUAVE COM ÁGUA E SABONETE SÃO RECOMENDADOS NO LOCAL DA BIÓPSIA. OS PONTOS (DE 1 A 2 SOMENTE) DEVERÃO SER RETIRADOS EM 14 DIAS. NÃO HÁ NECESSIDADE DE CURATIVO OU USO DE MEDICAÇÕES, SALVO SOB ORIENTAÇÃO MÉDICA. NO LOCAL DA BIÓPSIA, É ESPERADO QUE HAJA A FORMAÇÃO DE CICATRIZ DE PEQUENA EXTENSÃO (CERCA DE 3 MM). RARAMENTE DESMAIO OU INFECÇÕES LOCAIS OCORREM DECORRENTES DESTES PROCEDIMENTOS. CASO ACONTEÇAM, TAIS INTERCORRÊNCIAS SERÃO TRATADAS PELA EQUIPE DESTA ESTUDO O TEMPO QUE FOR NECESSÁRIO.

Benefícios para o participante

Não há benefício direto para o participante desse estudo. Trata-se de estudo de corte observacional, testando a hipótese de que determinadas subpopulações de monócitos estão aumentadas na psoríase vulgar. Porém, os resultados obtidos com este estudo poderão ajudar a entender melhor a patogênese da doença e indiretamente influenciar em novos tratamentos.

Compensação

Você não receberá nenhuma compensação para participar desta pesquisa e também não terá nenhuma despesa adicional.

Participação Voluntária/Desistência do Estudo

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária, ou seja, você somente participa se quiser.

A não participação no estudo não implicará em nenhuma alteração no seu acompanhamento médico tão pouco alterará a relação da equipe médica com o mesmo. Após assinar o consentimento, você terá total liberdade de retirá-lo a qualquer momento e deixar de participar do estudo se assim o desejar, sem quaisquer prejuízos à continuidade do tratamento e acompanhamento na instituição.

Novas Informações

Quaisquer novas informações que possam afetar a sua segurança ou influenciar na sua decisão de continuar a participação no estudo serão fornecidas a você por escrito. Se você decidir continuar neste estudo, terá que assinar um novo (revisado) Termo de Consentimento informado para documentar seu conhecimento sobre novas informações.

Em Caso de Danos Relacionados à Pesquisa

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

Utilização de Registros Médicos e Confidencialidade

Todas as informações colhidas e os resultados dos testes serão analisados em caráter estritamente científico, mantendo-se a confidencialidade (segredo) do paciente a todo o momento, ou seja, em nenhum momento os dados que o identifique serão divulgados, a menos que seja exigido por lei.

Os registros médicos que trazem a sua identificação e esse termo de consentimento assinado poderão ser inspecionados por agências reguladoras e pelo CEP.

Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em reuniões ou publicações, contudo, sua identidade não será revelada nessas apresentações.

Quem Devo Entrar em Contato em Caso de Dúvida

Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os responsáveis pelo estudo nesta instituição são Dra. Mariana C. Costa, Dra. Maria de Fátima Paim e Dr. Edgar Marcelino de Carvalho Filho, que poderão ser encontrados

2



Universidade Federal da Bahia
C-HUPES - Serviço de Imunologia
Rua João das Botas, s/n - Canela 40110-160 Salvador - Bahia - Brasil
Tel.: (55 71) 3237-7353/3283-8114 FAX: (55 71) 3245-7110
imuno@ufba.br / edgar@ufba.br



Edgar M. Carvalho
Chefe Serviço de Imunologia

no endereço: Rua Augusto Viana, s/n - Complexo Hospitalar Prof. Edgar Santos - Canela - Salvador, BA - nos setores de Dermatologia ou Imunologia ou nos telefones: 32838000 (HUPES) / 91784882 (Dra. Mariana C. Costa)

Li e entendi o documento de consentimento e o objetivo do estudo, bem como seus possíveis benefícios e riscos. Tive oportunidade de perguntar sobre o estudo e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas. Entendo que estou livre para decidir não participar desta pesquisa. Entendo que ao assinar este documento, não estou abdicando de nenhum de meus direitos legais.

Eu autorizo a utilização dos meus registros médicos (prontuários médico) pelo pesquisador, autoridades regulatórias e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da instituição.

Data: _____

Nome do Sujeito de Pesquisa Letra de Forma (paciente) _____

Assinatura do Sujeito de Pesquisa (paciente)

Nome do Representante Legal do Sujeito de Pesquisa Letra de Forma (quando aplicável) _____
Data: _____

Assinatura do Representante Legal do Sujeito de Pesquisa (quando aplicável)

Nome da pessoa obtendo o Consentimento _____
Data: _____

Assinatura da pessoa Obtendo o Consentimento

Nome do Pesquisador Principal _____
Data: _____

Assinatura e Carimbo do Pesquisador Principal

3

Anexo 4 – Número de pacientes e controles avaliados por parâmetro inflamatório.

Parâmetro avaliado	Número de pacientes avaliados	Número de controles avaliados
Citometria de fluxo		
Subpopulações de monócitos (pele e sangue periférico)	25	8
ELISA - Citocinas		
IL-17 (pele)	26	14
IL-17 (soro)	24	15
IL-1beta (pele)	26	14
IL-1beta (soro)	26	14
TNF (pele)	27	14
TNF (soro)	20	10
IFN (pele)	24	12
IL-6 (pele)	26	14
ELISA - Quimiocinas		
CCL2 (pele)	26	14
CCL2 (soro)	25	13
CXCL9 (pele)	26	14
CXCL9 (soro)	24	16
CX3CL1 (pele)	21	14
CX3CL1 (soro)	23	12
ELISA - Marcadores de ativação monocítica		
CD 14s (pele)	21	17
CD 14s (soro)	25	14
CD163s (pele)	21	17
CD 163s (soro)	22	13

Anexo 5 – Tabela completa das correlações pesquisada entre todos os marcadores inflamatórios avaliados neste estudo.

Variável	Com variável	r*	IC 95%		p
IFN (pele)	IL-6 (pele)	0,17878	-0,262624	0,558306	0,4198
IFN (pele)	IL-17 (pele)	0,16198	-0,278659	0,546282	0,4657
IFN (pele)	IL-1 beta (pele)	0,37834	-0,051482	0,689900	0,0758
IFN (pele)	TNF (pele)	0,00539	-0,407716	0,416669	0,9803
IFN (pele)	CD14s (pele)	-0,17959	-0,576310	0,285631	0,4421
IFN (pele)	CD163s (pele)	0,06773	-0,386369	0,495404	0,7739
IFN (pele)	CCL2 (pele)	0,02230	-0,403099	0,439773	0,9207
IFN (pele)	CX3CL1 (pele)	0,11155	-0,325361	0,509210	0,6170
IFN (pele)	CXCL9 (pele)	0,41550	-0,007407	0,712324	0,0486
IFN (pele)	IL-17 (soro)	0,41136	-0,052699	0,729302	0,0725
IFN (pele)	IL-1 beta (soro)
IFN (pele)	TNF (soro)	0,29099	-0,260032	0,699052	0,2823
IFN (pele)	CD14s (soro)	-0,32825	-0,673013	0,133686	0,1493
IFN (pele)	CD163s (soro)	0,05639	-0,421576	0,509840	0,8218
IFN (pele)	CCL2 (soro)	-0,03540	-0,470547	0,413602	0,8808
IFN (pele)	CX3CL1 (soro)	0,19482	-0,284574	0,596264	0,4170
IFN (pele)	CXCL9 (soro)	-0,27438	-0,657076	0,220775	0,2616
IL-6 (pele)	IL-17 (pele)	0,13695	-0,264426	0,497892	0,5001
IL-6 (pele)	IL-1 beta (pele)	-0,00612	-0,392544	0,382135	0,9761
IL-6 (pele)	TNF (pele)	-0,40158	-0,682734	-0,016854	0,0375
IL-6 (pele)	CD14s (pele)	0,36015	-0,084709	0,685291	0,1013

Variável	Com variável	r*	IC 95%		p
IL-6 (pele)	CD163s (pele)	-0,07233	-0,488758	0,370937	0,7525
IL-6 (pele)	CCL2 (pele)	0,05029	-0,343756	0,429282	0,8054
IL-6 (pele)	CX3CL1 (pele)	-0,07511	-0,449387	0,321599	0,7127
IL-6 (pele)	CXCL9 (pele)	0,13144	-0,269644	0,493655	0,5177
IL-6 (pele)	IL-17 (soro)	-0,02532	-0,452065	0,410858	0,9123
IL-6 (pele)	IL-1 beta (soro)
IL-6 (pele)	TNF (soro)	0,04026	-0,449075	0,511016	0,8764
IL-6 (pele)	CD14s (soro)	0,34099	-0,106353	0,673531	0,1226
IL-6 (pele)	CD163s (soro)	-0,31621	-0,682346	0,176754	0,1918
IL-6 (pele)	CCL2 (soro)	0,07849	-0,344872	0,475312	0,7189
IL-6 (pele)	CX3CL1 (soro)	0,02618	-0,410144	0,452748	0,9093
IL-6 (pele)	CXCL9 (soro)	-0,27140	-0,645979	0,208512	0,2524
IL-17 (pele)	IL-1 beta (pele)	0,08420	-0,313376	0,456655	0,6796
IL-17 (pele)	TNF (pele)	0,20247	-0,200616	0,546927	0,3152
IL-17 (pele)	CD14s (pele)	-0,35894	-0,684554	0,086087	0,1025
IL-17 (pele)	CD163s (pele)	-0,53367	-0,784604	-0,132517	0,0098
IL-17 (pele)	CCL2 (pele)	0,14702	-0,254845	0,505580	0,4687
IL-17 (pele)	CX3CL1 (pele)	0,21768	-0,185301	0,557980	0,2792
IL-17 (pele)	CXCL9 (pele)	-0,02202	-0,405910	0,368475	0,9142
IL-17 (pele)	IL-17 (soro)	-0,06876	-0,486018	0,374031	0,7644
IL-17 (pele)	IL-1 beta (soro)
IL-17 (pele)	TNF (soro)	-0,02071	-0,496415	0,464557	0,9362
IL-17 (pele)	CD14s (soro)	-0,42073	-0,721393	0,013391	0,0513
IL-17 (pele)	CD163s (soro)	-0,15761	-0,581681	0,333821	0,5260

Variável	Com variável	r*	IC 95%		p
IL-17 (pele)	CCL2 (soro)	-0,14687	-0,527159	0,282429	0,4985
IL-17 (pele)	CX3CL1 (soro)	-0,02849	-0,454588	0,408215	0,9013
IL-17 (pele)	CXCL9 (soro)	-0,45083	-0,751215	0,004244	0,0461
IL-1 beta (pele)	TNF (pele)	-0,06168	-0,438552	0,333646	0,7625
IL-1 beta (pele)	CD14s (pele)	-0,19762	-0,579839	0,255899	0,3837
IL-1 beta (pele)	CD163s (pele)	-0,31234	-0,655627	0,137945	0,1601
IL-1 beta (pele)	CCL2 (pele)	-0,14302	-0,502535	0,258658	0,4810
IL-1 beta (pele)	CX3CL1 (pele)	0,03422	-0,357878	0,416054	0,8670
IL-1 beta (pele)	CXCL9 (pele)	-0,10001	-0,469190	0,298918	0,6234
IL-1 beta (pele)	IL-17 (soro)	0,00566	-0,427066	0,436285	0,9803
IL-1 beta (pele)	IL-1 beta (soro)
IL-1 beta (pele)	TNF (soro)	0,02931	-0,457783	0,502871	0,9098
IL-1 beta (pele)	CD14s (soro)	-0,33414	-0,669284	0,113994	0,1309
IL-1 beta (pele)	CD163s (soro)	0,12053	-0,366992	0,556107	0,6289
IL-1 beta (pele)	CCL2 (soro)	0,15651	-0,273327	0,534245	0,4703
IL-1 beta (pele)	CX3CL1 (soro)	-0,01924	-0,447212	0,415901	0,9333
IL-1 beta (pele)	CXCL9 (soro)	-0,09345	-0,525362	0,376749	0,6998
TNF (pele)	CD14s (pele)	-0,34807	-0,677895	0,098408	0,1144
TNF (pele)	CD163s (pele)	-0,02683	-0,453267	0,409600	0,9070
TNF (pele)	CCL2 (pele)	-0,27979	-0,601907	0,120640	0,1598
TNF (pele)	CX3CL1 (pele)	0,04220	-0,350890	0,422641	0,8363
TNF (pele)	CXCL9 (pele)	-0,08673	-0,458671	0,311074	0,6705
TNF (pele)	IL-17 (soro)	-0,09655	-0,507103	0,349711	0,6735
TNF (pele)	IL-1 beta (soro)

Variável	Com variável	r*	IC 95%		p
TNF (pele)	TNF (soro)	0,11431	-0,387630	0,563971	0,6575
TNF (pele)	CD14s (soro)	-0,27312	-0,630471	0,179763	0,2230
TNF (pele)	CD163s (soro)	0,29260	-0,201844	0,668190	0,2295
TNF (pele)	CCL2 (soro)	-0,12035	-0,507384	0,307084	0,5800
TNF (pele)	CX3CL1 (soro)	-0,08323	-0,497061	0,361439	0,7166
TNF (pele)	CXCL9 (soro)	-0,18902	-0,592372	0,290094	0,4314
CD14s (pele)	CD163s (pele)	0,31053	-0,139908	0,654485	0,1627
CD14s (pele)	CCL2 (pele)	-0,01758	-0,445881	0,417275	0,9390
CD14s (pele)	CX3CL1 (pele)	-0,41291	-0,716825	0,022848	0,0564
CD14s (pele)	CXCL9 (pele)	-0,08969	-0,501942	0,355772	0,6956
CD14s (pele)	IL-17 (soro)	-0,25090	-0,652821	0,261246	0,3224
CD14s (pele)	IL-1 beta (soro)
CD14s (pele)	TNF (soro)	-0,33802	-0,736509	0,234643	0,2257
CD14s (pele)	CD14s (soro)	0,89925	0,745277	0,962171	<.0001
CD14s (pele)	CD163s (soro)	-0,45770	-0,761789	0,011657	0,0490
CD14s (pele)	CCL2 (soro)	0,29324	-0,185704	0,659596	0,2143
CD14s (pele)	CX3CL1 (soro)	0,03673	-0,451889	0,508403	0,8871
CD14s (pele)	CXCL9 (soro)	0,22114	-0,290364	0,634362	0,3854
CD163s (pele)	CCL2 (pele)	0,02423	-0,411768	0,451193	0,9160
CD163s (pele)	CX3CL1 (pele)	-0,35943	-0,684856	0,085524	0,1020
CD163s (pele)	CXCL9 (pele)	0,15547	-0,296088	0,550229	0,4953
CD163s (pele)	IL-17 (soro)	0,15950	-0,347810	0,594563	0,5345
CD163s (pele)	IL-1 beta (soro)
CD163s (pele)	TNF (soro)	0,21136	-0,359543	0,667123	0,4595

Variável	Com variável	r*	IC 95%		p
CD163s (pele)	CD14s (soro)	0,15481	-0,336375	0,579774	0,5336
CD163s (pele)	CD163s (soro)	0,29694	-0,197283	0,670811	0,2223
CD163s (pele)	CCL2 (soro)	-0,18926	-0,592531	0,289871	0,4308
CD163s (pele)	CX3CL1 (soro)	0,23085	-0,280971	0,640434	0,3642
CD163s (pele)	CXCL9 (soro)	0,26456	-0,247564	0,661136	0,2956
CCL2 (pele)	CX3CL1 (pele)	-0,08088	-0,454009	0,316383	0,6916
CCL2 (pele)	CXCL9 (pele)	0,23686	-0,165696	0,571753	0,2376
CCL2 (pele)	IL-17 (soro)	0,22602	-0,227904	0,599238	0,3172
CCL2 (pele)	IL-1 beta (soro)
CCL2 (pele)	TNF (soro)	0,15832	-0,348870	0,593783	0,5376
CCL2 (pele)	CD14s (soro)	-0,15618	-0,550736	0,295424	0,4933
CCL2 (pele)	CD163s (soro)	0,02243	-0,449143	0,484230	0,9287
CCL2 (pele)	CCL2 (soro)	-0,12080	-0,507724	0,306669	0,5786
CCL2 (pele)	CX3CL1 (soro)	0,07959	-0,364621	0,494297	0,7285
CCL2 (pele)	CXCL9 (soro)	0,13471	-0,340326	0,554960	0,5772
CX3CL1 (pele)	CXCL9 (pele)	0,01998	-0,370237	0,404204	0,9221
CX3CL1 (pele)	IL-17 (soro)	-0,04393	-0,457073	0,384806	0,8444
CX3CL1 (pele)	IL-1 beta (soro)
CX3CL1 (pele)	TNF (soro)	0,05112	-0,425914	0,505917	0,8382
CX3CL1 (pele)	CD14s (soro)	-0,34065	-0,666529	0,094538	0,1135
CX3CL1 (pele)	CD163s (soro)	0,13366	-0,341272	0,554219	0,5802
CX3CL1 (pele)	CCL2 (soro)	0,31915	-0,096695	0,640134	0,1216
CX3CL1 (pele)	CX3CL1 (soro)	-0,28601	-0,631475	0,154188	0,1892
CX3CL1 (pele)	CXCL9 (soro)	-0,37220	-0,699506	0,084190	0,0983

Variável	Com variável	r*	IC 95%		p
CXCL9 (pele)	IL-17 (soro)	0,86244	0,686237	0,943031	<.0001
CXCL9 (pele)	IL-1 beta (soro)
CXCL9 (pele)	TNF (soro)	0,83157	0,584575	0,937504	<.0001
CXCL9 (pele)	CD14s (soro)	-0,23708	-0,606674	0,216799	0,2932
CXCL9 (pele)	CD163s (soro)	-0,18853	-0,602381	0,305201	0,4466
CXCL9 (pele)	CCL2 (soro)	-0,00217	-0,414005	0,410396	0,9921
CXCL9 (pele)	CX3CL1 (soro)	0,57658	0,192911	0,807323	0,0044
CXCL9 (pele)	CXCL9 (soro)	0,26844	-0,211560	0,644117	0,2579
IL-17 (soro)	IL-1 beta (soro)
IL-17 (soro)	TNF (soro)	0,38344	-0,071157	0,706141	0,0875
IL-17 (soro)	CD14s (soro)	-0,25164	-0,601457	0,179142	0,2395
IL-17 (soro)	CD163s (soro)	0,15975	-0,304278	0,562508	0,4951
IL-17 (soro)	CCL2 (soro)	0,02048	-0,404624	0,438302	0,9271
IL-17 (soro)	CX3CL1 (soro)	0,43450	-0,009933	0,735584	0,0492
IL-17 (soro)	CXCL9 (soro)	0,49239	0,077090	0,762089	0,0192
IL-1 beta (soro)	TNF (soro)
IL-1 beta (soro)	CD14s (soro)
IL-1 beta (soro)	CD163s (soro)
IL-1 beta (soro)	CCL2 (soro)
IL-1 beta (soro)	CX3CL1 (soro)
IL-1 beta (soro)	CXCL9 (soro)
TNF (soro)	CD14s (soro)	-0,34358	-0,690096	0,131084	0,1411
TNF (soro)	CD163s (soro)	0,03627	-0,452261	0,508056	0,8886
TNF (soro)	CCL2 (soro)	-0,10650	-0,546210	0,379228	0,6697

Variável	Com variável	r*	IC 95%		p
TNF (soro)	CX3CL1 (soro)	0,45674	-0,012879	0,761275	0,0496
TNF (soro)	CXCL9 (soro)	0,20927	-0,270665	0,605889	0,3824
CD14s (soro)	CD163s (soro)	-0,51021	-0,766861	-0,112886	0,0121
CD14s (soro)	CCL2 (soro)	0,19470	-0,236479	0,561815	0,3669
CD14s (soro)	CX3CL1 (soro)	-0,02179	-0,459876	0,424828	0,9265
CD14s (soro)	CXCL9 (soro)	0,09545	-0,339834	0,497056	0,6690
CD163s (soro)	CCL2 (soro)	-0,26282	-0,631852	0,203355	0,2547
CD163s (soro)	CX3CL1 (soro)	-0,21132	-0,628161	0,299775	0,4075
CD163s (soro)	CXCL9 (soro)	-0,02336	-0,461117	0,423536	0,9212
CCL2 (soro)	CX3CL1 (soro)	-0,11441	-0,530091	0,345610	0,6266
CCL2 (soro)	CXCL9 (soro)	-0,08287	-0,496783	0,361760	0,7178
CX3CL1 (soro)	CXCL9 (soro)	0,52517	0,077238	0,796700	0,0203

r = coeficiente de correlação de Pearson

IC = intervalo de confiança

p = p-valor calculado com o teste de Mann-Whitney

Anexo 6 – Artigos publicados e/ou submetidos até o momento

1. Costa MC, Rocha BO, Sampaio C, Paim MF, Mota LMHD, Carvalho LP. Monocyte subpopulations study in patients with plaque psoriasis. *Med Hypotheses*. 2017;104.

Fator de impacto (últimos 5 anos - 2017) = 1,152 (B2)

Submissão: outubro/2016 Aceite em: maio/2017

Medical Hypotheses 104 (2017) 101–103

Contents lists available at [ScienceDirect](#)




Medical Hypotheses

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mehy

Monocyte subpopulations study in patients with plaque psoriasis

Mariana Carvalho Costa^{a,*}, Bruno de Oliveira Rocha^b, Camilla Sampaio Paixão^b,
 Maria de Fátima Santos Paim de Oliveira^c, Lícia Maria Henrique da Mota^a, Lucas Pedreira de Carvalho^{b,d}

^a Faculty of Medicine, University of Brasília, Brazil
^b Immunology Service, Prof. Edgard Santos University Hospital, Federal University of Bahia, Brazil
^c Department of Dermatology, Federal University of Bahia, Brazil
^d Gonçalo Moniz Institute, Fiocruz, Salvador, BA, Brazil



ARTICLE INFO

Article history:
 Received 9 October 2016
 Accepted 25 May 2017

ABSTRACT

Psoriasis is a chronic and systemic, immune-mediated, inflammatory disease, mainly manifested by skin and / or joints lesions, presenting with a wide degree of clinical severity, but generally with great impact on patients' quality of life. Despite advances in the understanding of its pathogenesis, especially regarding the participation of T-lymphocytes and the key role of TNF, the triggering factor of the disease at the molecular level remains unknown, as well as the function of other cell populations. By presenting antigens to T-lymphocytes, monocytes assume an important role in both innate and adaptive immune response. In the last two decades, by using flow cytometry with antibodies against CD14 (receptor for lipopolysaccharide) and CD16 (low affinity receptor for IgG), human blood monocytes were classified into three subpopulations: classical (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediate (CD14⁺⁺CD16⁺), and non-classical (CD14⁺CD16⁺⁺). Under normal conditions the population of classical monocytes corresponds to about 85%, while intermediate to 5.4%, and nonclassical to 9.2%. However, intermediate and nonclassical subsets are increased in various inflammatory situations, such as moderate to severe asthma, colorectal cancer, and rheumatoid arthritis. Despite psoriasis being considered a disease of inflammatory nature, scarce studies evaluating the frequency of subpopulations of monocytes in psoriatic patients are found on current medical literature, and they are restricted to peripheral blood analysis. This study aims to identify the frequency of monocyte subpopulations in blood levels as well as lesional skin of plaque psoriasis patients, and to evaluate their association to cytokines, and clinical disease severity.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction background

Psoriasis is a chronic, systemic, immune-mediated, inflammatory disease, mainly manifested by skin and/or joints lesions, that affects about 2–3% of the adults worldwide [1]. In the skin, the most common presentation, called plaque psoriasis, is characterized by erythematous, scaly, infiltrated, and well-delimited papules/plaques, varying on size, and symmetrically distributed [2]. Besides skin features, about 20–30% of psoriasis patients develop psoriatic arthritis, which can result in irreversible deformities [1]. Both cutaneous and arthropathic involvements interfere dramatically on patients' quality of life [3].

Despite advances in the understanding of its pathogenesis, molecular triggering factors of the disease remain unknown, as well as the function of some cell populations. It is believed that after stimulation of antigen-presenting cells (APC) and activation

of T-cells, release of cytokines occurs, specially interleukin 1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) [4]. Concerning adaptive immune response, the prominent response is Th1 (T-helper 1) type, with increased expression of interferon- γ (INF- γ), TNF, IL-2, and IL-12 in skin lesions of psoriasis. These cytokines induce epidermal and blood vessels hyperproliferation and other pro-inflammatory effects that are more evident in patients with more severe disease [5,6]. Several cascading reactions occur with the release of these inflammatory mediators. For example, TNF induces expression of IL-6 and C-reactive protein. IL-6 mediates T-cell activation and acute phase response, and stimulates the proliferation of keratinocytes. The release of both INF- γ and TNF also activates keratinocytes, which begins secreting IL-8, which has potent chemotactic activity for neutrophils [7]. Within the epidermis, neutrophils release mediators that act on endothelial cells, which in turn express adhesion molecules. This allows an increasing influx of leukocytes that perpetuates the inflammatory process. It is noteworthy that TNF plays a key role in the pathogenesis of psoriasis, being one of the first cytokines secreted by a large number of

* Corresponding author at: SHLS 716 - Centro Clínico Sul - Torre II - sala 18, 70390-700 Brasília, DF, Brazil
 E-mail address: maricosta133@gmail.com (M.C. Costa).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2017.05.031>
 0306-9877/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

cells: macrophages, T-cells, natural killer (NK) cells, and keratinocytes. It is no coincidence the therapeutic effectiveness of inhibitory drugs of this cytokine [8].

More recently, studies that have pointed to the importance of Th17 and Th22 immune responses on psoriasis. The IL-23 expression, cytokine secreted by keratinocytes, Langerhans cells, macrophages, and dendritic cells are increased in psoriatic lesions and is involved in the secretion of IL-17 by Th17 cells [9]. Th22 cells are a new population of lymphocytes described and express IL-22 and TNF [4]. Despite that, the T-cells are not unique in the pathogenesis of psoriasis. Other cell populations influence at different levels regarding its pathogenesis and intensity of clinical features [10]. Monocytes, mononuclear leukocytes are derived from a common precursor myeloid bone marrow, are differentiated into macrophages and dendritic cells in the tissues, and are known by their phagocytic and antigen-presenting capacity. By presenting antigens to T-lymphocytes, monocytes assume an important role in both innate and adaptive immune response [11]. In psoriasis lesions, the infiltration of monocytes and T-cells is well-described, and it is assumed that Th1 and Th17 cells interact with monocytes, inducing their differentiation into specialized dendritic cells [12]. Additionally monocytes are the main IL-1, IL6 and TNF producing-cells, cytokines of major importance in psoriasis [10,12].

In the last two decades, by using flow cytometry with antibodies against CD14 (receptor for lipopolysaccharide) and CD16 (low affinity receptor for IgG), human blood monocytes were classified primarily into two subpopulations, which have different functional and phenotypic characteristics, based on CD16 expression: CD14+CD16- subset, and CD14+CD16+ subset [13,14]. Several subsequent studies, however, have identified heterogeneity on the CD16+ subgroup, with an intermediate subpopulation associated to relatively higher expression of CD14 and lower expression of CD16, and another nonclassical subpopulation expressing relatively lower levels of CD14 associated with higher expression of CD16. Thus, a new nomenclature was proposed, by grouping these cells into three subpopulations: 1) CD14++ CD16- (high expression of CD14 without the expression of CD16, termed classical monocytes); 2) CD14++ CD16+ (high expression of CD14 with low expression of CD16, termed intermediate monocytes); and 3) CD14+ CD16++ (low expression of CD14 and high CD16 expression, non-classical monocytes) [13,15]. In terms of percentage, it is believed that, under normal conditions, the population of classical monocytes corresponds to about 85%, while the intermediate to 5.4%, and the nonclassical to 9.2% [16]. Currently, it remains unclear whether intermediate monocytes represent only one type of cell in transition or actually constitute a distinct cell population [17]. From the clinical point of view, intermediate monocytes are increased in various inflammatory conditions, such as moderate to severe asthma [18], colorectal cancer [19], and rheumatoid arthritis [20]. In the latter, high frequency of intermediate monocytes was also associated with decreased response to methotrexate therapy [20]. Studies also relate intermediate monocytes as predictors of poor outcome in patients with cardiovascular disease [21,22].

So far, though considered a disease of inflammatory nature, there are very few studies evaluating the frequency of monocytes subpopulations in patients suffering from psoriasis, and are restricted to peripheral blood analysis [23,24].

The hypothesis/theory

Being psoriasis an immune-mediated disease, variations in the frequency of monocytes subpopulations, which indicates inflammatory activity, are expected to be found in peripheral blood and lesional skin of psoriasis patients. More specifically, the frequency

of classical monocytes is supposed to be decreased, while the frequency of intermediate and nonclassical ones (called inflammatory monocytes) would be increased. Still, it is believed to be observed a positive relationship between the rise in inflammatory monocytes subsets and the expression of pro-inflammatory cytokines, as well the clinical severity of the disease measured by Psoriasis Area and Severity Index (PASI).

Evaluation of the hypothesis/idea

To investigate this hypothesis, peripheral blood samples and punch skin biopsy of psoriasis lesions will be collected, followed by processing and analysis by flow cytometry. Additionally, through the evaluation of cell surface molecules and cytokines, and the relation with the clinical severity measured by PASI, the hypothesis might be refuted or not. All patient data will be compared to controls findings.

Importance of the hypothesis and discussion

There are few published data on monocyte subpopulations analysis in patients with psoriasis till the present date. Whereas TNF plays fundamental role in psoriasis and monocytes are one of the major cellular sources of TNF, the proposal to evaluate subpopulations of monocytes in psoriasis in peripheral blood and at cutaneous level will certainly contribute to a better understanding of the disease. It is also possible that the intermediate monocyte frequency as well as pro-inflammatory cytokines production by these cells to be directly correlated with the severity of the disease.

Sources of support

None.

Conflict of interest

None.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Department of Dermatology of Prof. Edgard Santos University Hospital/UFBA, specially the following colleagues: Gleison Duarte, MD, PhD, Ivonise Follador, MD, PhD, Vitoria Regina Pedreira Rego, MD, MSc, and Paulo Roberto Machado, MD, PhD.

The authors would also like to greatly thank Prof. Edgar Marcelino de Carvalho Filho, MD, PhD, a remarkable physician, professor and researcher, for the support since the beginning of this project.

References

- [1] Parisi R, Symmons DPM, Griffiths CEM, Ashcroft DM. Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence. *J Invest Dermatol* 2012;133(2):377–85.
- [2] Boehncke W-H, Boehncke S. More than skin-deep: the many dimensions of the psoriatic disease. *Swiss Med Wkly* 2014;144:w13968.
- [3] Hawro T, Zalewska A, Hawro M, Kaszuba A, Królikowska M, Maurer M. Impact of psoriasis severity on family income and quality of life. *J Eur Acad Dermatol Venerol* 2015;29(3):438–43.
- [4] Mitra A, Fallen RS, Lima HC. Cytokine-based therapy in psoriasis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2013;44:173–82.
- [5] Arican O, Aral M, Sasmaz S, Ciragil P. Serum levels of TNF-alpha, IFN-gamma, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in patients with active psoriasis and correlation with disease severity. *Mediat Inflamm* 2005;2005(5):273–9.
- [6] Jacob SE, Nassiri M, Kerdel FA, Vincek V. Simultaneous measurement of multiple Th1 and Th2 serum cytokines in psoriasis and correlation with disease severity. *Mediat Inflamm* 2003;12(5):309–13.
- [7] Tonel G, Conrad C. Interplay between keratinocytes and immune cells—Recent insights into psoriasis pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:963–8.

2. Costa MC, Mota LMHD, Rocha BO, Sampaio C, Paim MF, Carvalho LP, Carvalho EM. Inflammatory markers and patients with psoriasis vulgaris: is there a correlation with disease severity and among the inflammation parameters? *JAMA Dermatology*.

Fator de impacto (2017/18) = 8,1 (A1)

Submissão em: 23 de setembro de 2018 (registro no sistema: DER18-2208)

JAMA Dermatology

HOME	AUTHOR INSTRUCTIONS	REVIEWER INSTRUCTIONS	LOGOUT	JOURNAL HOME
------	---------------------	-----------------------	--------	--------------

Manuscript #	DER18-2208
Current Revision #	0
Submission Date	09-23-2018 13:09
Current Stage	Under Review
Title	Inflammatory markers in psoriasis vulgaris: a correlation with PASI and among the inflammation parameters
Manuscript Type	Research Letter
Theme Issue	N/A
Corresponding Author	Mariana Costa (Faculty of Medicine - University of Brasília)
Coauthors	Mariana Costa (corr_auth) , Licia Maria Mota , Bruno Rocha , Camilla Paixao , Maria de Fátima Paim de Oliveira , Edgar Carvalho , Lucas Carvalho
Abstract	
Network Referral	Yes, JAMA Network Open
Reviewing Editor	N/A
Subject Areas	Primary Subject Area: Psoriasis/Psoriasis Secondary Subject Areas: Immunology and immunologic disorders/Immunology and immunologic disorders
Conflicts of Interest	No, the author(s) have no potential conflicts of interest to disclose
Funding Organization(s) and Funding Support	No Funders
Data Sharing Statement	View Data Sharing Statement Response