

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FISIOLÓGICAS

RENATA DA SILVEIRA RODRIGUES PAIVA

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE MONÓCITOS: COMPARAÇÃO DA  
FENOTIPAGEM ENTRE ADULTOS E CRIANÇAS SADIAS E EM CRIANÇAS  
PORTADORAS DE DERMATITE ATÓPICA**

João Pessoa – PB

2016

RENATA DA SILVEIRA RODRIGUES PAIVA

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE MONÓCITOS: COMPARAÇÃO DA  
FENOTIPAGEM ENTRE ADULTOS E CRIANÇAS SADIAS E EM CRIANÇAS  
PORTADORAS DE DERMATITE ATÓPICA**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Prof<sup>a</sup>. Dra. Tatjana Keesen de Souza Lima  
Orientadora

Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral  
Coorientador

João Pessoa – PB

2016

Rodrigues, Renata da Silveira.

**Caracterização do perfil de monócitos: Comparação da fenotipagem entre adultos e crianças saudáveis e em crianças portadoras de dermatite atópica/ Renata da Silveira Rodrigues Paiva; orientadora Tatjana Kessen. – João Pessoa, 2016.**

105f.

Dissertação (Mestrado)--Universidade Federal da Paraíba 2016.

1.Monócitos 2.Citometria 3.Subpopulações de Monócitos 4.Resposta Inflamatória 5.Citocinas 6.Marcadores Celulares

RENATA DA SILVEIRA RODRIGUES PAIVA

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE MONÓCITOS: COMPARAÇÃO DA  
FENOTIPAGEM ENTRE ADULTOS E CRIANÇAS SADIAS E EM CRIANÇAS  
PORTADORAS DE DERMATITE ATÓPICA**

Dissertação de Mestrado apresentado a  
Universidade Federal da Paraíba –  
UFPB, como requisito parcial para a  
obtenção do título de Mestre em  
Ciências Fisiológicas.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Tatjana Keesen de Souza Lima  
Orientadora - UFPB

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Etel Rocha Vieira

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Joanna Gardel Valverde Galvão

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas

Aos meus filhos, Júlia e Pedro,

que iluminam os meus dias

## AGRADECIMENTOS

Ao meu **Pai do Céu** pelo espetáculo da vida, pela minha linda família, pelo trabalho que tanto amo e por todas as possibilidades de crescimento e evolução que me proporciona. Porque, a cada dia, Ele me fala ao coração: "Basta-te a minha graça. Pois é na fraqueza que a força se manifesta" (2Cor 12, 9).

À minha mãe, **Luzian**, mulher forte, guerreira, de coração bom e humilde, que se doa diuturnamente. Sem você, nada seria possível, Mainha! Nossa caminhada foi difícil, mas com grandes alegrias e conquistas. Você me ensinou a acreditar na vida e nas pessoas, a lutar pelos meus objetivos e acreditar em mim. Você me ensina tanto com suas palavras e seu exemplo que seria necessária outra vida para tanto aprendizado. É maravilhoso ter você ao meu lado sempre. Te amo!

Ao meu pai, **Sebastião**, que foi morar com o Deus esse ano de 2016. Meu muito obrigada pelo amor e pelos ensinamentos, que, sem saber, me passou. Mesmo de longe, você teve grande influência em minha vida. O meu respeito e admiração pelo grande profissional que foi e meu sincero pedido de desculpas pelo distanciamento inevitável. Sigo te amando!

Ao meu amor, **Leandro**, ser humano incrível, companheiro e pai maravilhoso. Obrigada pela força e compreensão, por estar ao meu lado sempre, pela sua lealdade e doação à nossa família. Obrigada por assumir o controle de tudo nas minhas noites de experimento e semanas de viagem para Ribeirão Preto. Que Deus continue abençoando nossa família, para que nossos filhos cresçam em um lar de muito amor e harmonia. Te amo demais!

Aos meus lindos filhos, **Júlia e Pedro Henrique**, pelo simples fato de existirem e fazerem esse mundo mais bonito. Obrigada pelos abraços e sorrisos. Obrigada por

esse amor que cresce imensuravelmente em meu coração a cada despertar. Vocês são a razão de tudo!

Obrigada a toda a minha **família!** Meus avós **Adelino e Socorro** e tios, especialmente a tia **Darc**, minha segunda mãe e dos meus filhos, essa mulher especial a quem dou tanto trabalho. Às minhas primas, que sempre me deram a maior força e incentivo e estiveram comigo nas dificuldades e conquistas.

Aos meus **amigos**, pelas palavras encorajadoras, pelos cafés, pelos momentos agradáveis e difíceis e pelas experiências trocadas.

Eu não podia deixar de agradecer à minha orientadora, **Tatjana Keesen**, essa baixinha arretada (se me permite a expressão nordestina), uma das pessoas mais dinâmicas que já conheci. Obrigada por ter acreditado em mim, Tat. Obrigada pelo carinho, paciência e compreensão, pelas broncas e olhares encorajadores. Os ensinamentos que me passaste, levo para a vida.

Ao meu co-orientador, **Ian Amaral**, pela atenção e disponibilidade de sempre.

Aos **laboratórios do professor Demétrius e do professor Isaac**, especialmente à amiga **Fátima** que nos permitiram desenvolver essa pesquisa.

Aos **pacientes**, meu sincero agradecimento! A vocês que, com fé e otimismo, se entregam em nossas mãos e permitem os avanços da ciência.

Aos meus **amigos do LABIDIC**, a família que ganhei de presente nesse processo, meu muito obrigada! Pela paciência ao me ensinar cada detalhe, por estarem ao meu lado nas vitórias e dificuldades, por me fazerem acreditar na minha capacidade, mas, especialmente, pelos olhares e abraços carinhosos e presença amorosa no meu dia-a-dia. Levarei sempre no coração cada lembrança...

Aos professores **Enéas Ricardo, Josiane Cruz, Sandra Mascarenhas, Joanna Valverde** e **Etel Rocha Vieira** por aceitarem fazer parte da minha pré-banca e banca, enriquecendo, com seus comentários, esse trabalho.

Aos **professores e amigos de Ribeirão Preto**, que me permitiram uma experiência riquíssima de superação e aprendizado. Obrigada por me acolherem com tanto carinho!

A todos que compõe o **Serviço de Dermatologia do Hospital Universitário Lauro Wanderley** pelo apoio e compreensão durante esse período tão importante da minha vida.

Sou grata ao Universo!

"Porque metade de mim é amor. E a outra metade, também" (Oswaldo Montenegro)

“Para ser grande, sê inteiro: nada  
teu exagera ou exclui.  
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és  
no mínimo que fazes.  
Assim em cada lago a lua toda  
brilha, porque alta vive.”

Fernando Pessoa

## RESUMO

Os monócitos e macrófagos representam componentes fundamentais da resposta imune. Com base na expressão do co-receptor de LPS CD14 e na expressão do CD16, receptor FCγIII, os monócitos são classificados em 3 subtipos: monócitos clássicos, que são CD14<sup>hi</sup>CD16<sup>-</sup>; monócitos intermediários, que são CD14<sup>hi</sup>CD16<sup>+</sup>; e monócitos não-clássicos, ou CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>. A DA é uma doença inflamatória cutânea crônica, de etiologia multifatorial. Nosso grupo realizou análise comparativa entre os subtipos monocitários por meio do estudo da frequência e da média de intensidade de fluorescência (MFI) de moléculas de superfície (HLA-DR, CCR5, CD80, CD86, PD1L) e da produção de citocinas (IL6, TNFα, IL10) em adultos e crianças utilizando a citometria de fluxo. A pesquisa foi executada em duas etapas. Primeiro comparamos os subtipos de monócitos entre adultos e crianças saudáveis e em seguida, entre crianças sadias e crianças portadoras de dermatite atópica (DA). O papel dos monócitos na ativação e modulação do processo inflamatório foi objeto da nossa investigação. Os resultados desse estudo mostraram que: (1) a frequência relativa dos subtipos de monócitos foi similar em adultos, crianças saudáveis e crianças portadoras de DA, com predomínio de monócitos clássicos; (2) monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos de crianças atópicas apresentaram maior expressão de HLA-DR que os mesmos subtipos em crianças sadias e essas, que adultos sadios; (3) adultos, crianças saudáveis e crianças doentes apresentaram maior frequência e expressão de CCR5 em monócitos intermediários e monócitos não-clássicos; (4) a frequência e expressão do CD80 foi maior em monócitos intermediários e não clássicos tanto em crianças como em adultos saudáveis e a expressão de CD86 foi maior em monócitos intermediários desses dois grupos. Já a expressão das moléculas de CD80 e CD86 em monócitos clássicos de crianças portadoras de DA foi maior que em crianças saudáveis; (5) a frequência de PD1L nos subtipos de monócitos foi semelhante em adultos e crianças, entretanto, houve maior expressão dessa molécula em monócitos clássicos de crianças que em adultos saudáveis e crianças atópicas apresentaram maior expressão desta molécula em monócitos clássicos que crianças saudáveis; (6) monócitos intermediários e não-clássicos de adultos e crianças saudáveis apresentaram maior atividade inflamatória que monócitos clássicos ao se avaliar a frequência e expressão de IL-6 e TNF-α, ao contrário do que se observou em crianças com DA, que apresentaram maior frequência e expressão de IL-6 e TNF-α em monócitos clássicos que as crianças saudáveis; (7) monócitos intermediários e não-clássicos demonstraram maior produção de IL10 que monócitos clássicos em adultos e crianças saudáveis. Nossos resultados mostraram, portanto que a frequência relativa de monócitos é constante nos três grupos populacionais estudados, mas a frequência e expressão de moléculas de superfície e citocinas apresentam particularidades significativas. Em resumo, crianças atópicas apresentam maior expressão de HLA-DR que crianças saudáveis e essas, que adultos saudáveis. Os subtipos de monócitos mais envolvidos na resposta inflamatória em adultos e crianças sadias são monócitos intermediários e não-clássicos, enquanto monócitos clássicos de crianças atópicas são mais inflamatórios quando comparados ao mesmo subtipo em crianças saudáveis. Essas descobertas revelam alterações na imunidade inata de crianças portadoras de dermatite atópica de extrema importância para a compreensão da fisiopatologia da doença.

**Palavras-chave:** Monócitos, Citometria, Subpopulações de Monócitos, Resposta Inflamatória, Citocinas, Marcadores Celulares

## ABSTRACT

Monocytes and macrophages represent key components of the immune response. Based on the expression of LPS co-receptor CD14 and CD16 expression, FCγ III receptor, monocytes are classified into 3 subtypes: classical monocytes, which are CD14<sup>hi</sup>CD16<sup>-</sup>; intermediate monocytes, which are CD14<sup>hi</sup>CD16<sup>+</sup>; and non-classical monocytes, CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>. AD is a chronic inflammatory cutaneous disease, with multifactorial etiology. Our group performed comparative analysis of monocytes subtypes through the study of the frequency and medium fluorescence intensity of surface molecules (HLADR, CCR5, CD80, CD86, PD1L) and cytokine (IL-6, TNF, IL10) in adults and children by using flow cytometry. The study was performed in two stages. First we compared the subtypes of monocytes from healthy adults and children, and then between healthy children and children with atopic dermatitis (AD). The role of monocyte activation and modulation of the inflammatory process is the subject of our investigation. The results of this study showed that: (1) the relative frequency of monocytes subtypes was similar in adults, healthy children and children with AD, with a predominance of classical monocytes; (2) Classical, intermediate and nonclassical monocytes of children with AD have higher HLA-DR expression when compared to those of healthy children, and monocytes of healthy children have higher expression than healthy adults; (3) adults, healthy children and DA children have higher frequency and expression of CCR5 in intermediate and nonclassical than in classical monocytes; (4) the frequency and expression of CD80 was higher in intermediate and nonclassical monocytes both in children and healthy adults and CD86 expression was more pronounced in intermediate monocytes, in these two groups, beyond which the expression of CD80 and CD86 molecules on classical monocytes of children with AD was higher than in healthy children; (5) PD1L frequency in monocytes subtypes was similar in adults and children, however, there is a higher expression of this molecule in children classical monocytes when compared to healthy adults classical monocytes. In addition, atopic children have higher expression of this molecule on classical monocytes than healthy children; (6) intermediate and nonclassical monocytes of healthy adults and children have greater inflammatory activity than classical monocytes when evaluating the frequency and expression of IL-6 and TNF-α, contrary to what is observed in children with AD who have greater frequency and expression of IL-6 and TNF-α in classical monocytes compared to healthy children; (7) intermediate and nonclassical monocytes have increased IL10 production than classical monocytes in healthy adults and children. Thus, our results revealed that the relative monocytes frequency is constant in the three studied population groups, but the frequency and expression of surface molecules and cytokines presented significant peculiarities. Summarizing, healthy children have greater expression of HLA-DR molecule than healthy adults, and atopic children have greater expression than healthy children. Monocytes subtypes more involved in inflammatory response in healthy adults and children are intermediate and nonclassical monocytes, while classical monocytes in atopic children are more involved in inflammatory response than the same subtype in healthy children. These findings revealed changes in the innate immunity of children with atopic dermatitis extremely important for understanding the pathophysiology of disease.

**Keywords:** Monocytes, Cytometry, Subpopulations of Monocytes, Inflammatory Response, Cytokines, Cell Markers

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representativo da interação entre células apresentadoras de antígenos e linfócitos T ativados, através de moléculas de superfície coestimulatórias e seus receptores. ....	27
Figura 2 - Ilustração esquemática da iniciação da dermatite atópica aguda e progressão para lesões crônicas.....	34
Figura 3 - Criança, 4 anos, portadora de DA.....	43
Figura 4. Estratégia de análise por citometria de fluxo. ....	49
Figura 5 - Análise comparativa da frequência de monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos entre adultos e crianças saudáveis.....	53
Figura 6 - Análise comparativa da expressão de HLADR em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos entre adultos e crianças saudáveis. ....	54
Figura 7 - Análise comparativa da expressão de CCR5 em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos em adultos e crianças saudáveis. ....	55
Figura 8 - Análise comparativa da expressão de CD80 em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos em adultos e crianças saudáveis. ....	56
Figura 9 - Análise comparativa da expressão de CD86 em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos em adultos e crianças saudáveis. ....	57
Figura 10 - Análise comparativa da expressão de PDL1 em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos em adultos e crianças saudáveis. ....	58
Figura 11 - Análise comparativa da expressão de IL6 em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos em adultos e crianças saudáveis. ....	59
Figura 12 - Análise comparativa da expressão de TNF $\alpha$ em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos em adultos e crianças saudáveis. ....	60
Figura 13 - Análise comparativa da expressão de IL10 em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos em adultos e crianças saudáveis. ....	61
Figura 14 - Análise comparativa da frequência de monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos em crianças saudáveis e crianças portadoras de DA. ....	67
Figura 15 - Análise comparativa da expressão do HLA-DR em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos em crianças saudáveis e crianças portadoras de DA. ....	68
Figura 16 - Análise comparativa da expressão de CCR5 em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos em crianças saudáveis e crianças portadoras de DA. ....	69
Figura 17 - Análise comparativa da expressão de CD80 em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos em crianças saudáveis e crianças portadoras de DA. ....	70

Figura 18 - Análise comparativa da expressão de CD86 em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos de crianças saudáveis e crianças portadoras de DA. .....	71
Figura 19 - Análise comparativa da expressão de PD1L em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos em crianças saudáveis e crianças portadoras de DA. .....	72
Figura 20 - Análise comparativa da expressão de IL6 em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos em crianças saudáveis e crianças portadoras de DA. .....	73
Figura 21 - Análise comparativa da expressão de TNF $\alpha$ em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos em crianças saudáveis e crianças portadoras de DA. .....	74
Figura 22 - Análise comparativa da expressão de IL10 em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos em crianças saudáveis e crianças portadoras de DA. .....	75
Figura 23 - Representação esquemática da expressão de moléculas de superfície e citocinas em monócitos clássicos, monócitos intermediários e monócitos não-clássicos de adultos saudáveis, crianças saudáveis e crianças com dermatite atópica.....	89

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - SCORAD dos pacientes portadores de DA.....	44
Tabela 2 - Painel de anticorpos utilizados na citometria de fluxo nos seus respectivos fluorocromos.....	48
Tabela 3 - Frequência e expressão de moléculas de superfície e citocinas em adultos e crianças saudáveis .....	63
Tabela 4 - Expressão de moléculas de superfície e citocinas em crianças saudáveis e crianças portadoras de DA.....	76

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Características dos voluntários saudáveis .....	52
Quadro 2 - Características dos pacientes com DA.....	65
Quadro 3 - Características das crianças saudáveis e portadoras de DA .....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ANOVA** - Análise de variância

**APC** - Alofococianina

**B7-1** - Proteína de membrana CD80

**B7-2** - Proteína de membrana CD86

**B7-H1** - Proteína de membrana CD274

**CAA** - Célula apresentadora de antígeno

**CCR2** - Receptor de quimiocina C-C tipo 2

**CCR5** - Receptor de quimiocina C-C tipo 5

**CD** - *Cluster of differentiation*

**CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>-</sup>** - monócitos clássicos ou monócitos clássicos

**CD14<sup>hi</sup>/CD16<sup>+</sup>** - monócitos intermediários ou monócitos intermediários

**CD14<sup>lo</sup>/CD16<sup>+</sup>** - monócitos não-clássicos ou monócitos não-clássicos

**CMSP** - Células mononucleares do sangue periférico

**CTLA-4** - proteína 4 associada ao linfócito T citotóxico

**DA** - Dermatite atópica

**FCγIII** - Receptor FC gamma do tipo III

**FITC** - Isotiocianato de fluoresceína

**GM-CSF** - Fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago

**HLA-DR** - Antígeno leucocitário humano

**HULW** - Hospital Universitário Lauro Wanderley

**IgE** - Imunoglobulina E

**IL-1** - Interleucina 1

**IL-2** - Interleucina 2

**IL-1β** - Interleucina 1beta

**IL-4** - Interleucina 4

**IL-5** - Interleucina 5

**IL-6** - Interleucina 6

**IL-10** - Interleucina 10

**IL-12** - Interleucina 12

**IL-13** - Interleucina 13

**IL-23** - Interleucina 23

**IL-1RII** - Receptor de interleucina 1 tipo II

**IL-1ra** - Antagonista do receptor de interleucina 1

**IFN $\gamma$**  - Interferon gama  
**iNOS** - Óxido nítrico sintetase isoforma indutível  
**KO** - *knocked out*  
**LPS** - Lipopolissacarídeo  
**M1** - Macrófago clássico  
**Mi** - Macrófago intermediário  
**M2** - Macrófago não-clássico  
**M-CSF** - Fator estimulador de colônia de macrófago  
**MFI** - Média de intensidade de fluorescência  
**MHC II** - Complexo principal de histocompatibilidade de classe II  
**NK** - Célula *natural killer*  
**NO** - Óxido nítrico  
**PBS** - Tampão salina-fosfato  
**PD1L** - *Programmed death ligant 1* ou CD274  
**PE** - Ficoeritrina  
**Po-SCORAD** - *Patient Oriented SCORAD*  
**PRR** - Receptores de reconhecimento de padrões  
**SCORAD** - *Scoring Atopic Dermatitis*  
**SEDA** - Síndrome de eczema / dermatite atópica  
**TCLE** - Termo de consentimento livre e esclarecido  
**TCR** - Receptor de célula T  
**TGF- $\beta$**  - Fator transformador de crescimento beta  
**Th1** - Células T auxiliares do tipo 1  
**Th2** - Células T auxiliares do tipo 2  
**Th17** - Células T auxiliares do tipo 17  
**Th22** - Células T auxiliares do tipo 22  
**TNF- $\alpha$**  - Fator de necrose tumoral alfa  
**UFPB** - Universidade Federal da Paraíba

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	O sistema imunológico e a importância do estudo dos monócitos .....	19
1.2	Dermatite atópica (DA).....	29
1.2.1	Imunologia da dermatite atópica.....	32
2	HIPÓTESE.....	37
3	JUSTIFICATIVA.....	38
4	OBJETIVOS.....	39
4.1	Objetivo geral .....	39
4.2	Objetivos específicos .....	39
5	MATERIAL E MÉTODO.....	41
5.1	Amostras clínicas .....	41
5.2	Obtenção de leucócitos para ensaios biológicos .....	45
5.3	Imunofluorescência para análise de monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos expressando marcadores de superfície e intracelulares .....	46
5.4	Anticorpos monoclonais .....	47
5.5	Aquisição e análise dos dados por citometria de fluxo.....	48
5.6	Análise estatística .....	50
6	RESULTADOS .....	51
6.1	Caracterização dos monócitos circulantes em adultos e crianças saudáveis. .....	51
6.1.1	Adultos e crianças saudáveis, quando comparados entre si, apresentam frequência relativa dos subtipos de monócitos semelhante, com predomínio de monócitos clássicos. Entretanto, as crianças apresentam maior população de monócitos não-clássicos que os adultos.....	52
6.1.2	Crianças saudáveis apresentam maior expressão de HLA-DR em monócitos clássicos, monócitos intermediários e monócitos não-clássicos quando comparados aos adultos saudáveis e há maior expressão de HLA-DR em monócitos clássicos e intermediários que em monócitos não-clássicos em ambos os grupos .....	53
6.1.3	Adultos e crianças saudáveis apresentam maior frequência e expressão de CCR5 em monócitos intermediários e não-clássicos do que em monócitos clássicos .....	54

6.1.4	A frequência e expressão do CD80 foi maior em monócitos intermediários e não-clássicos de crianças e adultos saudáveis e a expressão de CD86 foi maior em monócitos intermediários dos dois grupos .....	55
6.1.5	O percentual de monócitos expressando PDL-1 em subtipos de monócitos é semelhante em adultos e crianças, entretanto, há maior expressão dessa molécula em monócitos clássicos de crianças.....	58
6.1.6	Monócitos intermediários e não-clássicos de adultos e crianças saudáveis apresentam maior atividade inflamatória que monócitos clássicos ao se avaliar a frequência e expressão de IL-6 e TNF- $\alpha$ .....	59
6.1.7	Há maior percentual de monócitos intermediários e não-clássicos expressando IL-10 que monócitos clássicos. ....	61
6.2	Análise do perfil monocitário de crianças saudáveis e crianças portadoras de dermatite atópica:.....	64
6.2.1	Crianças saudáveis e crianças portadoras de dermatite atópica, quando comparadas entre si, apresentam frequência dos subtipos de monócitos semelhante, com predomínio de monócitos clássicos .....	66
6.2.2	Crianças portadoras de DA apresentam diferença significativa de expressão de HLA-DR quando comparadas ao grupo controle.....	67
6.2.3	Crianças portadoras de DA apresentam menor percentual de monócitos não-clássicos CCR5 positivos, quando comparadas às crianças saudáveis.....	68
6.2.4	A expressão das moléculas de CD80 e CD86 em monócitos clássicos de crianças portadoras de DA foi significativamente maior que no grupo de crianças saudáveis .....	69
6.2.5	Há maior porcentagem de monócitos clássicos expressando PDL1 em crianças atópicas que no grupo de crianças saudáveis.....	71
6.2.6	Monócitos clássicos e intermediários de crianças portadoras de DA apresentam maior atividade inflamatória que os mesmos monócitos de crianças saudáveis ao se avaliar a expressão de IL-6 e TNF- $\alpha$ .....	72
6.2.7	Crianças portadoras de DA não apresentam diferença de expressão de IL-10 entre os subtipos de monócitos .....	74
7	Discussão .....	77
8	Conclusão.....	88
9	Referências Bibliográficas .....	90
10	ANEXOS.....	98
10.1	ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO PROJETO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (UFPB).....	98
10.2	ANEXO B - SCORAD.....	103

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 O sistema imunológico e a importância do estudo dos monócitos

O termo *imunidade* (do latim *immunitas*) significa, historicamente, proteção contra doenças, mais especificamente, enfermidades infecciosas. O sistema imunológico, composto por células e moléculas envolvidas na imunidade, tem papel essencial na sobrevivência dos organismos (McDADE, 2003), não apenas na defesa contra antígenos, mas especialmente na manutenção da homeostase, eliminação de tecidos danificados, de células apoptóticas ou senescentes e na reparação tecidual. À resposta coordenada do sistema imunológico a substâncias estranhas, é dado o nome de resposta imune (MECHNIKOV, 1967; YATIM e LAKKIS, 2015).

Está descrito na literatura que os mecanismos de resposta imunológica variam bastante ao longo da vida de um indivíduo, desde a vida intra-uterina até a senescência (SIMON, HOLLANDER e McMICHAEL, 2015). Desta forma evidenciam-se particularidades relevantes ao se comparar a resposta imune entre adultos e crianças, especialmente em resposta a infecções virais e vacinas (RITZ *et al.*, 2012; MUENCHHOF, PREDERGAST e GOULDER, 2014)

O sistema imune inato representa a primeira linha de defesa contra sinais de perigo internos ou externos, participando ativamente de todas as fases da resposta inflamatória: iniciação, inflamação franca, resolução e restabelecimento da integridade tecidual (JANEWAY e MEDZHITOV, 2002; McDADE, 2003; ITALIANI e BORASCHI, 2014). Esse sistema confere mecanismos de defesa pouco específicos e é composto pelas barreiras epiteliais, proteínas anti-microbianas solúveis, sistema do complemento, fagócitos (células dendríticas, monócitos/macrófagos, neutrófilos) e células *natural killers* (NK) (ABBAS, 2015).

Os monócitos representam componente fundamental da resposta imune inata, desempenhando papel efetor e regulador crítico nos processos inflamatórios (GEISSMANN *et al.*, 2010). Essas células exibem diferentes funções imunológicas, incluindo fagocitose e apresentação de antígenos, produção de citocinas e quimiocinas que estimulam neoformação vascular, síntese de colágeno e fibrose. Assim sendo, estão envolvidas na hemostasia, inflamação, proliferação, angiogênese, reepitelização e remodelamento tecidual (KASRAIE e WERFEL, 2013). Têm origem do precursor de granulócitos-macrófagos, que é derivado do progenitor mielóide comum na medula óssea. Os monócitos circulantes migram para tecidos não linfóides e se diferenciam em macrófagos e células dendríticas intersticiais. E ainda, diante de estímulo antigênico, monócitos humanos podem originar células de Langerhans epidérmicas, assim como células dendríticas inflamatórias (KASRAIE e WERFEL, 2013).

A apresentação antigênica, que ocorre via interação da molécula MHC (*major histocompatibility complex*), presente na superfície da célula apresentadora de antígeno (monócito/macrófago, célula dendrítica, linfócito B) com o receptor de célula T (TCR), expresso na superfície dos linfócitos T ou receptor de célula B (BCR), presente no linfócito B, é essencial para que ocorra geração de resposta imune adaptativa. Trata-se de uma reação mais elaborada, que apresenta extrema especificidade e capacidade de gerar memória imunológica, sendo capaz de responder mais rápida e efetivamente a uma segunda exposição ao antígeno (McDADE *et al.*, 2016) e culmina com produção de anticorpos específicos pelos linfócitos B e geração de células T efetoras e de memória (ABBAS, 2015).

Para desempenharem papel efetor e modulador da resposta imune, os monócitos e macrófagos influenciam e respondem a outros componentes do sistema

imune. Analogamente à dicotomia: células T *helper* 1 (Th1), na resposta imune celular a infecções intracelulares; e células T *helper* 2 (Th2), na infecção por parasitas extracelulares, surgiu o conceito de M1, macrófagos ativados classicamente e M2, ativados alternativamente (MARTINEZ e GORDON, 2014). Enquanto os monócitos, células precursoras dos macrófagos teciduais, são caracterizados e classificados em três subtipos: monócitos clássicos, monócitos intermediários e monócitos não-clássicos, baseado na expressão em sua superfície do co-receptor de lipopolissacarídeos (LPS) CD14 (*cluster of differentiation* 14) e na expressão do CD16, receptor de baixa afinidade para imunoglobulina G, o receptor FC gama III (RFC $\gamma$ III). O primeiro grupo representa 80% da população de monócitos e caracteriza-se pela expressão de CD14 e ausência de CD16 em sua superfície, são portanto, CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>. Os monócitos CD16<sup>+</sup>, podem ser subdivididos em dois subgrupos, CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> ou intermediários e CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>, também denominados não-clássicos, em oposição aos monócitos clássicos (ZIEGLER-HEITBROCK, *et al.*, 2010; ZIEGLER-HEITBROCK, 2015). As diferenças entre os subtipos de monócitos não são apenas fenotípicas, uma vez que essas células apresentam diferenças importantes com relação à capacidade de produção de citocinas e quimiocinas e expressão de moléculas de superfície (PASSOS *et al.*, 2014). O papel fisiológico dos subtipos de monócitos ainda não é completamente compreendido (ITALIANI e BORASCHI, 2014). Sabe-se que monócitos clássicos são produtores de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (ROS) e apresentam boa atividade fagocítica (ABELES *et al.*, 2012) Os monócitos intermediários são fagocíticos por excelência, expressam altos níveis do receptor de quimiocina CCR5 e de moléculas de MHC de classe II e produzem grande quantidade de citocinas pró e anti-inflamatórias. Alguns autores descrevem

monócitos não-clássicos como subtipo celular importante nas respostas imunológicas a infecções virais e dotados de capacidade de "patrulha" tecidual (ABELES *et al.*, 2012; ITALIANI e BORASCHI, 2014), enquanto outros os caracterizam como produtores primários de citocinas inflamatórias como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (MUKHERJEE *et al.*, 2015).

Diferenças importantes são observadas em relação ao metabolismo dos subtipos de macrófagos. Enquanto nos macrófagos M1 ocorre desvio do metabolismo da arginina para óxido nítrico (NO) e citrulina, com atividade microbicida e capacidade de inibição da proliferação celular, assim como ativação de resposta Th1, nas células M2, o metabolismo é desviado para ornitina e poliamidas, levando a proliferação celular, reparação tecidual, síntese de colágeno e fibrose, e há promoção de resposta Th2 (BARROS *et al.*, 2013; GALVAN-PENA e O'NEILL., 2014; ITALIANI e BORASCHI, 2014). Os macrófagos classicamente ativados (M1) obtêm energia através da glicólise e os alternativamente ativados (M2) usam o metabolismo oxidativo para obter energia para suas funções. (GALVAN-PENA e O'NEILL, 2014). Macrófagos M1 e M2 apresentam diferenças importantes no perfil de produção de citocinas, assim como no metabolismo da glicose e do ferro e na expressão de diversas moléculas como arginase, metaloproteínas e iNOS (BARROS *et al.*, 2013; ITALIANI e BORASCHI, 2014).

As vias de estimulação da polarização dos macrófagos são bem caracterizadas atualmente. Sabe-se que o interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) é a principal citocina associada com ativação M1 e representa o principal sinalizador celular da via Th1 junto com lipopolissacarídeos (LPS) ou fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), levando a produção de IL-12, IL-23, IL-1, TNF $\alpha$  e IL-6 e baixa produção de IL-10. Já a ativação de M2 pode ocorrer por três vias ligadas a respostas Th2: M2a (alternativa),

estimulada por IL-4 e IL-13, com produção de IL-10, receptor de interleucina 1 tipo II (IL-1RII) e antagonista do receptor de interleucina 1 (IL-1ra); M2b (tipo II), estimulada por imunocomplexos e ligantes de receptores semelhantes a *Toll*, que leva à produção de TNF $\alpha$ , IL-1 e IL-6, alta produção de IL-10 e baixa produção de IL-12; e a terceira via, M2c (desativada), desencadeada por IL-10, com produção de IL-10, fator de transformação de crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e componentes da matriz extracelular, participando do remodelamento tecidual (MANTOVANI *et al.*, 2014; MARTINEZ e GORDON, 2014).

Essas importantes alterações no metabolismo celular são possíveis em decorrência da capacidade de células imunológicas sofrerem mudanças no seu programa transcricional. Esse processo possibilita a expressão gênica, diferenciação e ativação celular, otimizando a resposta imune inata e adaptativa. Exemplo disso é a expressão de receptores semelhantes a *toll* específicos, assim como de moléculas de sinalização intracelular, citocinas e quimiocinas, pelos macrófagos e células dendríticas após contato com um patógeno (FITZGERALD e CAFFREY, 2014).

O processo de diferenciação e plasticidade dos fagócitos mononucleares, assim como a relação entre os subtipos de monócitos e a polarização macrofágica, ainda é pouco conhecida (MANTOVANI, GARLANDA e LOCATI, 2009). Sabe-se que a polarização é transitória, e os monócitos são extremamente plásticos e heterogêneos, assumindo fenótipos distintos na dependência do microambiente em que estão inseridos (ITALIANI e BORASCHI, 2014; YANG *et al.*, 2014).

Através do estudo da frequência e expressão de moléculas de superfície e citocinas pró e anti-inflamatória, é possível definir o estado de ativação dos monócitos em diversos modelos de doença em animais e em humanos.

Moléculas do complexo principal de histocompatibilidade - MHC são essenciais para que ocorra a ativação de linfócitos T *helper*. O HLA-DR (MHC de classe II) é expresso em células apresentadoras de antígeno como monócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos B e sua interação com os linfócitos T ocorre via receptor de célula T (TCR). Um aumento em sua expressão indica aprimoramento na função de apresentação antigênica. Entretanto, em inflamações graves e pacientes politraumatizados, ocorre redução da expressão de HLA-DR, alguns autores sugerem que a diminuição na expressão dessa molécula ocorre em decorrência de aumento na monocitopoiese na medula óssea, com consequente elevação no número de células imaturas da linhagem monocitária no sangue periférico, que não expressam HLA-DR (ZHENG e MROWIETZ, 1997), enquanto estudos mais recentes revelam redução global da resposta inflamatória e alterações críticas na expressão de moléculas de superfície celular como parte da síndrome de resposta anti-inflamatória compensatória (CARS), sendo considerado, nessas situações, fator preditivo de gravidade (KIM *et al.*, 2010; VESTER *et al.*, 2015). A expressão da molécula de HLA-DR foi avaliada em diversos modelos de doença e trauma (doença de Chagas, pancreatite, ruptura de aneurisma aórtico, cirurgia cardíaca) e representa importante marcador de gravidade em pacientes criticamente doentes (RICHTER *et al.*, 1999; SOUZA *et al.*, 2004; HAVEMAN *et al.*, 2006; FRANKE; KIM *et al.*, 2010). Além da importância do estudo dessa molécula devido ao seu papel na apresentação de antígenos, em análises por citometria de fluxo, a combinação dos marcadores de superfície CD14, CD16 e HLA-DR pode ser utilizada como estratégia de exclusão de células CD16<sup>+</sup> HLA-DR<sup>-</sup>, como neutrófilos e células *natural killer* (NK), diferenciando essas de monócitos, que são, obrigatoriamente HLA-DR<sup>+</sup> (ABELES *et al.*, 2012).

Para que haja recrutamento de monócitos circulantes para os tecidos, faz-se necessária a interação de receptores de quimiocinas expressos na superfície dessas células com as quimioquinas produzidas no microambiente. Receptores de quimiocina têm sido amplamente estudados devido ao seu papel na patogênese de várias doenças inflamatórias (aterosclerose, artrite reumatóide, esclerose múltipla, doença inflamatória intestinal) (GERARD e ROLLINS, 2001). Entre essas moléculas, o receptor de quimiocina CC tipo 5 (CCR5), expresso em linfócitos T, monócitos, macrófagos, células dendríticas imaturas e microglia têm demonstrado em modelos animais e em humanos participação importante em processos inflamatórios e infecciosos. Camundongos deficientes em CCR5 são mais susceptíveis a infecções por *Listeria monocytogenes*, *Cryptococcus neoformans* e *Toxoplasma* e sabe-se da participação dessa molécula como co-receptor para o vírus da imunodeficiência humana (MACK *et al.*, 2001; WIERDA *et al.*, 2012). Ademais, CCR5 funciona como marcador adicional para caracterização dos subtipos de monócitos, uma vez que monócitos intermediários expressam mais CCR2 e CCR5 (ANCUTA *et al.*, 2003.).

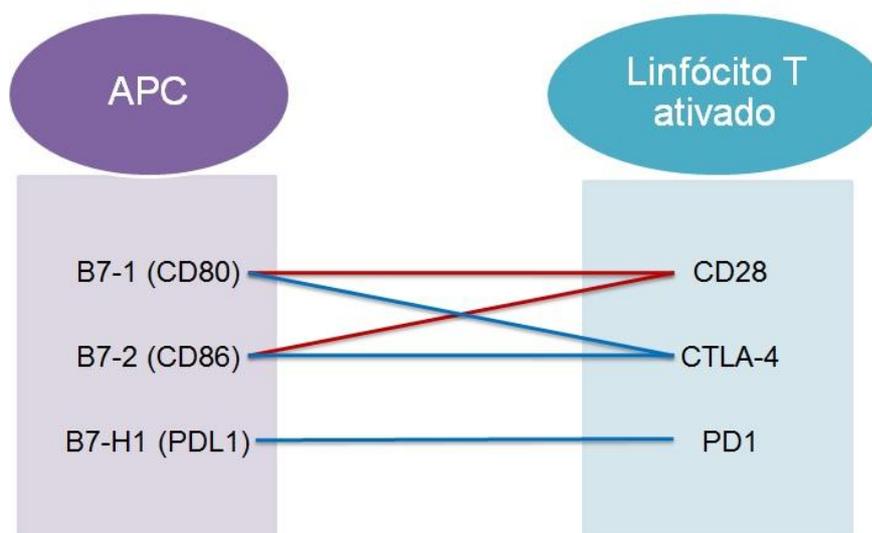
Membros da família de moléculas de superfície B7 (B7-1 ou CD80, B7-2 ou CD 86 e B7-H1 ou PDL-1) têm papel fundamental na regulação da ativação das células T e imunotolerância. Essas moléculas controlam a atividade de células T em contextos diversos, desde o desenvolvimento de autoimunidade, perpassando pela patogenia de doenças infecciosas, até o processo de imunidade tumoral (BUTTE *et al.*, 2008). O aumento da expressão de CD86 em células apresentadoras de antígeno antecede o de CD80. O CD86 apresenta maior afinidade pelo CD28, apresentando primordialmente atividade estimulatória, ao passo que o CD80 apresenta maior afinidade pela molécula de CTLA-4, exercendo, através dessa interação, efeito inibitório. Entretanto, ambas as moléculas podem ligar-se ao CD28

ou CTLA-4 da superfície da célula T exercendo atividade estimulatória ou inibitória (SAID *et al.*, 2016) (figura 1). O processo de ativação/inibição dos linfócitos T requer, portanto, a ligação do TCR do linfócito T ao complexo MHC de classe II ligado ao peptídeo e a ligação adicional do CD28/CTLA-4 da superfície linfocitária às moléculas de CD80 ou CD86 presentes na superfície da célula apresentadora de antígeno. Outro aspecto a ser ressaltado é a habilidade dessas moléculas em dirigir a resposta dos linfócitos T para um perfil Th1 (CD80) ou Th2 (CD86) (RUTKOWSKI *et al.*, 2003, SAID *et al.*, 2016). A importância dessas moléculas coestimulatórias na patogênese de asma brônquica, pneumonite alérgica, doenças intersticiais pulmonares, rinite alérgica e doença de Crohn está bem documentada na literatura (LIU *et al.*, 1997; NAKADA *et al.*, 1999; DJUKANOVIC, 2000) uma vez que expressão e atividade de CD80, CD86 e PD1L em células apresentadoras de antígenos modulam a magnitude da ativação das células T (SAID *et al.*, 2016).

O PD1L (Programmed death-ligand 1), também denominado *cluster* de diferenciação 274 (CD274) ou B7-H1 é uma proteína transmembrana, presente constitutivamente nas APC, que têm sua expressão aumentada após ativação dessas células (BUTTE *et al.*, 2008). É membro da superfamília B7, assim como o CD80 e o CD86, e também apresenta efeito regulatório na resposta de células T. Sua ação se dá através da indução de apoptose e/ou anergia em células T ativadas e inibição da produção de citocinas (TAMAI *et al.*, 2014). Assim sendo, o PD1L, por meio de sua ligação com o PD1, presente na superfície das células T, apresenta papel significativo na regulação da resposta inflamatória infecciosa, tolerância imunológica e progressão tumoral (figura 1). Alguns estudos mostram importante participação da molécula de PDL-1 na regulação do equilíbrio entre a defesa imune

contra o patógeno e o dano tecidual imunomediado em infecções virais crônicas como HIV, hepatite B e hepatite C (BUTTE *et al.*, 2008).

**Figura 1 - Esquema representativo da interação entre células apresentadoras de antígenos e linfócitos T ativados, através de moléculas de superfície coestimulatórias e seus receptores.**



Na coluna da esquerda estão representadas moléculas de superfície presentes na superfície da APC e à direita, as moléculas expressas na superfície do linfócito T ativado. As linhas vermelhas indicam interações com efeito estimulatório, enquanto as linhas azuis representam efeito inibitório

A interleucina 6 é uma citocina multifuncional, que apresenta uma série de funções biológicas relevantes: participa da diferenciação terminal de células B, resposta inflamatória de fase aguda, hematopoiese, neurogênese e cicatrização de feridas, assumindo papel importante na manutenção da homeostase. Entretanto, quando cronicamente elevada, perde sua função de manutenção de integridade tecidual, passando a apresentar efeitos deletérios de inflamação crônica e fibrose. Estudos em modelos animais e humanos de doenças inflamatórias como lúpus eritematoso sistêmico, colite, encefalite e miocardite correlacionam a alta expressão de IL-6 com maiores níveis de inflamação (FONTES, ROSE e ČIHÁKOVÁ, 2015; JAIN *et al.*, 2016).

O fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) é uma citocina pró-inflamatória produzida por linfócitos, monócitos, macrófagos, células epiteliais e endoteliais. Aumento na produção dessa citocina pode ser visto em várias doenças, como aterosclerose, câncer, doença inflamatória intestinal, depressão, e esclerose múltipla (RAMSEYER e GARVIN, 2013; MA, ZHANG e BALOCH, 2016). LPS e outros produtos bacterianos, citocinas, como IL-1, IL-2 e o próprio TNF- $\alpha$ , fator estimulador de colônia de granulócito-monócito (GM-CSF), fator estimulador de colônia de macrófago (M-CSF), glicocorticóides e ligante de CD40 são exemplos de indutores de produção de TNF- $\alpha$  (MOREIRA-TABAKA *et al.*, 2012).

Outra citocina de extrema importância a ser considerada no estudo de monócitos e macrófagos é a IL-10, citocina pleiomórfica, com ação regulatória, que executa sua função através da inibição da produção e atividade de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1- $\beta$ ), redução da produção de quimiocinas, controle da liberação de espécies reativas de oxigênio, regulação da capacidade de apresentação de antígenos e supressão da proliferação e atividade de células T citotóxicas. Além disso, a IL-10 age em conjunto com outros mecanismos imunorregulatórios como CTLA-4 e TGF- $\beta$ , com o objetivo de suprimir funções celulares (CILFONE *et al.*, 2013; XIE *et al.*, 2014).

A caracterização funcional dos diferentes tipos de monócitos, através da identificação de moléculas de superfície e produção de citocinas, tem sido estudada por pesquisadores em modelos de doenças inflamatórias, infecciosas, alérgicas e metabólicas ao longo dos anos, na tentativa de melhor compreender a patogênese dessas doenças.

## 1.2 Dermatite atópica (DA)

A dermatite atópica (DA) é uma doença inflamatória crônica cutânea, de etiologia multifatorial, que envolve fatores genéticos e ambientais, e apresenta caráter incapacitante para o paciente e seus familiares, prejudicando a rotina, o padrão de sono, ocasionando absenteísmo escolar e no trabalho e causando, em alguns casos, isolamento social (DARLENSKI *et al.*, 2014). O termo Síndrome de Eczema Dermatite Atópica (SEDA) foi introduzido pela *European Academy of Allergy and Clinical Immunology* com o objetivo de ser mais abrangente que “dermatite atópica”, no que se refere aos mecanismos envolvidos nessa entidade nosológica, considerando que, em alguns pacientes, não há sensibilização alérgica, apenas eczema (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

A DA tem prevalência estimada de 279.889.120 casos no mundo e afeta em torno de 20% da população infantil, representando a doença inflamatória crônica infantil mais comum. Cerca de 85% dos pacientes apresentam início da doença antes dos 5 anos de idade, com maior incidência no primeiro ano de vida. Apesar da ocorrência da DA de início tardio, a prevalência da doença na população adulta é estimada em 2% a 9%. Entretanto, estudos mais recentes relatam que cerca de 40% a 80% dos casos de DA que se iniciam na infância, persistem na idade adulta (BRANT e SIVAPRASAD, 2011; SILVERBERG, N. e SILVERBERG, J. 2015). Um aumento importante da sua incidência nos países industrializados tem sido observado nas últimas décadas (DARLENSKI *et al.*, 2014).

A doença pode ser classificada em dois grandes grupos: DA alérgica ou extrínseca, na qual os processos imunológicos são considerados epifenômenos de uma barreira cutânea defeituosa e DA não-alérgica, em que o distúrbio imunológico

e a alteração de barreira cutânea seriam consequência do processo inflamatório local, termo que substitui a denominação dermatite intrínseca ou criptogênica e abrange os casos em que não é possível detectar a existência de sensibilização alérgica. A DA alérgica pode ser subdividida em dois tipos: DA associada a IgE, nos casos em que é identificada a presença de sensibilização mediada por IgE, e DA associada a células T, que se caracteriza por *patch tests* positivos para aeroalérgenos ou alérgenos alimentares; (OLIVEIRA *et al.*, 2005; BELDA, 2010; SUÁREZ-FARIÑAS *et al.*, 2013). Quanto à idade de acometimento pode ser dividida em: dermatite atópica infantil (três meses a dois anos de idade), pré-puberal (dos três aos doze anos), e da adolescência e do adulto (maiores que 12 anos) (BELDA, 2010).

O diagnóstico da dermatite atópica é essencialmente clínico e se caracteriza por uma história sugestiva, com prurido, xerose cutânea e eczema crônico ou recidivante em topografia característica para a faixa etária (DARLENSKI *et al.*, 2014). Para protocolos de estudo, são utilizados os critérios diagnósticos de Hanifin e Rajka (os mais conhecidos e utilizados no mundo) que consistem na presença de 3 ou mais critérios maiores: prurido, morfologia e distribuição típica das lesões, dermatite crônica e recidivante, história pessoal ou familiar de atopia; associados a três ou mais critérios menores: xerose, início precoce da doença, ceratose pilar, dermatite de mãos e pés, dermatogrfismo branco, queilite, pregas na região cervical anterior, escurecimento periorbital, sinal de Hertogue, elevação da IgE sérica, conjuntivites recorrentes, evolução influenciada por fatores ambientais e emocionais, hipersensibilidade ao níquel, hiperlinearidade palmoplantar, tendência a infecções cutâneas, prega infra-orbitária de Dennie-Morgan, pitíriase alba, palidez ou eritema facial, eczema dos mamilos, acentuação perifolicular, alopecia areata,

hiperreatividade cutânea tipo II, intolerância alimentar, catarata, ceratocone, ictiose, e urticária (OLIVEIRA *et al.*, 2005; TOTRI, DIAZ e EICHENFIELD, 2014). Alguns indivíduos, atópicos na infância, evoluem com o desenvolvimento de rinite alérgica e asma na adolescência e idade adulta, essa progressão é designada como marcha atópica (BANTZ, ZHU e ZHENG, 2014).

Apesar de muito bem documentado o impacto negativo da DA na qualidade de vida do paciente e de seus familiares, não se utilizam rotineiramente os questionários de avaliação e escalas de gravidade na prática clínica. Entretanto, para protocolos de pesquisa, pode-se utilizar o Scoring Atopic Dermatitis (SCORAD), que é preenchido pelo médico assistente e utiliza os parâmetros de extensão e intensidade das lesões e sintomas subjetivos (sono e prurido) para avaliação do impacto da doença na vida dos pacientes (STALDER e TAIEB, 1993; BELDA *et al.*, 2010). O valor máximo do escore SCORAD é 103 ou 83, sem os sintomas subjetivos. Notas abaixo de 25 sugerem casos leves, de 25 a 50, moderados e acima de 50, graves (BELDA *et al.*, 2010) e também se utiliza o Patient Oriented SCORAD (Po-SCORAD), que oferece ao paciente a possibilidade de utilizar, sozinho, o mesmo método de avaliação que o seu médico e permite estabelecer uma curva evolutiva do eczema entre duas consultas (STALDER e TAIEB, 1993; STALDER *et al.*, 2011).

Trata-se de uma doença de etiologia multifatorial, na qual estão envolvidos genes de susceptibilidade, uma barreira cutânea deficiente, imunologia alterada e fatores ambientais (LEUNG, 2013).

Um dos grandes desafios no estudo da DA atualmente é definir o papel da imunidade inata e adquirida e seus produtos na apresentação clínica da doença.

### 1.2.1 Imunologia da dermatite atópica

A DA é uma das doenças inflamatórias cutâneas crônicas mais estudadas na atualidade e muitos esforços têm sido dispensados para melhor compreensão dos complexos mecanismos imunológicos envolvidos em sua patogênese (KASRAIE e WERFEL, 2013). Alterações nos mecanismos de imunidade inata como barreira cutânea, produtos antimicrobianos e sinalizações via citocinas e quimiocinas são identificadas, assim como de resposta adaptativa, em que há principalmente uma polarização no sentido Th2 e Th22, mas também um aumento de Th1 e Th17 (LEUNG, 2013). Controvérsias permanecem acerca do início do processo patogênico, se a doença seria promovida por uma inflamação sistêmica ocasionando disfunção de barreira epidérmica (hipótese "*inside-out*"), ou se as alterações estruturais na barreira cutânea levariam ao desequilíbrio imunológico (hipótese "*outside-in*") (SILVERBERG, N. e SILVERBERG, J., 2015). Sabe-se ainda, que há na DA, grande predisposição a infecções cutâneas, com o *Staphylococcus aureus* compondo 90% da flora microbiana da pele com lesões de eczema e colonizando também a área de pele sem lesões (YU *et al.*, 2015). Assim, a resposta inflamatória cutânea na DA envolve ativação de queratinócitos, células dendríticas, macrófagos, mastócitos e eosinófilos, com expressão de moléculas de superfície, produção de citocinas e quimiocinas por essas células. Apesar do avanço inquestionável das pesquisas na genética e imunologia, a DA permanece com patogênese enigmática e os agentes intrínsecos e extrínsecos envolvidos no desencadeamento da doença ainda não foram completamente identificados (AL-SHOBAILI *et al.*, 2016).

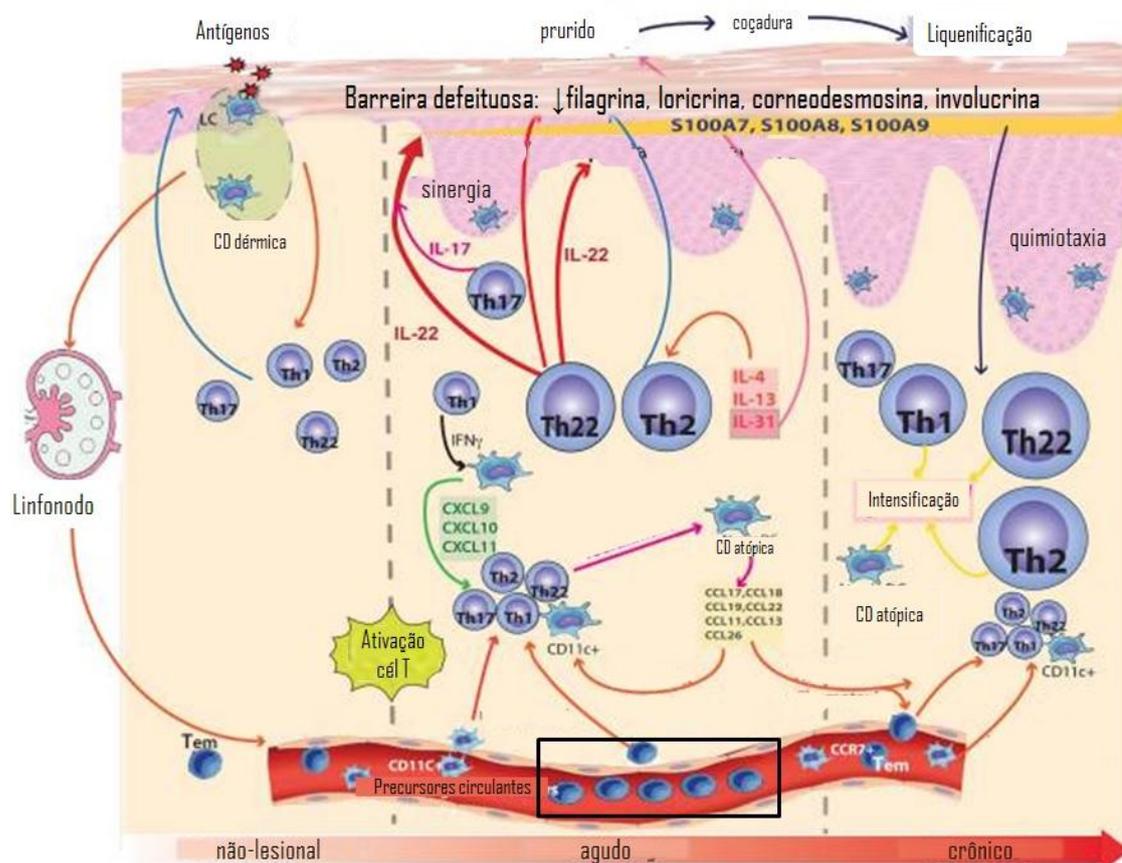
Sabe-se que alterações genéticas podem levar a modificações significativas na integridade da barreira epidérmica como, por exemplo, redução da expressão de proteínas epiteliais estruturais (filagrina, loricrina, aquaporina e involucrina), redução

da produção de lipídios (colesterol, ácidos graxos livre e ceramidas), moléculas de adesão, fatores de crescimento epidérmico e peptídeos antimicrobianos. Defeitos diferentes estão relacionados diversos graus de dano à barreira cutânea, o que leva à perda transepidérmica de água, exposição a alérgenos/irritantes, inflamação e suscetibilidade a infecções que estão associados à DA (GHOSH *et al.*, 2015). A deficiência de filagrina, por exemplo, está relacionada ao desenvolvimento da DA extrínseca em que há altos níveis de IgE total sérica, ou IgE específica para antígenos alimentares e aeroalérgenos, com maior risco de evolução para "marcha atópica" no futuro (ONG e LEUNG, 2010). Participam ainda desse processo de ruptura da integridade da barreira cutânea fatores ambientais como baixa umidade relativa do ar, irritantes cutâneos, danos mecânicos através do prurido/coçadura, quantidade de água ingerida e idade do paciente. Variações genéticas envolvendo inúmeros genes relacionados a produção de citocinas, quimiocinas, molécula de MHC de classe II, receptores de reconhecimento de padrões (PRR) também tem sido identificados em pacientes com DA em diferentes populações (AL-SHOBAILI *et al.*, 2016).

Além de alterações na imunidade inata, ocorre na DA desequilíbrio importante nas respostas Th1/Th2. Apesar de bem estabelecido o papel das alterações de barreira cutânea causando disfunções imunológicas na DA, há evidências igualmente contundentes de que a doença é causada primariamente por uma via imune polarizada, levando a alterações na diferenciação terminal dos queratinócitos com defeito de barreira cutânea secundário (LEUNG e GUTTMAN-YASSKY, 2014). A DA caracteriza-se por ser uma doença inflamatória predominantemente Th2/Th22, entretanto, tem seu desenvolvimento e progressão modulados por citocinas do perfil Th1 e Th17 (KIM *et al.*, 2016). Conforme ilustrado na figura 1, o início da fase aguda

da doença é caracterizado por um aumento de citocinas com perfil Th2 (IL4, IL5 e IL13) e IL22 (perfil Th22) que acarreta várias alterações na barreira cutânea, favorece a invasão microbiana, recruta eosinófilos e aumenta a síntese de IgE. Na fase crônica da doença, observa-se intensificação dessa resposta Th2/Th22, associada a uma contribuição importante de componente Th1, porém não chega a haver um desvio completo do perfil (BRANDT e SIVAPRASAD, 2011; GITTLER *et al.*, 2012; LEUNG e GUTTMAN-YASSKY, 2014; KIM *et al.*, 2016).

**Figura 2 - Ilustração esquemática da iniciação da dermatite atópica aguda e progressão para lesões crônicas.**



A pele sem lesões apresenta infiltrado inflamatório que contribui para ruptura da barreira cutânea. A alteração da barreira epitelial leva a penetração de antígenos, que encontram células de Langerhans na epiderme e células dendríticas na derme, induzindo mais ativação imune e recrutamento de células inflamatórias na fase aguda, na qual ocorre ativação de citocinas com perfil Th2 e Th22. Pequena contribuição de resposta Th1 e Th17 é vista nas lesões agudas. Com a progressão para a cronicidade, observa-se progressiva ativação de Th2 e Th22, assim como um aumento da atividade de citocinas com perfil Th1. A indução de cada subtipo de linfócito T, de acordo com o estágio da doença, está representada esquematicamente pela diferença de tamanho em relação a outros subtipos. Células T e células dendríticas produzem citocinas e quimiocinas que ocasionam ativação e recrutamento de outras células imunes. IL-22, junto com IL-17 induzem hiperplasia epidérmica (via S100A7, S100A8 e S100A9), na fase crônica da doença. Esse aumento nas proteínas da barreira cutânea contrasta com

o defeito de barreira visualizado na pele sem lesões e nas lesões agudas que ocorre por alteração de proteínas epiteliais estruturais (filagrina, loricrina, corneodesmosina) em resposta a citocinas Th2 e Th22. A IL-31 está elevada na fase aguda e representa forte mediador do prurido na DA. O retângulo preto destaca a importância dos monócitos, enquanto precursores das células apresentadoras de antígeno. Fonte: Adaptado de Gittler, 2012.

Um fato interessante a ser ressaltado é que crianças com dermatite atópica manifestam maior desequilíbrio na relação Th2/Th1, com redução de resposta Th1 quando comparados a adultos com DA. Este achado justifica o fenótipo alérgico mais observado em crianças e se correlaciona com produção de IgE (vista em cerca de 70% das crianças atópicas). Sabe-se também que adultos portadores de DA apresentam resposta Th22 mais proeminente que crianças com a doença. Considerando o papel da IL-22 no desenvolvimento de hiperplasia epidérmica, isso poderia justificar a predominância de lesões mais crônicas e liquenificadas nessa população. Aproximadamente 75% das crianças atópicas alcançam remissão em torno dos 10 anos de vida. Isso poderia ser justificado pelo desenvolvimento da resposta Th1, suprimindo os efeitos das respostas Th2 e Th22 (CZARNOWICKI *et al.*, 2015).

Nesse denso panorama imunológico, os macrófagos, enquanto células fagocíticas, apresentadoras de antígeno e imunorreguladoras, por causa do seu caráter multifacetado e sua capacidade de promover ou controlar manifestações de doenças alérgicas, desempenham um papel central na inflamação e imunologia (KASRAIE e WERFEL, 2013), e os monócitos, como seus precursores na circulação sistêmica, têm papel relevante (figura 2).

A caracterização fenotípica dos subtipos de monócitos na dermatite atópica, considerando parâmetros de densidade e tamanho celular foi realizada por Zheng Mrowietz em 1997 e, em 2002, Novak *et al.* realizaram o estudo das subpopulações de monócitos em pacientes com a forma alérgica de dermatite atópica, baseando-se

na expressão do CD14, CD64 e CD16. Ambos os estudos avaliaram pacientes adultos acometidos pela doença. Entretanto, não há, desde então, outros estudos que avaliem o perfil monocitário na doença.

Diante da escassez de dados na literatura, surgiu o interesse em identificar e as subpopulações de monócitos, avaliando a expressão de moléculas de superfície e citocinas que potencialmente funcionem como marcadores prognósticos na dermatite atópica. O presente estudo caracteriza essas populações celulares, de forma pioneira, na população infantil, portadora da doença.

Ao se considerar o estudo da DA em crianças, e conhecendo as particularidades da resposta imunológica em diferentes faixas etárias, sentimos a necessidade de realizar previamente um estudo comparativo da caracterização dos subtipos de monócitos entre crianças e adultos saudáveis

## **2 HIPÓTESE**

A hipótese que norteou a elaboração desse trabalho é a de que diferenças na expressão de moléculas de superfície e citocinas pró e anti-inflamatórias entre monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos estariam diretamente envolvidas na patogênese e apresentação clínica da dermatite atópica em crianças.

### 3 JUSTIFICATIVA

Os monócitos são atores primordiais na iniciação, desenvolvimento e resolução da resposta imunológica (MILLS, LENZ, e LEY, 2015). A relevância da atuação monócitos clássicos, monócitos não-clássicos e monócitos intermediários na etiopatogênese de enfermidades inflamatórias, neoplásicas, parasitárias e alérgicas tem sido objeto de estudo nas últimas décadas, mas muito se tem a elucidar acerca da participação da imunidade inata na resposta imune em indivíduos saudáveis e nessas condições patológicas.

A dermatite atópica é uma doença inflamatória cutânea crônica, de etiologia multifatorial e patogenia complexa, envolvendo fatores genéticos e ambientais (DARLENSKI *et al.*, 2014; PENG e NOVAK, 2015). No entanto, algumas questões envolvendo a patogênese da dermatite atópica permanecem obscuras

Estratégias experimentais refinadas de análises citométricas de parâmetros múltiplos foram empregadas neste estudo. Nossa expectativa é que as informações adquiridas pela realização deste trabalho ampliem nossos conhecimentos acerca das subpopulações de monócitos em indivíduos saudáveis de diferentes faixas etárias e em crianças portadoras de DA, contribuindo assim para um maior conhecimento da imunopatologia dessa doença incapacitante e gere novas perspectivas para realização de estudos imunológicos que possam beneficiar diretamente a população de indivíduos acometidos pela doença.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

Estudar as características funcionais das subpopulações de monócitos clássicos, não-clássicos e intermediários, determinando sua caracterização fenotípica e produção de citocinas em indivíduos saudáveis (adultos e crianças) e em crianças portadoras de dermatite atópica.

### **4.2 Objetivos específicos**

Em relação à caracterização de monócitos circulantes de crianças e adultos saudáveis, os objetivos específicos foram:

- Caracterizar fenotipicamente as subpopulações de monócitos (clássicos, intermediários e não clássicos) através da análise da expressão de CD14, CD16 e HLA-DR.
- Avaliar a frequência relativa de monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos em adultos e em crianças, e correlacionar a frequência de cada subpopulação celular entre os dois grupos estudados.
- Comparar a expressão de HLA-DR dos subtipos de monócitos dentro das populações de adultos e crianças e entre essas populações.
- Analisar a frequência e expressão de CCR5, CD80, CD86 E PDL-1 nos subtipos de monócitos na população adulta e infantil e comparar os mesmos parâmetros entre essas duas populações.

- Comparar os diferentes subgrupos de monócitos no que diz respeito à frequência e expressão das citocinas IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10 dentro das populações de adultos e crianças saudáveis, assim como entre essas populações.

Em relação ao estudo comparativo das subpopulações de monócitos de crianças saudáveis e crianças portadoras de dermatite atópica (DA), os objetivos foram:

- Analisar a expressão de CD14, CD16 e HLA-DR, objetivando caracterizar subpopulações de monócitos.
- Quantificar a frequência relativa de monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos dentro dos grupos de crianças saudáveis e crianças com DA e comparar os subtipos celulares entre esses dois grupos populacionais.
- Comparar a expressão de HLA-DR entre os subtipos de monócitos dentro das populações estudadas e entre essas populações.
- Avaliar a frequência e expressão de CCR5, CD80, CD86, PDL-1 em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos, comparando esses parâmetros em cada grupo e entre esses.
- Avaliar monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos de crianças saudáveis e crianças com DA, no tocante à frequência e expressão das citocinas IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10 e comparar os subtipos de monócitos dos dois grupos populacionais em relação a esses marcadores imunológicos

## **5 MATERIAL E MÉTODO**

Essa pesquisa foi realizada em duas fases. Inicialmente, foi feito um estudo comparativo das características funcionais das subpopulações de monócitos, expressão de moléculas de superfície e citocinas entre crianças e adultos saudáveis. Na segunda etapa, foram analisadas subpopulações de monócitos de crianças portadoras de DA, avaliando o potencial de marcadores imunológicos e expressão de citocinas dessas células na etiopatogênese da doença e identificando as diferenças existentes entre crianças com DA e crianças saudáveis.

### **5.1 Amostras clínicas**

Na primeira etapa do estudo, coletou-se amostras de sangue de voluntários adultos (n=7), que foram ao Centro de Biotecnologia na UFPB e crianças saudáveis (n=7), de 0 a 12 anos de idade, que seriam submetidas a cirurgias eletivas no Bloco Cirúrgico do HULW/UFPB. Esses voluntários foram submetidos a anamnese detalhada para excluir doenças alérgicas e/ou inflamatórias e exame físico cuidadoso e os responsáveis legais das crianças responderam um questionário, contendo ficha de identificação e anamnese completa da criança, assim como autorização para participação na pesquisa.

Na segunda fase da pesquisa, amostras de sangue periférico de crianças (n=5) com história e sinais clínicos compatíveis com DA moderada e 1 criança com DA grave, foram colhidas no Ambulatório de Dermatologia Pediátrica do HULW e encaminhadas para o Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas da UFPB. Todas as amostras foram acompanhadas de ficha de identificação e dados de coleta e ainda de termo de consentimento preenchido pelos responsáveis legais e

autorização para realização e utilização de documentação fotográfica das lesões cutâneas.

Foram considerados para a participação na pesquisa crianças entre zero e doze anos, que preenchiam os critérios diagnósticos de Hanifin e Rajka para DA. Nenhum dos pacientes tinha iniciado o tratamento clínico específico para a doença. Esses pacientes foram classificados, de acordo com a idade de aparecimento da doença em portadores de dermatite atópica infantil (três meses a dois anos de idade) e dermatite atópica pré-puberal (dos três aos doze anos), quanto à gravidade, em acometidos por uma forma leve, moderada ou grave, utilizando para isso o *Scoring Atopic Dermatitis* (SCORAD), preenchido pelo médico assistente (Tabela 1). Essa ferramenta utiliza os parâmetros de extensão e intensidade das lesões e sintomas subjetivos, sono e prurido, para avaliação da gravidade (anexo B). O valor máximo do escore SCORAD é 103 ou 83, sem os sintomas subjetivos. Notas abaixo de 25 sugerem casos leves, de 25 a 50, moderados e acima de 50, graves. Realizamos documentação fotográfica das lesões cutâneas para registrar a gravidade do quadro clínico (Figura 3).

Figura 3 - Criança, 4 anos, portadora de DA



Tabela 1 - SCORAD dos pacientes portadores de DA

Identificação	A=Superfície total com eczema	Eritema	Edema	Crostas	Escoriação	Liquenificação	Xerose	B=Intensidade	Prurido	Perda de sono	C=Sinais subjetivos	SCORAD	SCORAD objetivo
DA1	17	1	0	2	2	1	1	7	2,6	1,1	3,7	31,6	27,9
DA2	17	1	0	1	2	1	2	7	5,6	5,4	11,0	38,9	27,9
DA3	24	1	0	2	2	1	1	7	3,9	1,1	5,0	34,3	29,3
DA4	27	2	0	1	2	1	2	8	7,1	6,8	13,9	47,3	33,4
DA5	34	1	0	2	1	3	3	10	2,3	0,0	2,3	44,1	41,8
DA6	50	2	1	3	3	1	2	12	10,0	10,0	20,0	72,1	52,1

Todos os indivíduos que contribuíram para a realização deste trabalho participaram da pesquisa com autorização voluntária de seus representantes legais, sendo estes esclarecidos sobre a importância do trabalho, e orientados a assinar o termo de consentimento esclarecido (TCLE), caso concordassem com a participação da criança no estudo. Esse projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba (CAAE: 47324115.4.0000.5183 / número do parecer: 1217205) (Anexo A).

A amostra utilizada é uma amostra de conveniência e é baseada em estudos anteriores que utilizaram metodologia semelhante (Keesen *et al.*, 2011). Devido a se tratar de um estudo de identificação de marcadores celulares em humanos, que envolve pacientes, os trabalhos de pesquisa em diferentes doenças optam pela amostragem de conveniência, e também por causa do alto custo da técnica imunológica (citometria de fluxo) para avaliação das amostras.

## **5.2 Obtenção de leucócitos para ensaios biológicos**

Aproximadamente 10 mL de sangue heparinizado de indivíduos saudáveis (adultos e crianças) e pacientes identificados como portadores de DA moderada (n=5) foram processadas. A criança portadora de dermatite atópica grave, classificada através da aplicação do SCORAD, não foi considerada para a avaliação e análise através da citometria de fluxo. Os leucócitos dessas amostras, obtidos pela lise de hemácias (Solução de Lise, BD Bioscience, CA, USA), foram lavados três vezes com tampão salina-fosfato (PBS), sendo centrifugados a 200 x g, 4°C, 10 min. Os leucócitos obtidos foram então resuspensores em um volume de 1 mL de PBS e utilizados para análises biológicas.

### **5.3 Imunofluorescência para análise de monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos expressando marcadores de superfície e intracelulares**

Utilizando-se placa estéril de 96 poços, foram adicionadas  $2,5 \times 10^5$  células em cada poço, conjuntamente com 175  $\mu\text{L}$  de RPMI suplementado com L-Glutamina. Acrescentou-se, aos poços, 10 $\mu\text{L}$  de brefeldina A (1 mg/ml) nos poços que receberiam anticorpos para alvos intracelulares, deixando agir por quatro horas em estufa de  $\text{CO}_2$ . A brefeldina A age sobre a estrutura do complexo de Golgi impedindo, deste modo, que haja exportação de proteínas para o meio extracelular. Ao final das quatro horas, a placa foi retirada da estufa e centrifugada por 10 minutos (200 x g,  $4^\circ\text{C}$ ). Após desprezar o sobrenadante, as células foram suspensas por agitação. Em seguida, adicionou-se os anticorpos antimarcadores de superfície de isotipo marcados anti-CD14, anti-CD16, anti-CCR5, anti-PDL-1, anti-CD80, anti-CD86 e anti-HLA-DR, já diluídos, conforme titulação padronizada na fase de padronização dos reagentes, num volume final de 40 $\mu\text{L}$ . Após adição dos anticorpos, incubou-se a placa a  $4^\circ\text{C}$  por 15 minutos ao abrigo da luz. Terminado o período de incubação, as células foram lavadas adicionando 150 $\mu\text{L}$  de PBS gelado em cada poço. A placa foi então, centrifugada durante 10 minutos (200 x g,  $4^\circ\text{C}$ ). Ao final da centrifugação, verteu-se a placa para retirar o sobrenadante e, em seguida, foi agitada a fim de suspender as células. De posse das células já suspensas, foi adicionado, finalmente, 100 $\mu\text{L}$  de PBS e 100 $\mu\text{L}$  de solução de formaldeído 4%, para a fixação por 20 minutos à temperatura ambiente.

Após remover a solução de fixação por centrifugação e lavar as células com 150 $\mu\text{L}$  de PBS, procedeu-se a permeabilização celular, incubando as células por 10 minutos com solução de saponina 0,5% à temperatura ambiente. Ao final do período

de incubação, a placa foi centrifugada por 10 minutos (200 x g, 4°C), o sobrenadante desprezado e a placa agitada. Em seguida, adicionou-se sobre as células, 40µL da solução de anticorpos anticitocinas adequadamente diluídos em solução de saponina 0,5% (anti-IL-10, anti-IL-6, anti-TNF-α). As amostras foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. Após este período, as células foram lavadas, por centrifugação adicionando a cada poço, 150µL da solução de PBS. Repetiu-se esse processo duas vezes. Finalmente, após desprezar o sobrenadante e agitar a placa, diluiu-se as células em 200µL de wash B. O volume final de solução contendo as células marcadas foi transferido para tubos próprios para leitura no citômetro de fluxo FACSCANTO II (Becton & Dickinson). As células foram mantidas a 4°C, ao abrigo da luz para que as fluorescências não fossem perdidas até a leitura no citômetro, que ocorreu no dia seguinte.

#### **5.4 Anticorpos monoclonais**

Os anticorpos *utilizados* e seus respectivos fluorocromos foram os seguintes: anti-CD16 FITC, anti-CD80 PE, anti-CCR5 PE, anti-TNF-α PE, anti-IL-6 PE, anti-CD16 PE, anti-HLA-DR PE, anti-CD14 PECy5, anti-CD274 (PDL1) PECy7, anti-HLA-DR APC, anti-CD86 APC, anti-IL-10 APC. Todos os anticorpos utilizados foram adquiridos das companhias BD Pharmingen™ (CA, USA) ou Ebioscience (San Diego, CA, USA).

Tabela 2 - Pannel de anticorpos utilizados na citometria de fluxo nos seus respectivos fluorocromos.

FITC	PE	PECy5	PECy7	APC
CD16	CD80	CD14	X	HLA-DR
CD16	CCR5	CD14	X	HLA-DR
CD16	TNF-a	CD14	X	HLA-DR
CD16	IL-6	CD14	X	HLA-DR
X	CD16	CD14	CD274 (PD1L)	HLA-DR
CD16	HLADR	CD14	X	CD86
CD16	HLADR	CD14	X	IL10

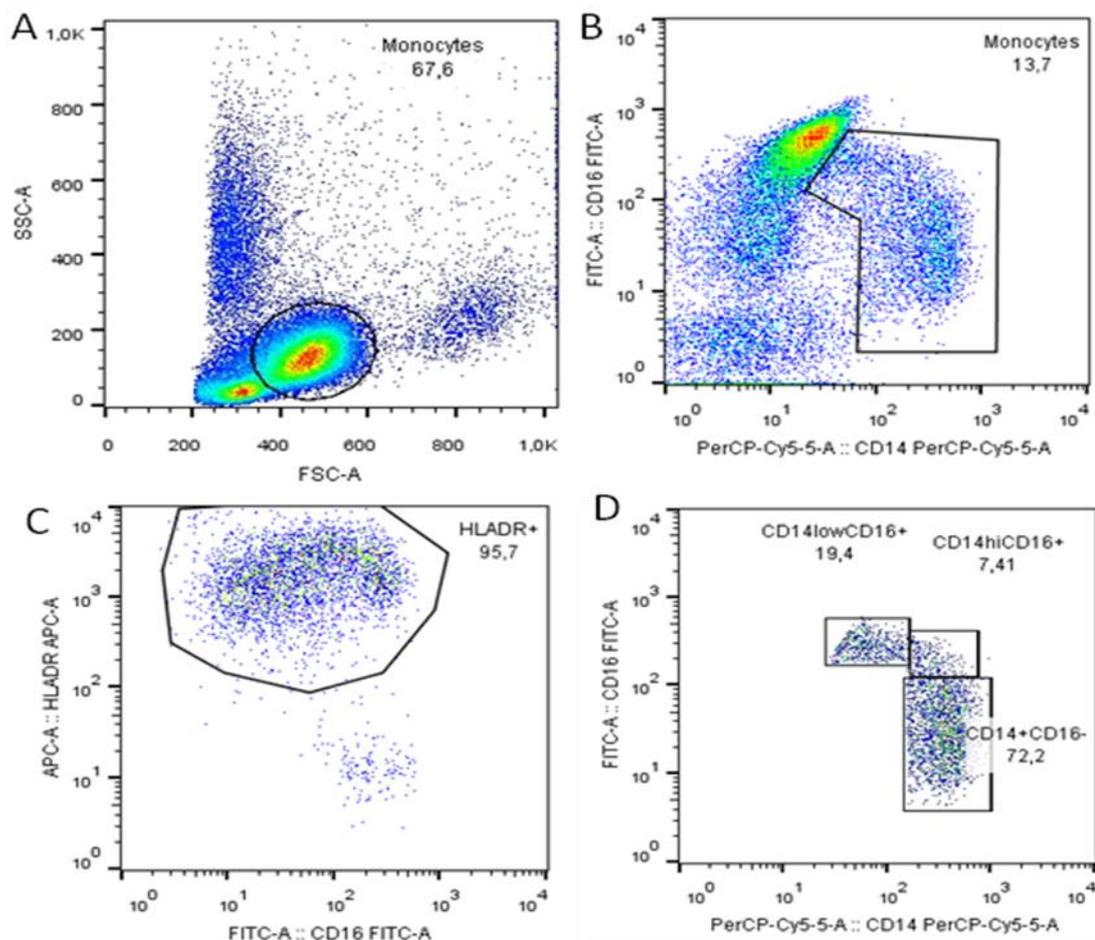
### 5.5 Aquisição e análise dos dados por citometria de fluxo

As preparações celulares marcadas com os anticorpos monoclonais fluorescentes foram avaliadas em citômetro de fluxo - FACSCANTOII (Becton & Dickinson). Durante a aquisição dos dados coletou-se 50.000 eventos. Os dados coletados foram analisados utilizando o programa de computador *Flowjo* (Tree Star).

Inicialmente, para a identificação da população celular de interesse, utilizou-se o perfil de tamanho e granulosidade das populações adquiridas e a expressão de marcadores fenotípicos (Figura 3). A delimitação da região onde se encontravam os monócitos foi feita baseando-se em conhecimento prévio da localização dessas células no gráfico tamanho vs. granulosidade (Figura 3A). Em seguida, essas células foram visualizadas no gráfico CD14 vs. CD16 selecionando-se mais uma vez a população de monócitos (Figura 3B). Consideramos como "monócitos verdadeiros" as células desse grupo que apresentavam positividade para a molécula MHC de classe II visualizada no gráfico CD16 vs HLA-DR (Figura 3C). Esses últimos foram então visualizados novamente no gráfico CD14 vs. CD16 e subdivididos em

CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>-</sup> (monócitos clássicos), CD14<sup>hi</sup>/CD16<sup>+</sup> (monócitos intermediários) e CD14<sup>lo</sup>/CD16<sup>+</sup> (monócitos não-clássicos) (Figura 3D).

Figura 4. Estratégia de análise por citometria de fluxo.



(A) As células foram visualizadas no gráfico tamanho vs. granulosidade (FSC vs. SSC) e foi realizado um *gate* amplo em torno da população de monócitos, excluindo a maioria dos debris e linfócitos. (B) Em seguida, essas células foram visualizadas no gráfico CD14 vs CD16 selecionando-se mais uma vez a população de monócitos. (C) Quando essa população selecionada foi colocada no gate CD16 vs HLA-DR, uma população de células contaminantes, "não-monócitos" foi facilmente distinguida dos "monócitos verdadeiros". (D) Esses últimos foram então visualizados novamente no gráfico CD14 vs. CD16 e subdivididos em CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> (monócitos clássicos), CD14<sup>hi</sup>CD16<sup>+</sup> (monócitos intermediários) e CD14<sup>lo</sup>CD16<sup>+</sup> (monócitos não-clássicos).

Uma vez identificados os subgrupos de monócitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> (monócitos clássicos), CD14<sup>hi</sup>CD16<sup>+</sup> (monócitos intermediários) e CD14<sup>lo</sup>CD16<sup>+</sup> (monócitos não-clássicos), procedeu-se às análises de fluorescência, identificando, dentro de

cada população celular os marcadores imunológicos de superfície (CCR5, CD80, CD86, PD1L) e as citocinas (IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10).

Caracterizadas as porcentagens de células positivas para cada marcador, procedeu-se o cálculo da intensidade média de fluorescência (MFI) para cada molécula estudada, que indica o quanto a célula está expressando determinado marcador.

## 5.6 Análise estatística

Para análise da frequência dos subtipos de monócitos (clássicos, intermediários e não-clássicos), assim como da expressão dos marcadores extracelulares e citocinas (HLA-DR, CCR5, CD80, CD86, PD-1L, IL-6 e TNF- $\alpha$ , IL-10) nesses subtipos celulares, dentro de cada grupo separadamente (crianças e adultos saudáveis e crianças atópicas), foi aplicado o *one-way analysis of variance* (ANOVA) seguido pelo teste *post-hoc* de Tukey. Para a análise comparativa da frequência das subpopulações de monócitos e expressão das moléculas estudadas entre os grupos de crianças e adultos saudáveis, assim como entre crianças saudáveis e crianças doentes foi utilizado Teste t não pareado. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando  $p < 0.05$ .

## **6 RESULTADOS**

Os resultados desse estudo serão descritos em duas partes, relativas aos objetivos específicos.

### **6.1 Caracterização dos monócitos circulantes em adultos e crianças saudáveis.**

O processo de polarização dos monócitos com expressão de moléculas de superfície e produção de citocinas caracteriza-se por extrema plasticidade e está diretamente relacionado ao microambiente para o qual essas células são recrutadas. Considerando-se que diferenças relevantes são reconhecidas entre o sistema imunológico do adulto e da criança e que os monócitos exercem papel fundamental no desenvolvimento da resposta imune inata e adquirida, analisamos os monócitos de crianças e adultos saudáveis, caracterizando os subtipos destas células. Avaliamos nesta pesquisa 7 adultos sendo um do sexo masculino e seis do sexo feminino, com idade entre 18 e 62 anos, e 7 crianças, sendo 5 meninos e duas meninas, com idade entre 2 e 8 anos, e nenhum dos voluntários apresentava, no momento da consulta, sinais de doenças inflamatórias, alérgicas ou infecciosas (quadro 1)

Quadro 1 - Características dos voluntários saudáveis

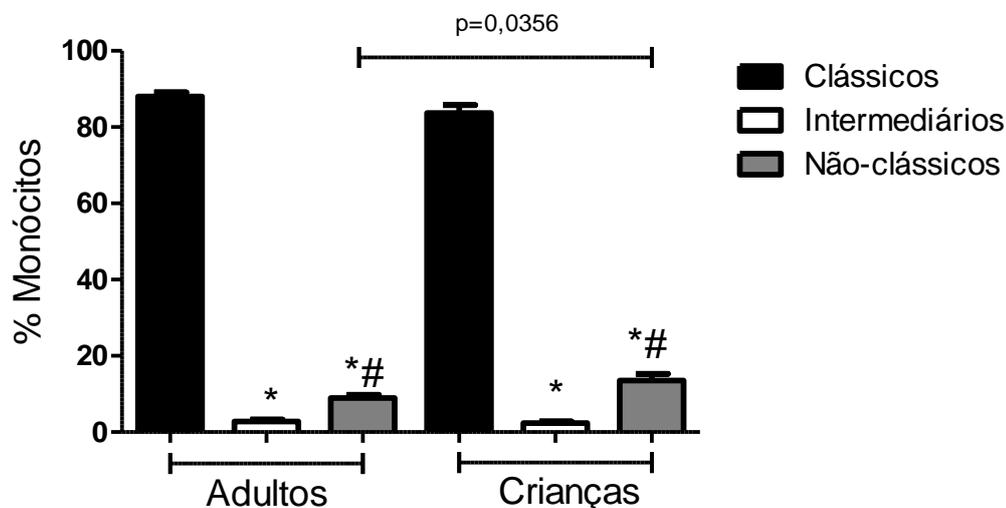
Indivíduo	Adultos		Crianças	
	Sexo	Idade (anos)	Sexo	Idade (anos)
1	feminino	18	feminino	6
2	masculino	20	masculino	5
3	feminino	19	masculino	2
4	feminino	49	feminino	8
5	feminino	50	masculino	3
6	feminino	20	masculino	4
7	feminino	62	masculino	2

**6.1.1 Adultos e crianças saudáveis, quando comparados entre si, apresentam frequência relativa dos subtipos de monócitos semelhante, com predomínio de monócitos clássicos. Entretanto, as crianças apresentam maior população de monócitos não-clássicos que os adultos.**

A figura 5 mostra a análise comparativa da frequência de monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos em adultos e crianças saudáveis. A análise revelou uma maior quantidade de células com fenótipo clássico (barra preta), seguida pelos monócitos não-clássicos (barra cinza) e uma menor proporção de monócitos intermediários (barra branca) nos dois grupos estudados.

Observamos que não houve diferença significativa na frequência de monócitos clássicos e intermediários comparando-se adultos e crianças, mas observa-se maior proporção de monócitos não-clássicos no grupo de crianças. ( $p=0,0356$ ).

**Figura 5 - Análise comparativa da frequência de monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos entre adultos e crianças saudáveis.**



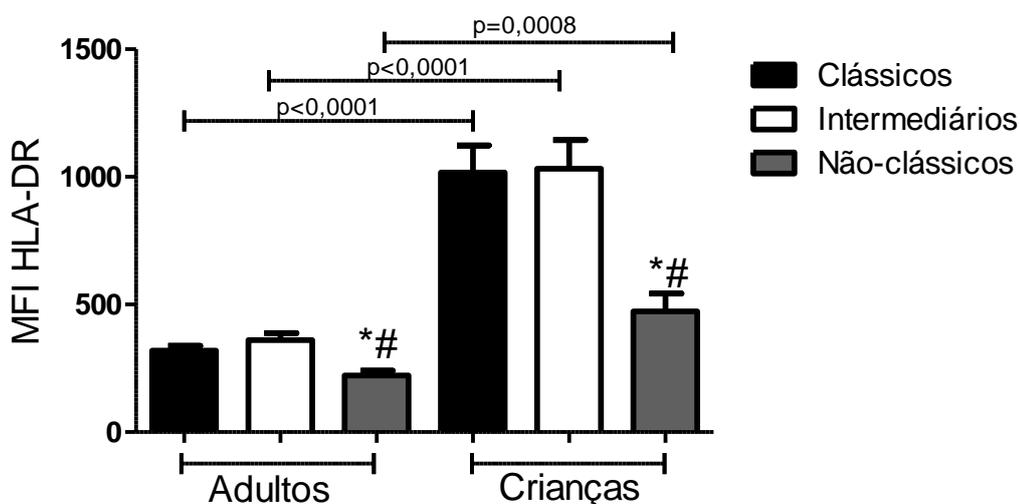
Frequência relativa de monócitos clássicos (barra preta), intermediários (barra branca) e não-clássicos (barra cinza) em adultos (n=7) e crianças saudáveis (n=7) avaliada por citometria de fluxo. A diferença foi significativa e determinada por teste One-Way ANOVA Tukey, considerando a diferença entre os tipos de monócitos dentro de cada grupo (adultos e crianças) e pelo teste T não-pareado ao se comparar os dois grupos populacionais quanto aos subtipos de monócitos. Foi considerado  $p < 0,05$ . (\*) representa diferença significativa de monócitos intermediários e monócitos não-clássicos em relação a monócitos clássicos, (#) revela diferença entre monócitos não-clássicos e monócitos intermediários. O traço acima das barras representa a diferença entre monócitos do mesmo subtipo em grupos distintos.

### **6.1.2 Crianças saudáveis apresentam maior expressão de HLA-DR em monócitos clássicos, monócitos intermediários e monócitos não-clássicos quando comparados aos adultos saudáveis e há maior expressão de HLA-DR em monócitos clássicos e intermediários que em monócitos não-clássicos em ambos os grupos**

Procedeu-se a avaliação da molécula de MHC de classe II, essencial para a atividade de apresentação antigênica dos monócitos. Verificou-se, na figura 6, que monócitos não-clássicos de adultos e crianças saudáveis apresentam menor expressão de HLA-DR que monócitos clássicos e intermediários. Analisando comparativamente os grupos de adultos e crianças, verifica-se maior expressão em monócitos clássicos (barra preta), intermediários (barra branca) e não-clássicos

(barra cinza) de crianças do que de adultos saudáveis. A frequência de monócitos HLA-DR positivos não foi avaliada, uma vez que se trata de molécula constitutiva presente em todos os subtipos de monócitos, utilizada na identificação dessas células.

**Figura 6 - Análise comparativa da expressão de HLADR em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos entre adultos e crianças saudáveis.**



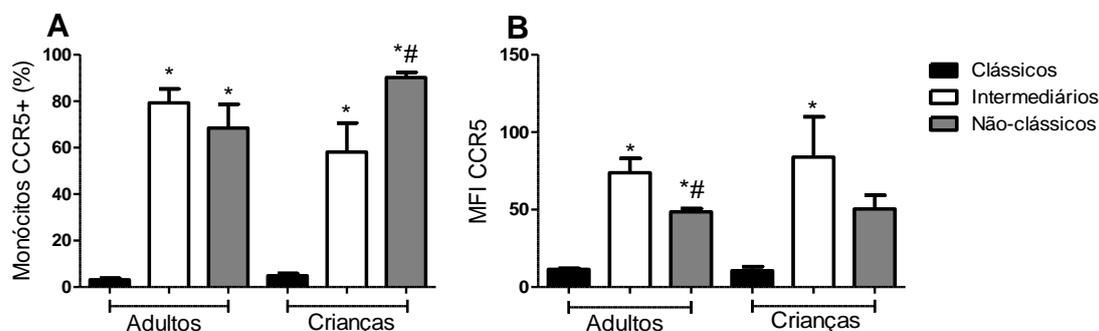
Expressão de HLA-DR em monócitos clássicos (barra preta), intermediários (barra branca) e não-clássicos (barra cinza) de adultos ( $n=7$ ) e crianças saudáveis ( $n=7$ ) avaliada por citometria de fluxo. A diferença foi significativa e determinada por teste *One-Way ANOVA* seguido pelo teste *post-hoc* de Tukey, considerando a diferença entre os tipos de monócitos dentro de cada grupo (adultos e crianças) e pelo teste T não-pareado ao se comparar os dois grupos populacionais quanto aos subtipos de monócitos. Foi considerado  $p < 0,05$ . (\*) representa diferença significativa de monócitos não-clássicos em relação a monócitos clássicos, (#) revela diferença entre monócitos não-clássicos e monócitos intermediários. O traço acima das barras representa a diferença entre monócitos do mesmo subtipo em grupos distintos.

### 6.1.3 Adultos e crianças saudáveis apresentam maior frequência e expressão de CCR5 em monócitos intermediários e não-clássicos do que em monócitos clássicos

Na figura 7A, observa-se a frequência de monócitos clássicos (barra preta), intermediários (barra branca) e não-clássicos (barra cinza) CCR5 positivos e a

expressão (Figura 7B) dessa molécula nos subtipos celulares de adultos e crianças saudáveis.

**Figura 7 - Análise comparativa da expressão de CCR5 em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos em adultos e crianças saudáveis.**



O gráfico A representa o percentual de monócitos clássicos (barra preta), intermediários (barra branca) e não-clássicos (barra cinza) CCR5+ nos grupos de adultos (n=7) e crianças saudáveis (n=7). Em B, observa-se a expressão de CCR5 em monócitos clássicos (barra preta), intermediários (barra branca) e não-clássicos (barra cinza) em adultos (n=7) e crianças saudáveis (n=7). Os dados foram obtidos através de citometria de fluxo. A diferença foi significativa e determinada por teste *One-Way* ANOVA seguido pelo teste *post-hoc* de Tukey, considerando a diferença entre os tipos de monócitos dentro de cada grupo (adultos e crianças) e pelo teste T não-pareado ao se comparar os dois grupos populacionais quanto aos subtipos de monócitos. Foi considerado  $p < 0,05$ . (\*) representa diferença de monócitos intermediários e monócitos não-clássicos em relação a monócitos clássicos, (#) revela diferença entre monócitos não-clássicos e monócitos intermediários.

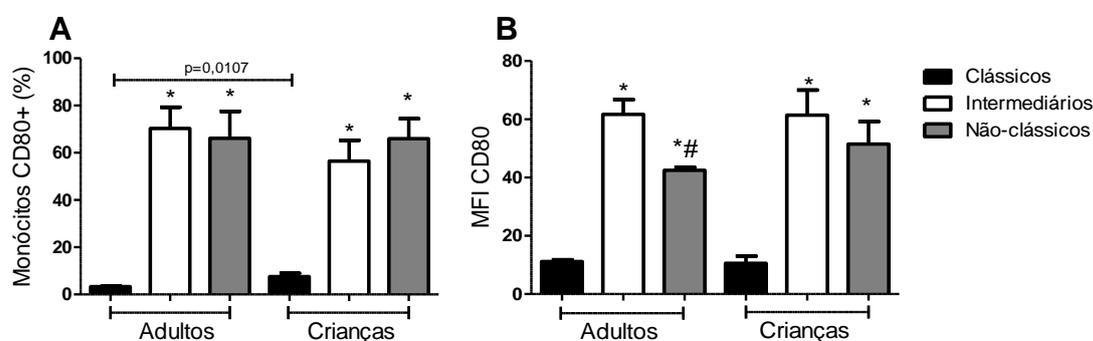
Em (A), no grupo de adultos saudáveis, há maior percentual de monócitos não-clássicos e intermediários CCR5+, em relação a monócitos clássicos. No gráfico B, há maior expressão de CCR5 é maior em monócitos intermediários, quando comparado a monócitos clássicos e não-clássicos na população adulta, enquanto, na população infantil, ocorre maior expressão de CCR5 em monócitos intermediários, comparativamente a monócitos clássicos, mas não em relação a não-clássicos. Não se observou diferença, quando se compara os subtipos de monócitos quanto à frequência (A) ou MFI (B) de CCR5, entre os grupos de adultos e crianças.

**6.1.4 A frequência e expressão do CD80 foi maior em monócitos intermediários e não-clássicos de crianças e adultos saudáveis e a**

## expressão de CD86 foi maior em monócitos intermediários dos dois grupos

Analisou-se a frequência (A) e expressão (B) de CD80, molécula coestimulatória, nos subtipos de monócitos (Figura 8). Em (A) foi observada uma maior porcentagem de monócitos intermediários (barra branca) e não-clássicos (barra cinza) expressando CD80, em relação a monócitos clássicos (barra preta) em adultos, assim como em crianças saudáveis. Comparando-se os dois grupos, observamos maior frequência de CD80 em monócitos clássicos de crianças que em adultos. Ao considerar a média da intensidade de fluorescência, gráfico (B), na população adulta, observa-se maior expressão de CD80 em monócitos intermediários e não-clássicos em comparação a monócitos clássicos, e menor expressão desta molécula em monócitos não-clássicos em relação a intermediários. Já no grupo de crianças saudáveis, há maior expressão em monócitos não-clássicos e intermediários, quando comparado a monócitos clássicos, mas não há diferença entre estas duas populações celulares. Também não ocorre diferença na expressão da molécula entre as populações de adultos e crianças.

**Figura 8 - Análise comparativa da expressão de CD80 em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos em adultos e crianças saudáveis.**

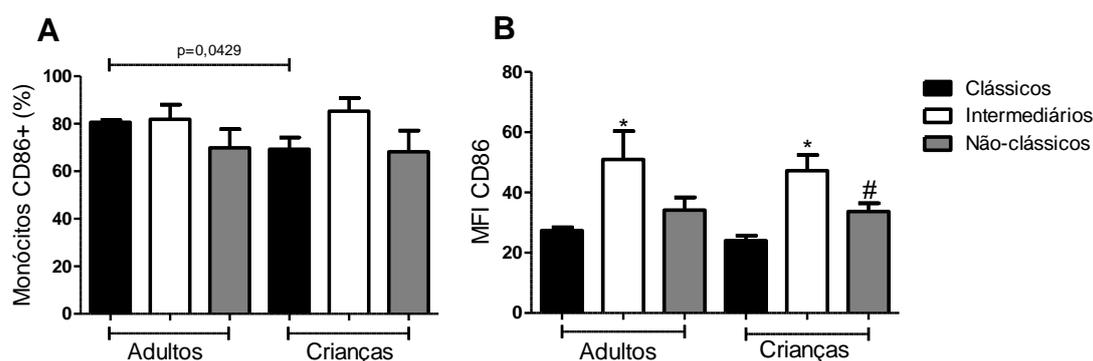


Porcentagem de monócitos clássicos (barra preta), intermediários (barra branca) e não-clássicos (barra cinza) expressando CD80 nos grupos de adultos (n=7) e crianças saudáveis (n=7) (A). Em B, observa-se a expressão de CD80 em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos de adultos (n=7) e crianças saudáveis (n=7). Os dados foram obtidos através de citometria de fluxo. A diferença foi significativa e determinada por teste *One-*

Way ANOVA seguido pelo teste *post-hoc* de Tukey, considerando a diferença entre os tipos de monócitos dentro de cada grupo (adultos e crianças) e pelo teste T não-pareado ao se comparar os dois grupos populacionais quanto aos subtipos de monócitos. Foi considerado  $p < 0,05$ . (\*) representa diferença de monócitos intermediários e não-clássicos em relação a monócitos clássicos, (#) revela diferença entre monócitos não-clássicos e intermediários. O traço acima das barras representa a diferença entre monócitos do mesmo subtipo em grupos distintos.

Avaliamos, na figura 9, a frequência (A) e a expressão (B) de CD86, molécula coestimulatória com função semelhante ao CD80. Em (A), não há diferença entre os monócitos clássicos (barra preta), intermediários (barra branca) e não-clássicos (barra cinza) na população adulta nem na infantil. Observa-se, entretanto, uma menor frequência de monócitos clássicos de crianças expressando CD86, quando comparados com adultos. Quando se analisa a expressão (Figura 9B), temos, em ambos os grupos, adultos e crianças, maior expressão de CD86 em monócitos intermediários em relação aos clássicos e, apenas no grupo de crianças, há menor expressão em monócitos não-clássicos, quando comparados a monócitos intermediários.

**Figura 9 - Análise comparativa da expressão de CD86 em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos em adultos e crianças saudáveis.**

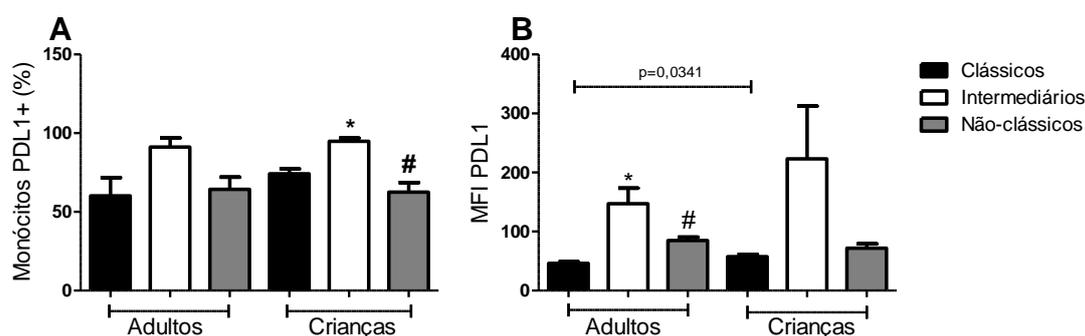


Em A, observamos o percentual de monócitos clássicos (barra preta), intermediários (barra branca) e não-clássicos (barra cinza) CD86+ em adultos (n=7) e crianças saudáveis (n=7). Em B, temos a expressão de CD86 em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos de adultos (n=7) e crianças saudáveis (n=7). Os dados foram obtidos através de citometria de fluxo e análise pelo Flowjo. A diferença foi significativa e determinada por teste *One-Way* ANOVA seguido pelo teste *post-hoc* de Tukey, considerando a diferença entre os tipos de monócitos dentro de cada grupo (adultos e crianças) e pelo teste T não-pareado ao se comparar os dois grupos populacionais quanto aos subtipos de monócitos. Foi considerado  $p < 0,05$ . (\*) representa diferença de monócitos intermediários em relação a monócitos clássicos, (#) revela diferença entre monócitos não-clássicos e monócitos intermediários. O traço acima das barras representa a diferença entre monócitos do mesmo subtipo em grupos distintos.

### 6.1.5 O percentual de monócitos expressando PDL-1 em subtipos de monócitos é semelhante em adultos e crianças, entretanto, há maior expressão dessa molécula em monócitos clássicos de crianças

Ao realizarmos a análise comparativa da frequência dessa molécula (Figura 10A) entre os dois grupos (adultos e crianças), não observamos diferença significativa entre as populações de monócitos estudadas. No grupo de crianças, visualizamos maior percentual de monócitos intermediários expressando PDL-1 em comparação a monócitos clássicos e não-clássicos. Na figura 10B, considerando a população adulta, evidencia-se maior expressão de PDL-1 nos monócitos intermediários comparativamente a monócitos clássicos e não-clássicos. Avaliando-se o grupo de crianças, não há diferença entre as populações de monócitos analisadas. Constata-se, ainda, ao se comparar os grupos de adultos e crianças, maior expressão de PDL1 em monócitos clássicos de crianças que no mesmo grupo celular em adultos.

**Figura 10 - Análise comparativa da expressão de PDL1 em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos em adultos e crianças saudáveis.**



Em A, percentual de monócitos clássicos (barra preta), intermediários (barra branca) e não-clássicos (barra cinza) expressando PDL1 em adultos (n=7) e crianças saudáveis (n=7). Em B, observa-se a expressão de PDL1 em monócitos clássicos, monócitos intermediários e monócitos não-clássicos de adultos (n=7) e crianças saudáveis (n=7). Os dados foram obtidos através de citometria de fluxo. A diferença foi significativa e determinada por teste *One-Way* ANOVA seguido pelo teste *post-hoc* de Tukey, considerando a diferença entre os tipos de monócitos dentro de cada grupo (adultos e crianças) e pelo teste T não-pareado ao se comparar os dois grupos populacionais quanto aos subtipos de monócitos. Foi considerado  $p < 0,05$ . (\*) representa diferença de monócitos intermediários em relação a monócitos clássicos, (#) revela diferença entre monócitos não-

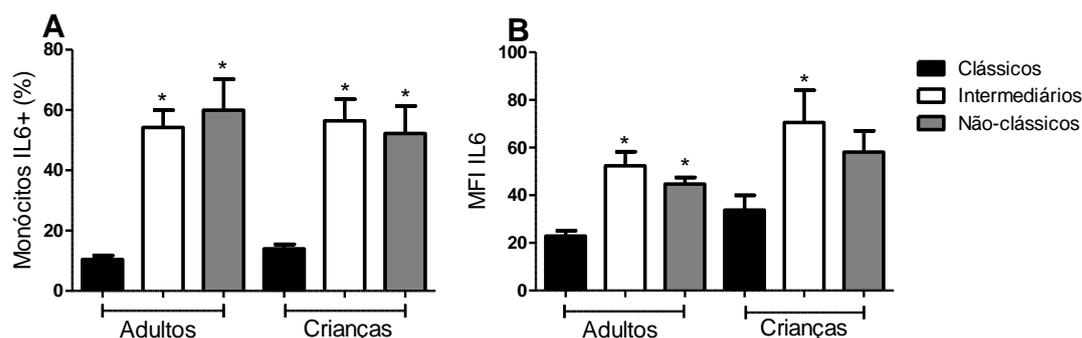
clássicos e monócitos intermediários. O traço acima das barras representa a diferença entre monócitos do mesmo subtipo em grupos distintos.

### 6.1.6 Monócitos intermediários e não-clássicos de adultos e crianças saudáveis apresentam maior atividade inflamatória que monócitos clássicos ao se avaliar a frequência e expressão de IL-6 e TNF- $\alpha$ .

Uma vez caracterizadas as moléculas de superfície, prosseguiu-se com a análise das citocinas produzidas por cada grupo de monócitos nos indivíduos adultos e nas crianças.

Na figura 11A, evidenciamos tanto no grupo de adultos como no de crianças saudáveis, maior percentual de monócitos intermediários e não-clássicos expressando IL6, citocina de caráter inflamatório. Não houve diferença entre a população adulta e a infantil. Considerando-se a média de intensidade de fluorescência (Figura 11B) dessa molécula, observa-se, na população adulta, maior expressão de IL6 em monócitos intermediários e não-clássicos, em relação a monócitos clássicos, enquanto no grupo de crianças, apenas monócitos intermediários apresenta-se com maior expressão em comparação a monócitos clássicos. Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos de adultos e crianças para MIF de IL6.

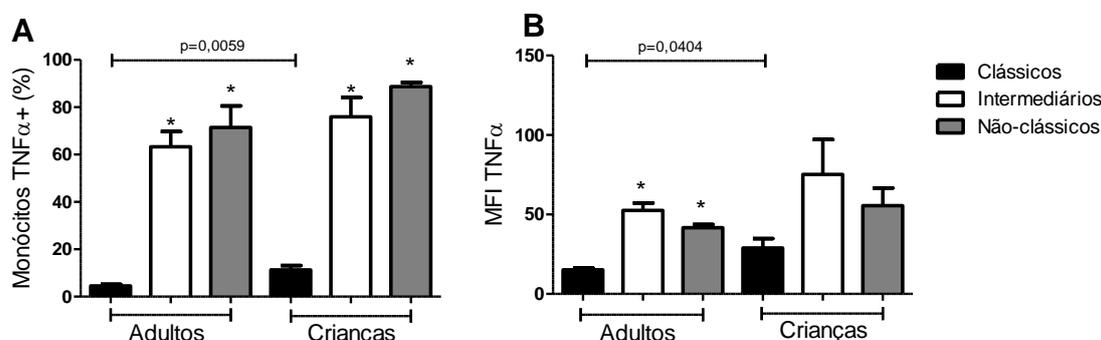
**Figura 11 - Análise comparativa da expressão de IL6 em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos em adultos e crianças saudáveis.**



Em A, percentual de monócitos clássicos (barra preta), intermediários (barra branca) e não-clássicos (barra cinza) expressando IL6 em adultos (n=7) e crianças saudáveis (n=7). No gráfico B, observamos a expressão de IL6 em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos de adultos (n=7) e crianças saudáveis (n=7). Os dados foram obtidos através de citometria de fluxo. A diferença foi significativa e determinada por teste *One-Way* ANOVA seguido pelo teste *post-hoc* de Tukey, considerando a diferença entre os tipos de monócitos dentro de cada grupo (adultos e crianças) e pelo teste T não-pareado ao se comparar os dois grupos populacionais quanto aos subtipos de monócitos. Foi considerado  $p < 0,05$ . (\*) representa diferença de monócitos intermediários e monócitos não-clássicos em relação a monócitos clássicos.

Prosseguindo com a investigação da atividade inflamatória dos subtipos de monócitos, estudamos a produção de  $\text{TNF}\alpha$  por essas células. Na figura 12A, identifica-se, tanto em adultos quanto em crianças saudáveis, quando comparado a monócitos clássicos, maior percentual de monócitos intermediários e não-clássicos expressando  $\text{TNF}\alpha$ . Observamos também, maior frequência de  $\text{TNF}\alpha$  em monócitos clássicos de crianças que em monócitos clássicos de adultos. Dando seguimento, temos, na Figura 12B, maior expressão de  $\text{TNF}\alpha$  em monócitos intermediários e não-clássicos que em monócitos clássicos na população adulta, mas não evidenciamos diferença desse parâmetro entre os subtipos de monócitos de crianças saudáveis. Ao fazermos a análise comparativa entre a população adulta e infantil quanto à MFI, identificamos maior expressão de  $\text{TNF}\alpha$  nos monócitos clássicos de crianças que nos monócitos clássicos de adultos.

**Figura 12 - Análise comparativa da expressão de  $\text{TNF}\alpha$  em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos em adultos e crianças saudáveis.**



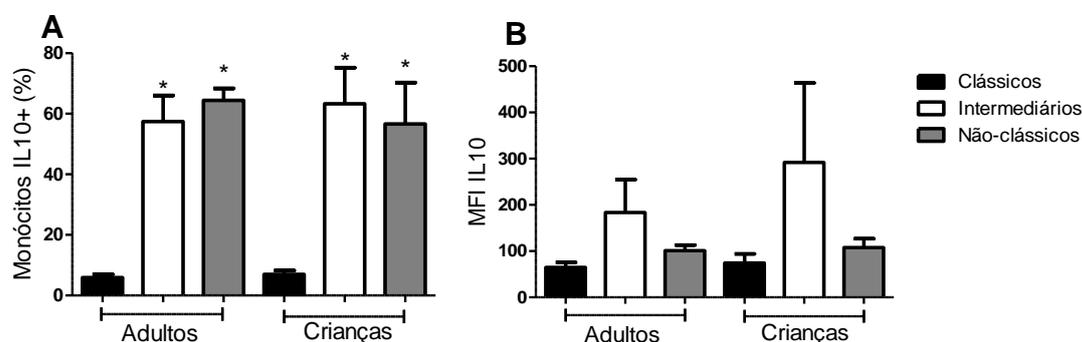
Na figura A, temos o percentual de monócitos clássicos (barra preta), intermediários (barra branca) e não-clássicos (barra cinza) expressando  $\text{TNF}\alpha$  em adultos (n=7) e crianças saudáveis (n=7). Em B, a expressão de

TNF $\alpha$  em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos de adultos (n=7) e crianças saudáveis (n=7). Os dados foram obtidos através de citometria de fluxo. A diferença foi significativa e determinada por teste *One-Way* ANOVA seguido pelo teste *post-hoc* de Tukey, considerando a diferença entre os tipos de monócitos dentro de cada grupo (adultos e crianças) e pelo teste T não-pareado ao se comparar os dois grupos populacionais quanto aos subtipos de monócitos. Foi considerado  $p < 0,05$ . (\*) representa diferença de monócitos intermediários e monócitos não-clássicos em relação a monócitos clássicos. O traço acima das barras representa a diferença entre monócitos do mesmo subtipo em grupos distintos.

### 6.1.7 Há maior percentual de monócitos intermediários e não-clássicos expressando IL-10 que monócitos clássicos.

Com o objetivo de investigar a função regulatória, de controle de resposta imune e de estímulo ao processo de reparação tecidual pelos monócitos, analisamos a produção de IL10 por essas células. Evidenciamos maior frequência monócitos intermediários e não-clássicos expressando IL-10, quando comparados a monócitos clássicos tanto no grupo de adultos quanto no grupo de crianças saudáveis (Figura 13A). Não houve diferença entre os dois grupos estudados. Em (B), avaliamos a expressão de IL10 e não foi observada diferença significativa entre os subtipos de monócitos dentro de cada grupo separadamente, assim como não observamos diferença ao comparar monócitos entre as populações adulta e infantil.

Figura 13 - Análise comparativa da expressão de IL10 em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos em adultos e crianças saudáveis.



O gráfico A representa o percentual de monócitos clássicos (barra preta), intermediários (barra branca) e não-clássicos (barra cinza) produtores de IL-10 nos grupos de adultos (n=7) e crianças saudáveis (n=7). No gráfico B, temos a expressão de IL10 em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos de adultos (n=7) e crianças saudáveis (n=7). Os dados foram obtidos através de citometria de fluxo. A diferença foi significativa e determinada por teste *One-Way* ANOVA seguido pelo teste *post-hoc* de Tukey, considerando a diferença entre os tipos de monócitos dentro de cada grupo (crianças) e pelo teste T não-pareado ao se comparar os dois

grupos populacionais quanto aos subtipos de monócitos. Foi considerado  $p < 0,05$ . (\*) representa diferença de monócitos intermediários e monócitos não-clássicos em relação a monócitos clássicos.

A tabela 3 representa o resumo dos resultados encontrados ao se avaliar a frequência e expressão das moléculas de superfície e citocinas nos grupos de adultos e crianças saudáveis.

Tabela 3 - Frequência e expressão de moléculas de superfície e citocinas em adultos e crianças saudáveis

	Adultos saudáveis						Crianças saudáveis					
	monócitos clássicos		monócitos intermediários		monócitos não-clássicos		monócitos clássicos		monócitos intermediários		monócitos não-clássicos	
% Monócitos	88,01 ± 2,83		2,8 ± 1,38		8,97 ± 2,23		83,74 ± 5,47		2,36 ± 1,18		13,52 ± 4,57	
MFI HLA-DR	319,29 ± 129,25		361,20 ± 192,5		222,24 ± 124,84		1017,18 ± 740,32		1031,52 ± 786,87		473,24 ± 491,54	
	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI
CCR5	3,15 ± 1,74	11,40 ± 1,91	79,30 ± 15,8	73,81 ± 24,62	68,44 ± 27,14	48,50 ± 5,89	4,91 ± 2,51	10,55 ± 7,06	58,16 ± 32,89	83,98 ± 68,55	90,24 ± 5,82	50,48 ± 23,29
CD80	3,3 ± 0,85	11,20 ± 1,59	70,26 ± 23,82	61,71 ± 13,38	66,14 ± 30,10	42,50 ± 2,71	7,55 ± 3,65	10,55 ± 6,60	56,46 ± 23,36	61,44 ± 22,74	65,98 ± 22,40	51,50 ± 20,48
CD86	80,64 ± 2,27	27,36 ± 2,86	81,84 ± 16,37	50,98 ± 24,78	69,91 ± 20,60	34,18 ± 11,04	69,31 ± 13,04	24,06 ± 4,31	85,28 ± 14,50	47,21 ± 13,75	68,17 ± 23,70	33,68 ± 7,25
PDL1	60,20 ± 30,36	46,04 ± 7,51	91,16 ± 15,16	147,00 ± 70,37	64,31 ± 20,56	84,90 ± 14,39	74,22 ± 8,09	57,47 ± 10,18	94,76 ± 5,41	223,07 ± 236,77	62,61 ± 15,79	71,68 ± 19,59
IL6	10,43 ± 3,62	22,91 ± 5,93	54,20 ± 15,23	52,36 ± 15,73	59,97 ± 27,09	44,68 ± 7,44	13,95 ± 3,91	33,76 ± 16,43	56,41 ± 18,98	70,53 ± 35,68	52,20 ± 24,18	58,11 ± 23,62
TNF $\alpha$	4,55 ± 1,85	15,21 ± 2,80	63,27 ± 16,94	52,50 ± 12,43	71,47 ± 24,01	41,66 ± 5,28	11,26 ± 4,98	28,96 ± 15,58	75,94 ± 21,32	75,17 ± 58,14	88,71 ± 4,57	55,56 ± 29,43
IL10	5,89 ± 2,90	64,97 ± 28,51	57,40 ± 22,79	183,48 ± 188,47	64,43 ± 10,35	100,86 ± 31,91	6,96 ± 3,29	74,44 ± 51,43	63,30 ± 31,62	292,03 ± 454,67	56,62 ± 36,21	107,86 ± 50,41

## **6.2 Análise do perfil monocitário de crianças saudáveis e crianças portadoras de dermatite atópica:**

Considerando que a dermatite atópica é uma doença inflamatória crônica, na qual estão envolvidos complexos mecanismos imunológicos. Nosso grupo investigou o perfil de monócitos envolvidos na etiopatogênese dessa doença. Para essa análise, realizamos estudo comparativo entre monócitos de crianças saudáveis e crianças portadoras de DA. Nossa amostra foi composta por 6 crianças, sendo 3 do sexo feminino e 3 do sexo masculino, com idade entre 1 e 8 anos, todas apresentavam antecedentes pessoais ou familiares de atopia, e as lesões cutâneas apresentavam características predominantemente subagudas. Todas as crianças, exceto uma, apresentavam complicações decorrentes da doença (Quadro 2). Apenas uma criança avaliada clinicamente, por meio da aplicação do SCORAD, apresentava DA grave e portanto não foi considerada para a análise dos dados de citometria. As demais, eram portadoras de DA moderada. Analisamos a expressão das mesmas moléculas de superfície e citocinas utilizadas na primeira fase do nosso estudo, onde foram comparados adultos e crianças saudáveis

**Quadro 2 - Características dos pacientes com DA**

Identificação	Sexo	Idade (anos)	Tempo de doença	Antecedentes pessoais de atopia	Antecedentes familiares de atopia	Complicações	Tipo de lesão
DA1	masculino	3	Menos de 6 meses	Sim	Sim	Distúrbios do sono	Crostras e liquenificação
DA2	feminino	2	Menos de 6 meses	Não	Sim	Não	Crostras e liquenificação
DA3	masculino	7	Entre 6 meses e 3 anos	Sim	Sim	Distúrbios do sono	Crostras e liquenificação
DA4	feminino	1	Entre 6 meses e 3 anos	Não	Sim	Distúrbios do sono	Liquenificação
DA5	feminino	8	Entre 3 e 6 anos	Sim	Sim	Ansiedade	Crostras
DA6	masculino	4	Entre 3 e 6 anos	Sim	Sim	Distúrbios psicológico, do sono e infecções recorrentes	Exudação e crostras

Comparando os dois grupos estudados, observamos que há mais indivíduos do sexo masculino no grupo de crianças saudáveis, ao se comparar com o grupo de crianças portadoras de DA e a média de idade dos indivíduos nos dois grupos foi em torno de 4 anos (Quadro 3).

**Quadro 3 - Características das crianças saudáveis e portadoras de DA**

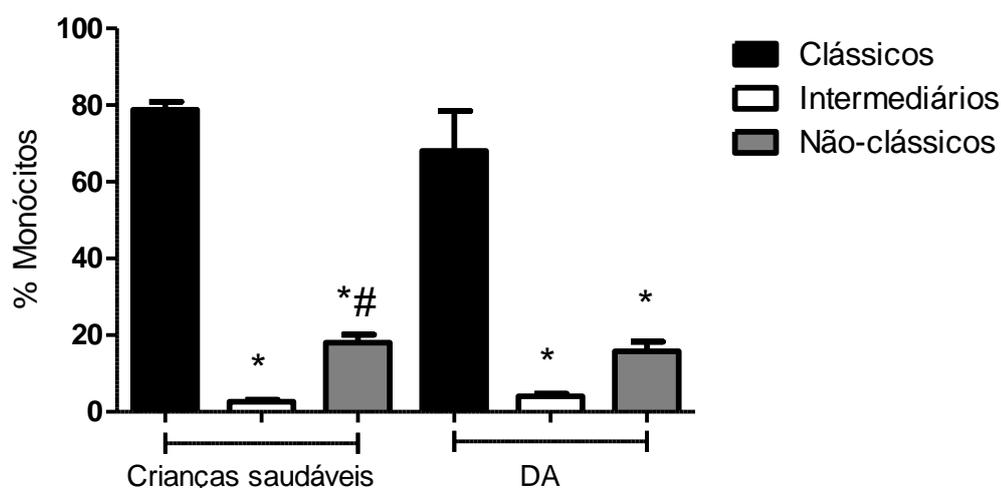
Indivíduo	Crianças saudáveis		Crianças atópicas	
	Sexo	Idade (anos)	Sexo	Idade (anos)
1	feminino	6	masculino	3
2	masculino	5	feminino	2
3	masculino	2	masculino	7
4	feminino	8	feminino	1
5	masculino	3	feminino	8
6	masculino	4	-	-
7	masculino	2	-	-

### **6.2.1 Crianças saudáveis e crianças portadoras de dermatite atópica, quando comparadas entre si, apresentam frequência dos subtipos de monócitos semelhante, com predomínio de monócitos clássicos**

Na figura 14 podemos observar a frequência de monócitos clássicos (barra preta), intermediários (barra branca) e não-clássicos (barra cinza) em crianças saudáveis e em crianças portadoras de DA. Verificamos, no grupo de crianças saudáveis, uma menor proporção de monócitos intermediários e não-clássicos em relação a monócitos clássicos, assim como maior frequência de monócitos não-clássicos, quando comparados a monócitos intermediários. Já no grupo de crianças com DA, temos menor frequência de monócitos intermediários e não-clássicos em

comparação a monócitos clássicos, porém não há diferença estatisticamente significativa quando se compara monócitos intermediários com não-clássicos. Ao compararmos entre os diferentes grupos não foram observadas diferenças entre os subtipos de monócitos.

**Figura 14 - Análise comparativa da frequência de monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos em crianças saudáveis e crianças portadoras de DA.**

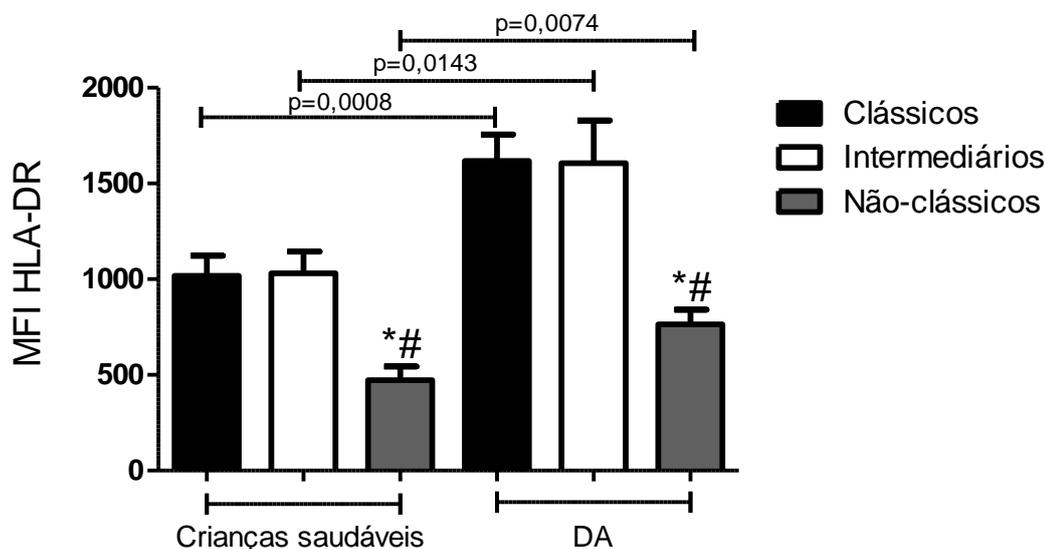


Frequência relativa de monócitos clássicos (barra preta), intermediários (barra branca) e não-clássicos (barra cinza) em crianças saudáveis (n=7) e crianças portadoras de dermatite atópica (n=5). Os dados foram obtidos através de citometria de fluxo. A diferença foi significativa e determinada por teste *One-Way* ANOVA seguido pelo teste *post-hoc* de Tukey, considerando a diferença entre os tipos de monócitos dentro de cada grupo (crianças saudáveis e doentes) e pelo teste T não-pareado ao se comparar os dois grupos populacionais quanto aos subtipos de monócitos. Foi considerado  $p < 0,05$ . (\*) representa diferença de monócitos intermediários e não-clássicos em relação a monócitos clássicos, (#) revela diferença entre monócitos não-clássicos e intermediários.

### **6.2.2 Crianças portadoras de DA apresentam diferença significativa de expressão de HLA-DR quando comparadas ao grupo controle.**

Avaliando a MFI de HLA-DR (Figura 15) em crianças sadias e crianças com DA, observamos que, nos dois grupos há menor expressão de HLA-DR nos monócitos não-clássicos em relação aos clássicos e intermediários. E, ao compararmos os grupos entre si, verificamos maior expressão de HLA-DR em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos de crianças portadoras de dermatite atópica que nos mesmos subtipos celulares de crianças sadias.

**Figura 15 - Análise comparativa da expressão do HLA-DR em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos em crianças saudáveis e crianças portadoras de DA.**



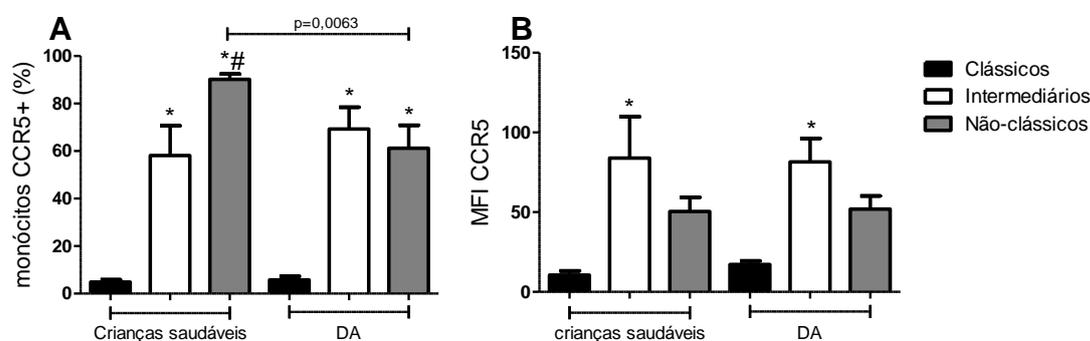
Expressão de HLA-DR em monócitos clássicos (barra preta), intermediários (barra branca) e não-clássicos (barra cinza) analisada nos grupos de crianças saudáveis ( $n=7$ ) e doentes ( $n=5$ ). Os dados foram obtidos através de citometria de fluxo. A diferença foi significativa e determinada por teste *One-Way* ANOVA seguido pelo teste *post-hoc* de Tukey, considerando a diferença entre os tipos de monócitos dentro de cada grupo (crianças saudáveis e doentes) e pelo teste T não-pareado ao se comparar os dois grupos populacionais quanto aos subtipos de monócitos. Foi considerado  $p<0,05$ . (\*) representa diferença entre monócitos não-clássicos e clássicos.

### **6.2.3 Crianças portadoras de DA apresentam menor percentual de monócitos não-clássicos CCR5 positivos, quando comparadas às crianças saudáveis**

Analisou-se a frequência (Figura 16A) de monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos CCR5+, e a expressão (Figura 16B) dessa molécula nos subtipos celulares de crianças saudáveis e crianças com DA. Observamos (Figura 16A), no grupo de crianças saudáveis menor frequência de monócitos clássicos expressando CCR5, quando comparado a intermediários e não-clássicos, e maior percentual de monócitos não-clássicos CCR5+, em relação aos monócitos intermediários. Ao passo que no grupo de crianças com DA identificamos menor proporção de monócitos clássicos expressando esta molécula, em relação a intermediários e não-clássicos. Mas não constatamos diferença significativa entre monócitos

intermediários e não-clássicos. Na análise comparativa da expressão (Figura 16B) tanto no grupo controle, quanto no grupo de crianças acometidas por DA, apenas evidenciamos maior expressão de CCR5 em monócitos intermediários em relação a monócitos clássicos. Não houve diferença na frequência de expressão dessa molécula entre o grupo sadio e o grupo doente.

**Figura 16 - Análise comparativa da expressão de CCR5 em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos em crianças saudáveis e crianças portadoras de DA.**



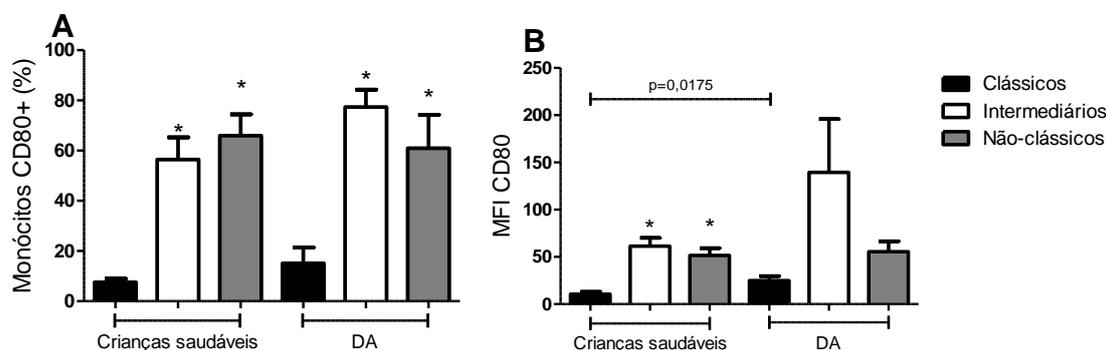
No gráfico A, observamos a frequência de monócitos clássicos (barra preta), intermediários (barra branca) e não-clássicos (barra cinza) CCR5 positivos nos grupos de crianças saudáveis (n=7) e crianças com DA (n=5). Em B, observa-se a expressão de CCR5 em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos em crianças saudáveis (n=7) e doentes (n=5). Os dados foram obtidos através de citometria de fluxo. A diferença foi significativa e determinada por teste *One-Way* ANOVA seguido pelo teste *post-hoc* de Tukey, considerando a diferença entre os tipos de monócitos dentro de cada grupo (crianças saudáveis e doentes) e pelo teste T não-pareado ao se comparar os dois grupos populacionais quanto aos subtipos de monócitos. Foi considerado  $p < 0,05$ . (\*) representa diferença de monócitos intermediários e não-clássicos em relação a monócitos clássicos, (#) revela diferença entre monócitos não-clássicos e intermediários. O traço acima das barras representa a diferença entre monócitos do mesmo subtipo em grupos distintos.

#### **6.2.4 A expressão das moléculas de CD80 e CD86 em monócitos clássicos de crianças portadoras de DA foi significativamente maior que no grupo de crianças saudáveis**

Ao caracterizar a frequência da molécula coestimulatória CD80 (Figura 17A) no grupo de crianças saudáveis e doentes encontramos maior proporção de monócitos intermediários e não-clássicos expressando CD80, que monócitos clássicos em ambos os grupos. Não detectamos diferença na porcentagem

monócitos CD80+ entre as populações de crianças saudáveis e portadoras de DA. Na figura 17B, temos maior expressão de CD80 em monócitos intermediários e não-clássicos, comparativamente a monócitos clássicos no grupo controle. Há maior expressão de CD80 em monócitos clássicos de crianças com DA que na mesma população celular em crianças saudáveis.

**Figura 17 - Análise comparativa da expressão de CD80 em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos em crianças saudáveis e crianças portadoras de DA.**

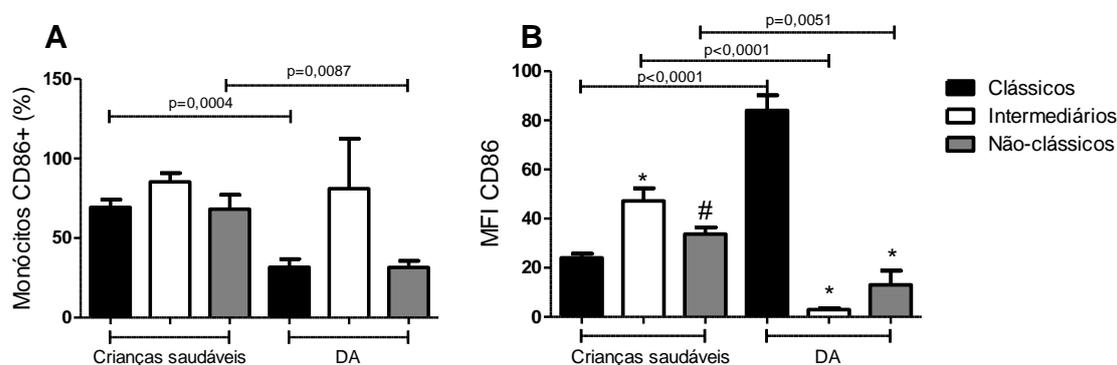


Em A, frequência de monócitos clássicos (barra preta), intermediários (barra branca) e não-clássicos (barra cinza) CD80 positivos nos grupos de crianças saudáveis (n=7) e crianças com DA (n=5). O gráfico B representa a expressão de CD80 em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos de crianças saudáveis (n=7) e crianças doentes (n=5). Os dados foram obtidos através de citometria de fluxo. A diferença foi significativa e determinada por teste *One-Way* ANOVA seguido pelo teste *post-hoc* de Tukey, considerando a diferença entre os tipos de monócitos dentro de cada grupo (crianças saudáveis e doentes) e pelo teste T não-pareado ao se comparar os dois grupos quanto aos subtipos de monócitos. Foi considerado  $p < 0,05$ . (\*) representa diferença de monócitos intermediários e não-clássicos em relação a monócitos clássicos. O traço acima das barras representa a diferença entre monócitos do mesmo subtipo em grupos distintos.

Na figura 18A, não observa-se diferença entre os monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos quanto à porcentagem de células CD86 + dentro de cada grupo separadamente (controle e crianças com DA). Entretanto, notamos maior frequência de monócitos clássicos e não-clássicos de crianças saudáveis expressando CD86 que de crianças doentes, ao compararmos os dois grupos. Avaliando a MFI (B), percebemos maior expressão de CD86 em monócitos intermediários em relação a monócitos clássicos e não-clássicos no grupo de crianças saudáveis. Já na população de crianças portadoras de DA, temos menor expressão de CD86 em

monócitos intermediários e não-clássicos em comparação a monócitos clássicos. Encontramos, ao realizar análise comparativa entre o grupo sadio e o grupo de doentes, maior expressão de CD86 em monócitos clássicos de crianças com DA do que em crianças saudáveis, e menor expressão em monócitos intermediários e não-clássicos de crianças doentes do que no grupo saudável.

**Figura 18 - Análise comparativa da expressão de CD86 em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos de crianças saudáveis e crianças portadoras de DA.**



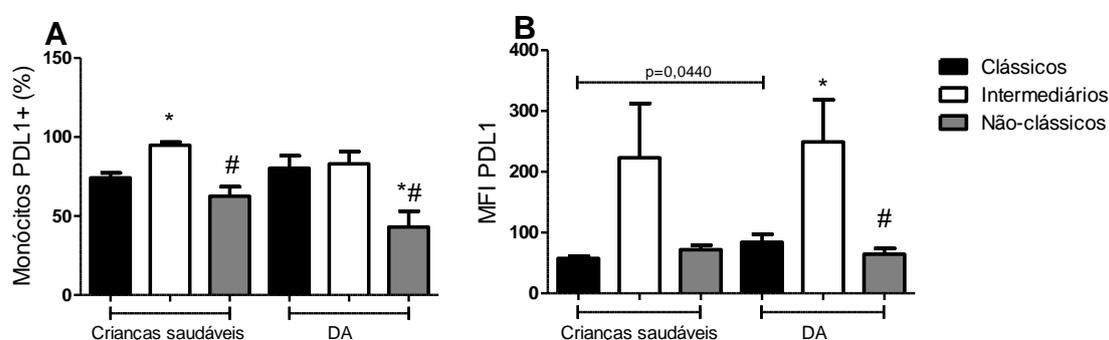
No gráfico A está representada a frequência de monócitos clássicos (barra preta), intermediários (barra branca) e não-clássicos (barra cinza) CD86 positivos nos grupos de crianças saudáveis (n=7) e crianças portadoras de DA (n=5). Em B, a expressão de CD86 em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos de crianças saudáveis (n=7) e crianças atópicas (n=5). Os dados foram obtidos através de citometria de fluxo e análise pelo Flowjo. A diferença foi significativa e determinada por teste *One-Way* ANOVA seguido pelo teste *post-hoc* de Tukey, considerando a diferença entre os tipos de monócitos dentro de cada grupo (crianças saudáveis e doentes) e pelo teste T não-pareado ao se comparar os dois grupos populacionais quanto aos subtipos de monócitos. Foi considerado  $p < 0,05$ . (\*) representa diferença de monócitos intermediários e não-clássicos em relação a monócitos clássicos, (#) revela diferença entre monócitos não-clássicos e intermediários. O traço acima das barras representa a diferença entre monócitos do mesmo subtipo em grupos distintos

### 6.2.5 Há maior porcentagem de monócitos clássicos expressando PDL1 em crianças atópicas que no grupo de crianças saudáveis

Ao avaliarmos a frequência de PDL1 (Figura 19A), nossos dados demonstraram maior proporção de monócitos intermediários do que clássicos e não-clássicos expressando esta molécula no grupo de crianças saudáveis, enquanto no grupo de crianças atópicas, observa-se mais monócitos clássicos e intermediários PDL1 positivos, em relação aos não-clássicos. Não houve diferença após análise comparativa entre os grupos de doentes e sadios. Na figura 19B, não se evidencia

diferença de expressão de PDL1 entre os subtipos de monócitos, quando se avalia o grupo de crianças saudáveis, entretanto, no grupo de crianças portadoras de DA há aumento de expressão de PDL1 em monócitos intermediários, quando relacionado a monócitos clássicos e não-clássicos. Ao compararmos crianças saudáveis e crianças portadoras de DA, percebemos maior expressão de PDL1 em monócitos clássicos de crianças atópicas.

**Figura 19 - Análise comparativa da expressão de PD1L em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos em crianças saudáveis e crianças portadoras de DA.**



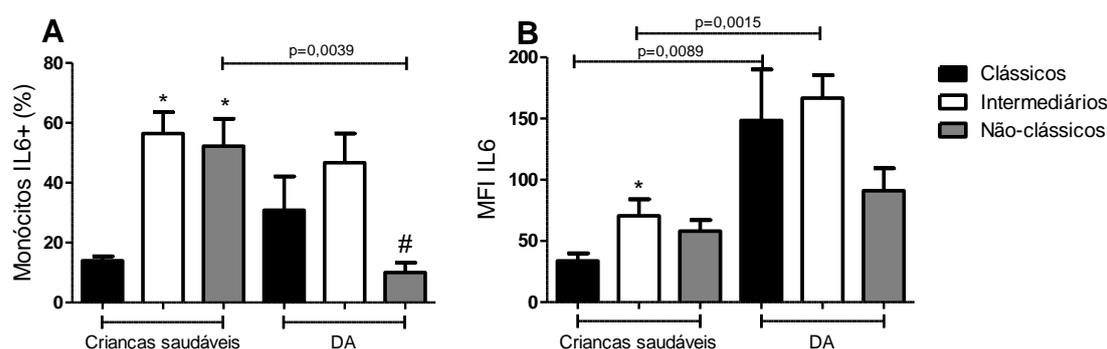
O gráfico A representa a frequência de monócitos clássicos (barra preta), intermediários (barra branca) e não-clássicos (barra cinza) PDL1 positivos no grupo de crianças saudáveis ( $n=7$ ) e crianças com DA ( $n=5$ ). Em B, temos a expressão de PD1L em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos de crianças saudáveis ( $n=7$ ) e atópicas ( $n=5$ ). Os dados foram obtidos através de citometria de fluxo. A diferença foi significativa e determinada por teste *One-Way* ANOVA seguido pelo teste *post-hoc* de Tukey, considerando a diferença entre os tipos de monócitos dentro de cada grupo (crianças saudáveis e doentes) e pelo teste T não-pareado ao se comparar os dois grupos populacionais quanto aos subtipos de monócitos. Foi considerado  $p<0,05$ . (\*) representa diferença de monócitos intermediários e não-clássicos em relação a monócitos clássicos, (#) revela diferença entre monócitos não-clássicos e intermediários. O traço acima das barras representa a diferença entre monócitos do mesmo subtipo em grupos distintos.

### 6.2.6 Monócitos clássicos e intermediários de crianças portadoras de DA apresentam maior atividade inflamatória que os mesmos monócitos de crianças saudáveis ao se avaliar a expressão de IL-6 e TNF- $\alpha$ .

Na figura 20A, no grupo controle observou-se maior porcentagem de monócitos intermediários e não-clássicos expressando IL-6, em relação aos clássicos. Já no grupo de crianças portadoras de DA, ocorreu menor porcentagem de monócitos não-clássicos expressando IL-6, quando comparado a intermediários, mas não mas não em relação aos clássicos e nem entre intermediários e clássicos.

Analisando as diferenças entre os dois grupos (crianças saudáveis e doentes), detectou-se menos monócitos não-clássicos expressando a citocina no grupo de crianças atópicas, não sendo identificadas outras diferenças estatisticamente significantes. Na figura 20B, notamos, no grupo de crianças sadias, maior expressão de IL6 em monócitos intermediários em relação a clássicos, e nenhuma diferença de expressão entre os subgrupos de monócitos na população de crianças doentes. Houve maior expressão de IL6 em monócitos clássicos e intermediários no grupo de portadores de DA, quando comparados ao grupo de crianças saudáveis.

**Figura 20 - Análise comparativa da expressão de IL6 em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos em crianças saudáveis e crianças portadoras de DA.**

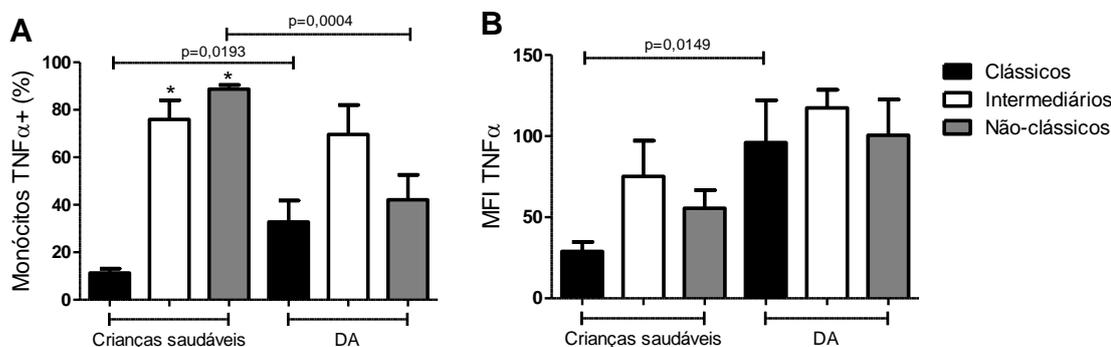


Em A, a frequência de monócitos clássicos (barra preta), intermediários (barra branca) e não-clássicos (barra cinza) IL-6 positivos em crianças saudáveis (n=7) e crianças portadoras de DA (n=5). O gráfico B mostra a expressão de IL6 em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos de crianças saudáveis (n=7) e atópicas (n=5). Os dados foram obtidos através de citometria de fluxo. A diferença foi significativa e determinada por teste *One-Way ANOVA* seguido pelo teste *post-hoc* de Tukey, considerando a diferença entre os tipos de monócitos dentro de cada grupo (crianças saudáveis e doentes) e pelo teste T não-pareado ao se comparar os dois grupos populacionais quanto aos subtipos de monócitos. Foi considerado  $p < 0,05$ . (\*) representa diferença de monócitos intermediários e não-clássicos em relação a monócitos clássicos, (#) revela diferença entre monócitos não-clássicos e intermediários. O traço acima das barras representa a diferença entre monócitos do mesmo subtipo em grupos distintos.

Na figura 21A, evidenciamos no grupo controle, maior frequência de monócitos intermediários e não-clássicos expressando  $TNF\alpha$  em comparação a monócitos clássicos. Não houve diferença entre os monócitos do grupo de crianças doentes. Comparando os dois grupos, observamos maior porcentagem de monócitos clássicos de crianças portadoras de DA produzindo  $TNF\alpha$  que monócitos

clássicos de crianças saudáveis, e menor porcentagem de monócitos não-clássicos de crianças doentes produzindo a citocina em relação ao grupo saudável. Considerando-se a MFI (Figura 21B) dessa citocina, não detectamos diferença entre os grupos de monócitos comparados dentro de cada população isoladamente (crianças sadias e crianças doentes). Na análise comparativa entre esses dois grupos observa-se maior expressão de TNF $\alpha$  em monócitos clássicos de doentes do que em monócitos clássicos de crianças saudáveis.

**Figura 21 - Análise comparativa da expressão de TNF $\alpha$  em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos em crianças saudáveis e crianças portadoras de DA.**



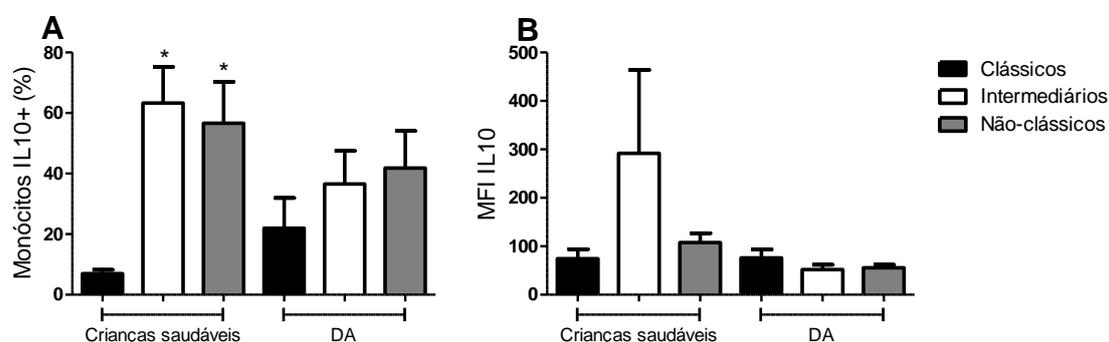
Frequência de monócitos clássicos (barra preta), intermediários (barra branca) e não-clássicos (barra cinza) expressando TNF $\alpha$  em crianças saudáveis (n=7) e crianças com DA (n=5) representada em A. No gráfico B, temos a expressão de TNF $\alpha$  em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos de crianças saudáveis (n=7) e atópicas (n=5). Os dados foram obtidos através de citometria de fluxo. A diferença foi significativa e determinada por teste *One-Way* ANOVA seguido pelo teste *post-hoc* de Tukey, considerando a diferença entre os tipos de monócitos dentro de cada grupo (crianças sadias e doentes) e pelo teste T não-pareado ao se comparar os dois grupos populacionais quanto aos subtipos de monócitos. Foi considerado  $p < 0,05$ . (\*) representa diferença de monócitos intermediários e não-clássicos em relação a monócitos clássicos. O traço acima das barras representa a diferença entre monócitos do mesmo subtipo em grupos distintos.

### 6.2.7 Crianças portadoras de DA não apresentam diferença de expressão de IL-10 entre os subtipos de monócitos

Por fim, analisamos a produção de IL10 por essas células. Evidenciamos na figura 22A maior porcentagem de monócitos intermediários e não-clássicos expressando IL-10, quando comparados a monócitos clássicos no grupo controle, mas não observamos diferença na população de crianças portadoras de DA. Não

houve diferença entre os dois grupos estudados (crianças saudáveis e doentes). Em (B), avaliamos a média de intensidade de fluorescência de IL10 e não foi observada diferença significativa entre os subtipos de monócitos dentro de cada grupo separadamente, nem ao se comparar monócitos entre a população sadia e doente.

**Figura 22 - Análise comparativa da expressão de IL10 em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos em crianças saudáveis e crianças portadoras de DA.**



No gráfico A, temos a frequência de monócitos clássicos (barra preta), intermediários (barra branca) e não-clássicos (barra cinza) expressando IL10 em crianças saudáveis (n=7) e em crianças portadoras de DA (n=5). Em B, observa-se a expressão de IL10 em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos de crianças saudáveis (n=7) e doentes (n=5). Os dados foram obtidos através de citometria de fluxo. A diferença foi significativa e determinada por teste *One-Way* ANOVA Tukey, considerando a diferença entre os tipos de monócitos dentro de cada grupo (crianças saudáveis e doentes) e pelo teste T não-pareado ao se comparar os dois grupos populacionais quanto aos subtipos de monócitos. Foi considerado  $p < 0,05$ . (\*) representa diferença de monócitos intermediários e não-clássicos em relação a monócitos clássicos. O traço acima das barras representa a diferença entre monócitos do mesmo subtipo em grupos distintos.

A tabela 4 representa o resumo dos resultados encontrados ao se avaliar a expressão das moléculas de superfície e citocinas nos grupos de crianças saudáveis e crianças portadoras de dermatite atópica.

Tabela 4 - Expressão de moléculas de superfície e citocinas em crianças saudáveis e crianças portadoras de DA

	Crianças saudáveis						Crianças com DA					
	monócitos clássicos		monócitos intermediários		monócitos não-clássicos		monócitos clássicos		monócitos intermediários		monócitos não-clássicos	
% Monócitos	83,74 ± 5,47		2,36 ± 1,18		13,52 ± 4,57		68,01 ± 27,58		4,01 ± 1,79		15,78 ± 6,75	
MFI HLA-DR	1017,18 ± 740,32		1031,52 ± 786,87		473,24 ± 491,54		1616,74 ± 824,86		1606,4 ± 1313,69		763,48 ± 457	
	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI
CCR5	4,91 ± 2,51	10,55 ± 7,06	58,16 ± 32,89	83,98 ± 68,55	90,24 ± 5,82	50,48 ± 23,29	5,79 ± 3,38	17,14 ± 5,16	69,28 ± 20,48	81,52 ± 33,14	61,18 ± 21,65	39,8 ± 18,35
CD80	7,55 ± 3,65	10,55 ± 6,60	56,46 ± 23,36	61,44 ± 22,74	65,98 ± 22,40	51,5 ± 20,48	15,13 ± 13,92	24,88 ± 10,95	77,4 ± 15,42	139,5 ± 126,17	60,92 ± 29,80	55,56 ± 24,56
CD86	69,31 ± 13,04	24,06 ± 4,31	85,28 ± 14,50	47,21 ± 13,75	68,17 ± 23,70	33,68 ± 7,25	31,66 ± 11,43	84,00 ± 13,80	81,00 ± 70,26	2,95 ± 1,25	31,56 ± 9,11	13,06 ± 12,80
PDL1	74,22 ± 8,09	57,47 ± 10,18	94,76 ± 5,41	223,07 ± 236,77	62,61 ± 15,79	71,68 ± 19,59	80,36 ± 17,47	84,2 ± 28,75	83,12 ± 17,12	249,3 ± 154,61	43,08 ± 22,32	64,62 ± 20,53
IL6	13,95 ± 3,91	33,76 ± 16,43	56,41 ± 18,98	70,53 ± 35,68	52,2 ± 24,18	58,11 ± 23,62	30,86 ± 25,09	148,38 ± 93,40	46,71 ± 21,76	166,82 ± 41,55	10,06 ± 7,30	91,04 ± 41,23
TNF $\alpha$	11,26 ± 4,98	28,96 ± 15,58	75,94 ± 21,32	75,17 ± 58,14	88,71 ± 4,57	55,56 ± 29,43	32,82 ± 20,00	96,00 ± 58,60	69,6 ± 27,76	117,44 ± 24,86	42,12 ± 23,43	100,56 ± 49,17
IL10	6,96 ± 3,29	74,44 ± 51,43	63,3 ± 31,62	292,03 ± 454,67	56,62 ± 36,21	107,86 ± 50,41	20,31 ± 27,12	87,68 ± 36,06	28,88 ± 21,30	56,36 ± 23,89	39,33 ± 32,79	59,24 ± 14,67

## 7 Discussão

São conhecidas diferenças relevantes entre a resposta imune do adulto e da criança, tanto em condições fisiológicas (SIMON, HOLLANDER e McMICHAEL, 2015), quanto em doenças virais e respostas a vacinas (RITZ et al., 2012; MUENCHHOFF, PRENDERGAST e GOULDER, 2014). Considerando o papel fundamental dos monócitos no desenvolvimento da resposta imune inata e adquirida, a caracterização funcional e fenotípica dos subtipos dessas células em adultos e crianças saudáveis é fundamental para um melhor entendimento de processos fisiopatológicos em diversas enfermidades. Nosso trabalho permitiu a análise não apenas da frequência relativa dessas células, mas também do seu grau de ativação em adultos e crianças saudáveis, e comparação, inédita na literatura, deste perfil entre crianças saudáveis e crianças portadoras de dermatite atópica.

Nossos resultados corroboram dados da literatura, nos quais é estabelecido que monócitos clássicos contribuem com cerca de 80% a 90% do total de monócitos circulantes, enquanto os demais subtipos compõem os 10% a 20% restantes (ABELES et al., 2012; MUKHERJEE et al., 2015). Comparando os subtipos de monócitos entre os grupos de adultos e crianças saudáveis, foi identificada maior frequência de monócitos não-clássicos em crianças que em adultos saudáveis. Considerando as funções de "patrulhamento", resposta a infecções virais e produção de citocinas inflamatórias deste subtipo de monócitos (ABELES et al., 2012; ITALIANI e BORASCHI, 2014; MUKHERJEE et al., 2015), a maior população de monócitos não-clássicos em crianças sadias pode estar associada à maior ativação imunológica observada nessa faixa etária quando comparadas aos adultos saudáveis (SIMON, HOLLANDER e McMICHAEL, 2015).

Ao analisarmos a média de intensidade de fluorescência de HLA-DR, observamos expressão significativamente aumentada dessa molécula em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos de crianças saudáveis, quando comparadas à população adulta. É provável que esse dado seja uma evidência do estado de ativação imunológica inerente à criança nos primeiros anos de vida (SIMON, HOLLANDER e McMICHAEL, 2015), quando ocorre geração de repertório imunológico, ou seja, à medida que a criança é exposta aos antígenos ambientais, são gerados linfócitos T de memória específicos para cada novo antígeno apresentado (McDADE, 2003). Além disso, pudemos observar maior expressão desta molécula em monócitos clássicos e intermediários em adultos e crianças saudáveis em relação aos monócitos não-clássicos, evidenciando a participação destes subtipos celulares no processo de apresentação antigênica (ABELES et al., 2012; FLEMING e MOSSER, 2011; MUKHERJEE et al., 2015). A molécula de MHC de classe II HLA-DR está expressa em todos os monócitos e está relacionada a sua função de apresentação de antígenos às células T CD4+. Há relatos na literatura de diminuição da expressão de HLA-DR nos monócitos em condições de inflamação ou trauma graves (KIM et al., 2010; VESTER et al., 2015).

No nosso estudo, a análise do receptor de quimiocina CCR5 evidenciou maior porcentagem de monócitos intermediários e não-clássicos CCR5+, quando comparados a monócitos clássicos, tanto em adultos quanto em crianças saudáveis. Entretanto, no grupo de adultos, não houve diferença percentual entre os monócitos intermediários e não-clássicos CCR5+, há apenas maior expressão desta molécula em monócitos intermediários, em relação a monócitos clássicos e monócitos não-clássicos. A maior expressão da molécula de CCR5 em monócitos intermediários é descrita na literatura, permitindo seu uso como marcador adicional na caracterização

fenotípica deste subtipo de monócito (WONG et al., 2011; ABELES et al., 2012). Na população de crianças saudáveis, notamos maior porcentagem de monócitos não-clássicos CCR5+, que nos demais subtipos. Apesar de maior número de monócitos não-clássicos CCR5 +, essa molécula permanece como um bom marcador adicional para monócitos intermediários, uma vez que sua expressão permanece mais alta nesse subtipo em comparação com os outros, pela análise da MFI. (ABELES et al., 2012).

Avaliando a expressão das moléculas de superfície coestimulatórias CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2), observamos que há maior porcentagem de monócitos intermediários e não-clássicos CD80+ que monócitos clássicos, enquanto monócitos intermediários apresentam maior expressão de CD86 que monócitos clássicos em adultos e que monócitos clássicos e não-clássicos em crianças. Esse dado está de acordo com dados recentes da literatura (MUKHERJEE et al., 2015) em estudo que utiliza sangue total na metodologia da citometria de fluxo para analisar sepse e lupus eritematoso sistêmico. Todavia, estudos anteriores, consideram os monócitos intermediários e monócitos não-clássicos como essencialmente envolvidos na imunorregulação, reparação tecidual e progressão tumoral. (DERLINDATI et al., 2015). Utilizamos na nossa metodologia sangue total, mimetizando as condições fisiológicas, e acreditamos que essas discrepâncias ocorrem em decorrência do processo de purificação das células mononucleares fagocitárias, utilizado em outros trabalhos, uma vez que durante o processo de purificação dos monócitos com Ficol (CMSP) ocorrem alterações nas moléculas de superfície CD16, CD80, CD86, modificando o estado de ativação dos subtipos de monócitos e levando a interpretações equivocadas, possibilidade sugerida por outros investigadores (MUKHERJEE et al., 2015). Além disso, há maior porcentagem de monócitos

clássicos de crianças saudáveis expressando CD80 e menor porcentagem CD86+, que monócitos clássicos de adultos. Apesar de ambas as moléculas apresentarem efeito estimulatório ou inibitório, o CD86 tem, primordialmente, atividade estimulatória, ao passo que o CD80 apresenta, principalmente efeito inibitório (SAID et al., 2016). Nossos achados evidenciam maior participação de monócitos intermediários e não-clássicos na co-estimulação em indivíduos saudáveis e podemos sugerir maior envolvimento da molécula de CD80 neste processo. Entretanto, estudos mais aprofundados na área se fazem necessários para melhor compreensão a cerca do papel desse receptor em diferentes faixas etárias, uma vez que há diminuição de percentual de monócitos clássicos CD86+ e aumento de monócitos clássicos CD80+ em crianças saudáveis em relação aos adultos.

Verificamos, no nosso estudo, que crianças saudáveis apresentam maior porcentagem de monócitos intermediários PDL1+ que não-clássicos e clássicos, mas quando se avalia a expressão, essa mesma diferença só é significativa para o grupo de adultos saudáveis, indicando que apesar da frequência de monócitos expressando PD1L nesse grupo não ser relevante, há uma maior expressão dessa molécula nos monócitos intermediários que em monócitos clássicos e não-clássicos na população adulta. Nossos dados sugerem a participação importante de monócitos intermediários no processo de imunorregulação em pessoas saudáveis, uma vez que o PD1L, é uma proteína transmembrana, com função regulatória no processo inflamatório, que exerce suas funções através de co-estimulação negativa das células T, com inibição de produção de citocinas e facilitação de apoptose de células T ativadas (TAMAI et al., 2014). Também identificamos maior expressão desta molécula em monócitos clássicos de crianças que nos adultos saudáveis,

identificando assim, maior atividade imunorregulatória através deste subtipo celular em crianças.

Analisando a produção de IL-6 e TNF- $\alpha$ , citocinas pró-inflamatórias em adultos e crianças saudáveis, constatamos maior porcentagem de monócitos intermediários e não-clássicos produtores de ambas quando comparados a monócitos clássicos. Avaliando a MFI, percebemos que os adultos apresentam maior expressão de IL-6 e TNF- $\alpha$  em monócitos intermediários e não clássicos, enquanto nas crianças há apenas maior expressão de IL-6 em monócitos intermediários. MUKHERJEE e colaboradores descrevem resultados semelhantes, nos quais monócitos não-clássicos aparecem como produtores primários de TNF- $\alpha$  e IL1 $\beta$ , exibindo perfil "inflamatório". Observamos ainda, maior atividade inflamatória no grupo de crianças saudáveis quando se compara a expressão de TNF- $\alpha$ , em que há maior porcentagem de monócitos clássicos produtores de TNF- $\alpha$  , assim como maior expressão dessa citocina nos monócitos clássicos de crianças que nos adultos saudáveis.

Analizando o perfil de expressão de IL-10, identificamos maior frequência de monócitos intermediários e não-clássicos de adultos e crianças produtores de IL-10, mas não maior expressão de IL-10 nestas células. Esses dados reforçam achados na literatura que caracterizam monócitos intermediários como os principais produtores de IL-10, porém, vão de encontro a achados prévios, nos quais os monócitos não-clássicos aparecem com perfil predominantemente inflamatório. Apesar de estar descrito na literatura que monócitos intermediários apresentam função inflamatória (ITALIANI e BORASCHI, 2014), nossos achados caracterizam esses últimos em uma posição transicional ora com atividade inflamatória, ora imunorreguladora, reforçando achados de outros autores (ABELES et al., 2012;

MUKHERJEE et al., 2015). A IL-10 é uma citocina que apresenta papel central na imunorregulação e limitação da resposta inflamatória. Sua função decorre da inibição de citocinas inflamatórias (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ ), controle da liberação de espécies reativas de oxigênio, regulação da capacidade de apresentação de antígenos e imunotolerância e supressão da proliferação e atividade de células T citotóxicas (XIE *et al.*, 2014), daí a necessidade de caracterização de sua atividade em indivíduos saudáveis. Percebemos nestes indivíduos que os mesmos subtipos celulares envolvidos na produção de citocinas inflamatórias, são produtores de IL-10, fato importante na manutenção da homeostase.

Conhecendo o perfil monocitário de crianças saudáveis e suas particularidades em relação aos adultos, nosso grupo deu seguimento ao estudo, pioneiro na área, comparando monócitos de crianças saudáveis e crianças portadoras de dermatite atópica, com o intuito de identificar características e disfunções nessas células que pudessem contribuir com o processo patogênico da DA.

Ao avaliarmos a frequência de monócitos em crianças saudáveis e doentes, não observamos diferença significativa entre os dois grupos. Apenas percebemos que enquanto no grupo de crianças saudáveis há menor frequência de monócitos intermediários e monócitos não-clássicos, em relação a monócitos clássicos e maior frequência de monócitos não-clássicos quando comparado a monócitos intermediários, no grupo de crianças com DA, não há diferença entre monócitos intermediários e monócitos não-clássicos e ambos apresentam-se em menor proporção em comparação a monócitos clássicos. Portanto, ainda que haja atividade exacerbada de monócitos/macrófagos envolvidos na patogênese da doença, considerando que é conhecido acúmulo de macrófagos na pele de doentes tanto na fase aguda como na crônica (KASRAIE e WERFEL, 2013), não parece ocorrer

aumento na frequência relativa dessas células na circulação. Dados publicados anteriormente, em relação à proporção das subpopulações de monócitos em adultos atópicos, descrevem aumento de monócitos não-clássicos em pacientes doentes quando comparados ao grupo controle (ZHENG e MROWIETZ, 1997; NOVAK *et al*, 2002). Provavelmente, não observamos o mesmo no nosso trabalho pelo fato de crianças saudáveis já apresentarem um aumento dessa população celular ao se comparar a adultos saudáveis, conforme evidenciamos.

Na análise da MFI de HLA-DR nos monócitos constatamos maior expressão desta molécula em monócitos clássicos e intermediários em crianças saudáveis e em crianças atópicas em relação aos monócitos não-clássicos. Além disso, crianças com DA apresentam expressão aumentada dessa molécula em monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos em relação às crianças saudáveis. Considerando as alterações de barreira epidérmica existentes na dermatite atópica, com maior penetração de antígenos e necessidade de apresentação destes aos linfócitos T pelas APC (GITTLER *et al.*, 2012; KASRAIE e WERFEL, 2013 SILVERBERG, N. e SILVERBERG, J., 2015), compreende-se a expressão aumentada de moléculas de HLA-DR nos monócitos de crianças atópicas em comparação às crianças sadias. Fato curioso é que estudo anterior em adultos atópicos descreve redução da expressão da molécula de HLA-DR nos monócitos, na fase de exacerbação da doença (ZHENG e MROWIETZ, 1997). Acreditamos que este dado está diretamente relacionado à gravidade dos pacientes avaliados, uma vez que a nossa amostra é composta apenas de pacientes com dermatite atópica moderada, e à faixa etária estudada, visto que, conforme constatamos ao compararmos adultos e crianças saudáveis, a população infantil apresenta expressão significativamente aumentada desta molécula.

Na análise comparativa da frequência de CCR5 em monócitos, notamos maior porcentagem de monócitos intermediários e não-clássicos expressando essa molécula nos dois grupos. Observa-se ainda maior expressão de CCR5 em monócitos intermediários que em monócitos clássicos e não clássicos, conforme descrito na literatura (ABELES *et al.*, 2012). Estudos com modelos animais e humanos caracterizaram variações na expressão do gene de CCR5 em diversas enfermidades, tais como doenças auto-imunes, rejeição de enxertos, infecções bacterianas e virais, doenças alérgicas, neoplasias e doenças vasculares. Em algumas situações, há amplificação e em outras, inibição do gene do CCR5, com implicações fisiopatológicas diversas na dependência do modelo estudado. (GERARD e ROLLINS, 2001; MACK *et al.*, 2001; RAMAN, SOBOLIK-DELMARE e RICHMOND, 2011). Em nosso trabalho, verificamos padrão semelhante de expressão de CCR5 em monócitos de crianças saudáveis e crianças portadoras de dermatite atópica. Entretanto há uma redução na população de monócitos não-clássicos CCR5+ na população atópica quando comparados ao mesmo subtipo celular de crianças sadias. Essa redução do *pool* de monócitos não-clássicos CCR5+ na circulação pode indicar, maior recrutamento destes para os tecidos.

Como sabemos, CD80 e CD86 são moléculas coestimulatórias importantes na geração de resposta imune adaptativa. É importante ressaltar que essas moléculas apresentam papéis distintos no processo de ativação de linfócitos T *helper*. Enquanto a expressão de CD80 em células apresentadoras de antígenos normalmente elicitava uma resposta Th1, a presença da molécula CD86 está mais relacionada ao desenvolvimento do perfil Th2 (SAID *et al.*, 2016). No nosso estudo não identificamos diferença significativa ao comparar as populações de crianças sadias e doentes no que diz respeito à frequência de monócitos CD80+. Entretanto,

monócitos clássicos de crianças atópicas apresentam maior expressão de CD80 que monócitos clássicos de crianças saudas. Ao se analisar a molécula de CD86, evidenciamos menor porcentagem de monócitos clássicos e não-clássicos expressando CD86 em crianças atópicas que em crianças saudas, porém, maior expressão dessa molécula em monócitos clássicos de atópicos e menor, em monócitos intermediários e não-clássicos, quando se compara ao grupo sadio. Os dados sugerem maior atividade coestimulatória na apresentação antigênica dos monócitos clássicos no grupo de crianças doentes, com participação tanto da molécula de CD80 quanto da molécula de CD86, sendo mais expressiva a participação do CD86, o que pode estar associado ao desenvolvimento de resposta imune mista Th2/Th1 na patogênese da doença, com maior participação da polarização Th2. Esses dados concordam com a literatura, no que concerne à patogênese da doença (GITTLER *et al.*, 2012; LEUNG e GUTTMAN-YASSKY, 2014; KIM *et al.*, 2016), entretanto, há relato de atividade defeituosa da resposta Th1 em crianças portadoras de DA em relação a adultos atópicos (CZARNOWICKI *et al.*, 2015). Estudos posteriores são necessários para analisar se a expressão da molécula de CD80 pode ser importante na avaliação indireta da atividade Th1 em adultos para se comparar com nossas observações.

A molécula de PD1L (CD274) amplamente expressa em células fagocíticas mononucleares participa ativamente dos processos inflamatórios por apresentar atividade imunomoduladora (HUANG *et al.*, 2009; RIELLA *et al.*, 2012). No nosso trabalho observa-se maior expressão dessa molécula em monócitos clássicos de crianças doentes quando comparadas ao grupo saudável. Considerando a atividade inflamatória exacerbada deste subtipo celular em crianças portadoras de dermatite atópica, provavelmente a ativação da via de PD1L funciona modulando essa

resposta. Alguns estudos têm avaliado o papel da molécula de PD1L na patogênese de doenças neoplásicas e rejeição de transplantes (AL-CHAQMAQCHI *et al*, 2013; TAMAI *et al.*, 2014). Os sinais inibitórios decorrentes da ativação do PD1L vão orquestrar o equilíbrio entre ativação de células T, imunotolerância e dano tecidual imunomediado (FRANCISCO, SAGE e SHARPE, 2010). Um exemplo disso é o modelo animal de colangiocarcinoma, no qual animais com baixa expressão desta molécula apresentam progressão mais desfavorável da neoplasia (TAMAI *et al.*, 2014).

Analisando a expressão de citocinas inflamatórias encontramos menor porcentagem de monócitos não-clássicos produtores de IL-6 e TNF- $\alpha$  e maior expressão de expressão dessas citocinas em monócitos clássicos de crianças portadoras de DA em comparação a crianças saudáveis. Também observamos maior expressão de IL6 em monócitos intermediários de crianças doentes do que no grupo sadio. Esses elementos sinalizam atividade inflamatória exacerbada em monócitos clássicos e intermediários de crianças atópicas. Enquanto a resposta inflamatória aguda via IL-6 é altamente benéfica, uma resposta exacerbada e persistente leva a inflamação crônica e auto-imunidade, com efeitos deletérios importantes. Isso pode ser observado em modelos animais, nos quais camundongos KO para IL-6 apresentam-se resistentes ao desenvolvimento de colite, encefalite experimental autoimune, miocardite experimental autoimune e doença renal experimental autoimune (FONTES, ROSE, e ČIHÁKOVÁ, 2015). Observa-se ainda, em pacientes portadores de lupus eritematoso sistêmico, correlação dos altos níveis séricos de IL-6 com períodos de piora da condição clínica (JAIN *et al.*, 2016). Outra citocina com papel bem estabelecido em processos inflamatórios é o TNF- $\alpha$ . Há na literatura evidências da atividade dessa citocina na patogênese de várias doenças,

entre elas, esclerose múltipla, depressão e doenças neoplásicas (MOREIRA-TABAKA *et al.*, 2012; VALENTIN-TORRES *et al.*, 2016; MA, ZHANG e BALOCH, 2016) A maior expressão de IL-6 e TNF- $\alpha$  em monócitos clássicos e intermediários de crianças atópicas em relação ao grupo controle está diretamente envolvida com a atividade inflamatória crônica observada na doença.

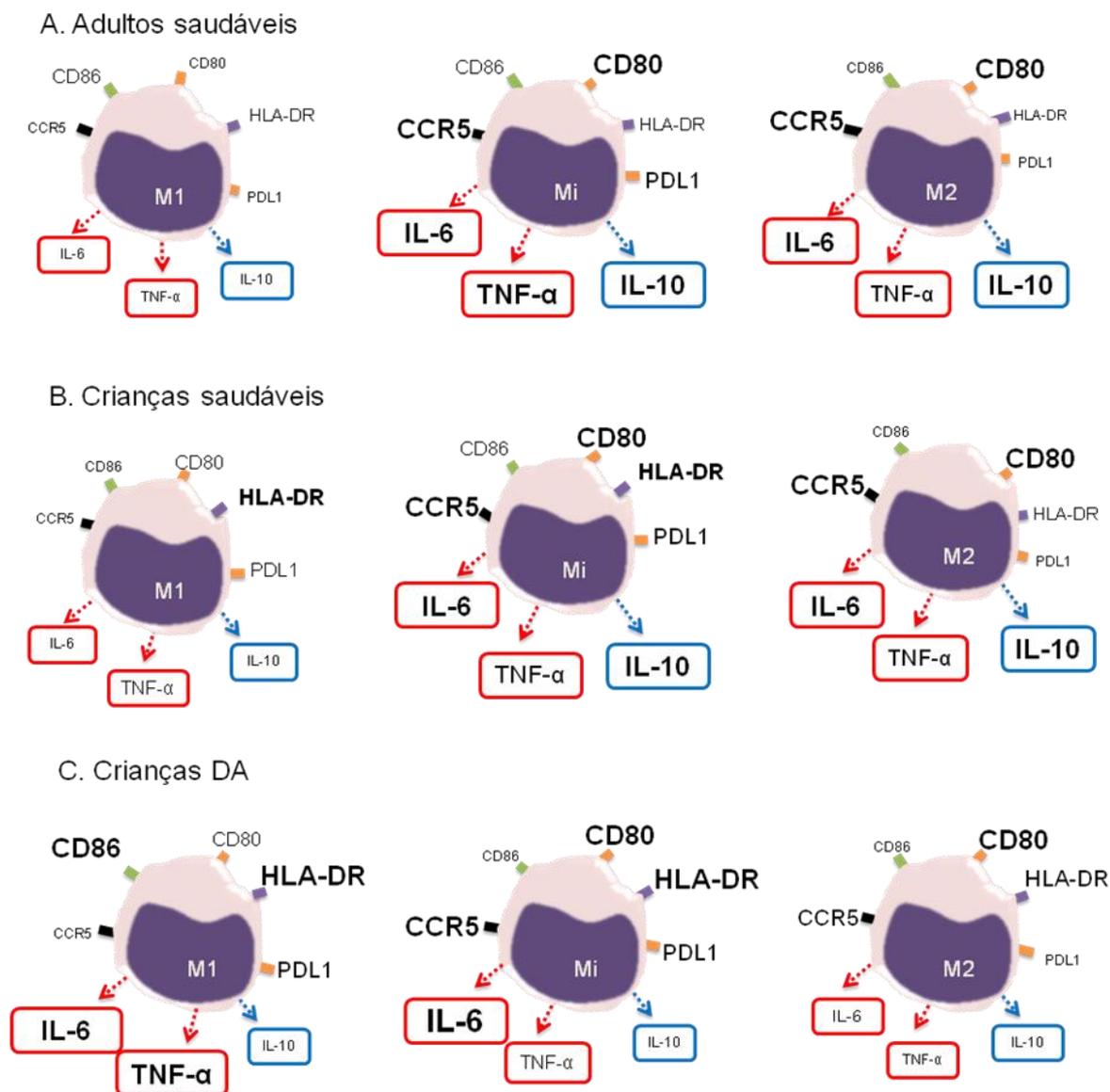
Ao avaliar a produção de IL10, citocina de caráter modulador da resposta inflamatória, não verificamos diferenças em sua expressão em monócitos de crianças atópicas em relação ao grupo controle. Trata-se de uma molécula importante no controle da produção de citocinas inflamatórias como IL6, TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , com atividade na inibição da apresentação antigênica pelos fagócitos mononucleares, por reduzir a expressão de MHC classe II e moléculas coestimulatórias (XIE *et al.*, 2014). Há relatos na literatura de participação de polimorfismos nos genes envolvidos na produção de IL10 na patogênese de doenças imunomediadas, como a dermatite atópica (RAEDLER *et al.*, 2013). No nosso trabalho, há atividade inflamatória exacerbada sem mudança no padrão de expressão de IL-10, ou seja, a participação dessa citocina no controle da atividade inflamatória na DA é pouco expressiva.

## 8 Conclusão

Nosso grupo, por meio deste estudo, analisou as subpopulações de monócitos em indivíduos saudáveis de diferentes faixas etárias, assim como de crianças portadoras de dermatite atópica. Observamos que a frequência relativa de monócitos foi constante nos três grupos populacionais estudados (adultos e crianças saudáveis e crianças com dermatite atópica), mas a expressão de moléculas de superfície e citocinas apresentaram particularidades significativas. Uma análise global dos resultados encontrados nas duas etapas da nossa pesquisa, nos permite fazer observações importantes: há maior expressão de moléculas envolvidas na apresentação antigênica encontra-se mais exacerbada no grupo de crianças atópicas, seguido pelo grupo de crianças saudáveis, quando comparados aos adultos saudáveis; enquanto a molécula de CD80 é expressa de forma semelhante nos três grupos populacionais estudados, o CD86 apresenta maior expressão em monócitos clássicos de crianças atópicas que em adultos e crianças saudáveis, destacando sua importância como molécula coestimulatória; ademais, avaliando indivíduos saudáveis, percebemos um perfil similar de expressão de moléculas de superfície e citocinas, e, curiosamente, observa-se maior produção de citocinas inflamatórias e reguladoras por monócitos intermediários e não-clássicos de indivíduos saudáveis, enquanto indivíduos com DA apresentam maior produção de citocinas inflamatórias em monócitos clássicos.

A figura 22 mostra a representação esquemática dos dados obtidos neste trabalho.

**Figura 23 - Representação esquemática da expressão de moléculas de superfície e citocinas em monócitos clássicos, monócitos intermediários e monócitos não-clássicos de adultos saudáveis, crianças saudáveis e crianças com dermatite atópica.**



Crianças saudáveis (B) apresentam maior expressão de HLA-DR, demonstrando maior capacidade de apresentação antigênica que adultos saudáveis (A) e os subtipos de monócitos mais envolvidos na resposta inflamatória nos grupos de adultos e crianças saudáveis são monócitos intermediários e monócitos não-clássicos. Monócitos clássicos de crianças atópicas (C) se mostraram mais inflamatórios quando comparados ao mesmo subtipo em crianças saudáveis (B). A expressão das moléculas de superfície e citocinas nos subtipos de monócitos está representada esquematicamente pela diferença de tamanho e destaque na figura.

## 9 Referências Bibliográficas

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. HH; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Elsevier Brasil, 2015.

ABELES, D. *et al.* CD14, CD16 and HLA-DR reliably identifies human monocytes and their subsets in the context of pathologically reduced HLA-DR expression by CD14hi/CD16neg monocytes: Expansion of CD14hi/CD16pos and contraction of CD14lo/CD16pos monocytes in acute liver failure. **Cytometry Part A**, v. 81, n. 10, p. 823-834, 2012.

AL-CHAQMAQCHI, H. *et al.* The role of programmed cell death ligand-1 (PD-L1/CD274) in the development of graft versus host disease. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e60367, 2013.

AL-SHOBAILI, Hani A. *et al.* Molecular Genetic of Atopic dermatitis: An Update. **International journal of health sciences**, v. 10, n. 1, p. 96, 2016.

ANCUTA, P. *et al.* Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. **The Journal of experimental medicine**, v. 197, n. 12, p. 1701-1707, 2003.

BANTZ, S. K.; ZHU, Z.; ZHENG, T. The atopic march: progression from atopic dermatitis to allergic rhinitis and asthma. **Journal of clinical & cellular immunology**, v. 5, n. 2, 2014.

BARROS, M. H. M. *et al.* Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e80908, 2013.

BRANDT, E. B.; SIVAPRASAD, U. Th2 cytokines and atopic dermatitis. **Journal of clinical & cellular immunology**, v. 2, n. 3, 2011.

BELDA JUNIOR W.; DI CHIACCHIO N.; CRIADO P.R. **Tratado de Dermatologia**. 2. Ed. São Paulo: Atheneu, 2010. v.1

BUTTE, M. J. *et al.* Interaction of human PD-L1 and B7-1. **Molecular immunology**, v. 45, n. 13, p. 3567-3572, 2008.

CILFONE, N. A. *et al.* Multi-scale modeling predicts a balance of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-10 controls the granuloma environment during *Mycobacterium tuberculosis* infection. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e68680, 2013.

CZARNOWICKI, T. *et al.* Early pediatric atopic dermatitis shows only a CLA+ Th2/Th1 imbalance, while adults acquire CLA+ Th22/Tc22 subsets. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 136, n. 4, p. 941, 2015.

DARLENSKI, R. *et al.* Atopic dermatitis as a systemic disease. **Clinics in dermatology**, v. 32, n. 3, p. 409-413, 2014.

DERLINDATI, E. *et al.* Transcriptomic analysis of human polarized macrophages: more than one role of alternative activation?. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0119751, 2015.

DJUKANOVIC, R. The role of co-stimulation in airway inflammation. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 30, n. 6; SUPP/1, p. 46-50, 2000.

FONTES, J. A.; ROSE, N. R.; ČIHÁKOVÁ, D. The varying faces of IL-6: From cardiac protection to cardiac failure. **Cytokine**, v. 74, n. 1, p. 62-68, 2015.

FRANCISCO, L. M.; SAGE, P. T.; SHARPE, A. H. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. **Immunological reviews**, v. 236, n. 1, p. 219-242, 2010.

FRANKE, A. *et al.* Delayed recovery of human leukocyte antigen-DR expression after cardiac surgery with early non-lethal postoperative complications: only an epiphenomenon?. **Interactive cardiovascular and thoracic surgery**, v. 7, n. 2, p. 207-211, 2008.

FITZGERALD, K. A.; CAFFREY, D.I R. Long noncoding RNAs in innate and adaptive immunity. **Current opinion in immunology**, v. 26, p. 140-146, 2014.

GALVÁN-PEÑA, S.; O'NEILL, L. A. J. Metabolic reprogramming in macrophage polarization. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 420, p. 2, 2014.

GEISSMANN, F. *et al.* Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science**, v. 327, n. 5966, p. 656-661, 2010.

GERARD, C.; ROLLINS, B. J. Chemokines and disease. **Nature immunology**, v. 2, n. 2, 2001.

GHOSH, D. *et al.* Multiple Transcriptome Data Analysis Reveals Biologically Relevant Atopic Dermatitis Signature Genes and Pathways. **PloS one**, v. 10, n. 12, p. e0144316, 2015.

GITTLER, J. K. *et al.* Progressive activation of Th2/Th22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 130, n. 6, p. 1344-1354, 2012.

HAVEMAN, J. W. *et al.* HLA-DR expression on monocytes and systemic inflammation in patients with ruptured abdominal aortic aneurysms. **Critical Care**, v. 10, n. 4, p. 1, 2006.

HUANG, X. *et al.* PD-1 expression by macrophages plays a pathologic role in altering microbial clearance and the innate inflammatory response to sepsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 15, p. 6303-6308, 2009.

ITALIANI, P.; BORASCHI, D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 514, 2014.

JAIN, S. *et al.* Interleukin 6 Accelerates Mortality by Promoting the Progression of the Systemic Lupus Erythematosus-Like Disease of BXSB. Yaa Mice. **PloS one**, v. 11, n. 4, p. e0153059, 2016.

JANEWAY JR, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual review of immunology**, v. 20, n. 1, p. 197-216, 2002.

KASRAIE, S.; WERFEL, T. Role of macrophages in the pathogenesis of atopic dermatitis. **Mediators of inflammation**, v. 2013, 2013.

KEESEN, T. S. L. *et al.* CD4+ T cells defined by their V $\beta$  T cell receptor expression are associated with immunoregulatory profiles and lesion size in human leishmaniasis. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 165, n. 3, p. 338-351, 2011.

KIM, O. Y. *et al.* Differential down-regulation of HLA-DR on monocyte subpopulations during systemic inflammation. **Critical Care**, v. 14, n. 2, p. 1, 2010.

KIM, J. E. *et al.* Molecular Mechanisms of Cutaneous Inflammatory Disorder: Atopic Dermatitis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 8, p. 1234, 2016.

LEUNG, D. Y. M. New insights into atopic dermatitis: role of skin barrier and immune dysregulation. **Allergology international**, v. 62, n. 2, p. 151-161, 2013.

LEUNG, D. Y. M.; GUTTMAN-YASSKY, E. Deciphering the complexities of atopic dermatitis: shifting paradigms in treatment approaches. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 134, n. 4, p. 769-779, 2014.

LIU, Z. X. *et al.* Increased expression of costimulatory molecules on peripheral blood monocytes in patients with Crohn's disease. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 32, n. 12, p. 1241-1246, 1997.

MA, Ke; ZHANG, H.; BALOCH, Z.. Pathogenetic and Therapeutic Applications of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in Major Depressive Disorder: A Systematic Review. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 5, p. 733, 2016.

McDADE, T. W. Life history theory and the immune system: steps toward a human ecological immunology. **American journal of physical anthropology**, v. 122, n. S37, p. 100-125, 2003.

McDADE, T. W.; GEORGIEV, A. V.; KUZAWA, C. W. Trade-offs between acquired and innate immune defenses in humans. **Evolution, medicine, and public health**, v. 2016, n. 1, p. 1-16, 2016.

MACK, M. *et al.* Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 7, p. 4697-4704, 2001.

MANTOVANI, A.; GARLANDA, C. e LOCATI, M. Macrophage Diversity and Polarization in Atherosclerosis A Question of Balance. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**; v. 29, p. 1419-1423, 2009

MANTOVANI, A. *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends in immunology**, v. 25, n. 12, p. 677-686, 2004.

MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000Prime Rep**, v. 6, n. 13.10, p. 12703, 2014.

MECHNIKOV, I. Nobel lecture: on the present state of the question of immunity in infectious diseases. **Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1901–1921**. 1967.

MILLS, C. D.; LENZ, L. L.; LEY, K. Macrophages at the fork in the road to health or disease. **M1/M2 Macrophages: The Arginine Fork in the Road to Health and Disease**, p. 7, 2015.

MOREIRA-TABAKA, H. *et al.* Unlike for human monocytes after LPS activation, release of TNF- $\alpha$  by THP-1 cells is produced by a TACE catalytically different from constitutive TACE. **PloS one**, v. 7, n. 3, p. e34184, 2012.

MUENCHHOFF, M.; PRENDERGAST, A. J.; GOULDER, P. J. R. Immunity to HIV in early life. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 391, 2014.

MUKHERJEE, R. *et al.* Non-classical monocytes display inflammatory features: validation in sepsis and systemic lupus erythematosus. **Scientific reports**, v. 5, 2015.

NAKADA, M. *et al.* CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) antigens on house dust mite-specific T cells in atopic disease function through TT cell interactions. **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 104, n. 1, p. 222-227, 1999.

NOVAIS, O. *et al.* Human classical monocytes control the intracellular stage of *Leishmania braziliensis* by reactive oxygen species. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 8, p. 1288-1296, 2014.

NOVAK, N. *et al.* Characterization of monocyte subtypes in the allergic form of atopic eczema/dermatitis syndrome. **Allergy**, v. 57, n. 10, p. 931-935, 2002.

OLIVEIRA, S. *et al.* Síndrome de eczema/dermatite atópica em Portugal - perfil de sensibilização. **Rev Port Imunoalergologia**, v.13, n.1, p.81-88, 2005.

ONG, P. Y.; LEUNG, D. Y. M. The infectious aspects of atopic dermatitis. **Immunology and allergy clinics of North America**, v. 30, n. 3, p. 309-321, 2010.

PASSOS, S. *et al.* Intermediate monocytes contribute to pathologic immune response in *Leishmania braziliensis* infections. **Journal of Infectious Diseases**, p. jiu439, 2014.

PENG, W.; NOVAK, N. Pathogenesis of atopic dermatitis. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 45, n. 3, p. 566-574, 2015.

PLÖTZ, S. G.; RING, Jo. What's new in atopic eczema?. **Expert opinion on emerging drugs**, v. 15, n. 2, p. 249-267, 2010.

RAEDLER, D. *et al.* IL10 polymorphisms influence neonatal immune responses, atopic dermatitis, and wheeze at age 3 years. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 131, n. 3, p. 789-796, 2013.

RAMAN, D.; SOBOLIK-DELMARE, T.; RICHMOND, A. Chemokines in health and disease. **Experimental cell research**, v. 317, n. 5, p. 575-589, 2011.

RAMSEYER, V. D.; GARVIN, J. L. Tumor necrosis factor- $\alpha$ : regulation of renal function and blood pressure. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 304, n. 10, p. F1231-F1242, 2013.

RICHTER, A. *et al.* HLA-DR expression in acute pancreatitis. **The European journal of surgery**, v. 165, n. 10, p. 947-951, 1999.

RIELLA, Leonardo V. *et al.* Role of the PD-1 Pathway in the Immune Response. **American Journal of Transplantation**, v. 12, n. 10, p. 2575-2587, 2012.

RITZ, N. *et al.* A comparative analysis of polyfunctional T cells and secreted cytokines induced by Bacille Calmette-Guerin immunisation in children and adults. **PloS one**, v. 7, n. 7, p. e37535, 2012.

RUTKOWSKI, R. *et al.* CD80 and CD86 Expression on LPS-Stimulated Monocytes and the Effect of CD80 and CD86 Blockade on IL-4 and IFN-gamma Production in Nanotopic Bronchial Asthma. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis-english edition**, v. 51, n. 6, p. 421-428, 2003.

SAEYS, Y.; VAN GASSEN, S.; LAMBRECHT, B. N. Computational flow cytometry: helping to make sense of high-dimensional immunology data. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 7, p. 449-462, 2016.

SAID, E. A. *et al.* Increased CD86 but Not CD80 and PD-L1 Expression on Liver CD68+ Cells during Chronic HBV Infection. **PloS one**, v. 11, n. 6, p. e0158265, 2016.

SILVERBERG, N. B.; SILVERBERG, J. I. Inside Out or Outside In: Does Atopic Dermatitis Disrupt Barrier Function or Does Disruption of Barrier Function Trigger Atopic Dermatitis? **Cutis**, v. 96, n. 11, p. 359-361, 2015.

SIMON, A. K.; HOLLANDER, G. A.; McMICHAEL, A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. In: **Proc. R. Soc. B**. The Royal Society, 2015. p. 20143085.

SOUZA, P. E. A. *et al.* Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. **Infection and immunity**, v. 72, n. 9, p. 5283-5291, 2004.

STALDER, J. F.; TAIEB, A. Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. **Dermatology**, v. 186, n. 1, p. 23-31, 1993. Disponível em: <<http://www.fondation-dermatite-atopique.org/pt/espaco-para-profissionais-de-saude/scorad-e-po-scorad/o-scorad>>. Acesso em: 21 de set. 2016.

STALDER, J. F. *et al.* Patient-Oriented SCORAD (PO-SCORAD): a new self-assessment scale in atopic dermatitis validated in Europe. **Allergy**, v. 66, n. 8, p. 1114-1121, 2011. Disponível em: <<http://www.fondation-dermatite-atopique.org/pt/espaco-para-profissionais-de-saude/scorad-e-po-scorad/o-po-scorad>>. Acesso em: 21 de set. 2016.

SUÁREZ-FARINAS, M. *et al.* Intrinsic atopic dermatitis shows similar TH2 and higher TH17 immune activation compared with extrinsic atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, n. 2, p. 361-370, 2013.

TAMAI, K. *et al.* Suppressive expression of CD274 increases tumorigenesis and cancer stem cell phenotypes in cholangiocarcinoma. **Cancer science**, v. 105, n. 6, p. 667-674, 2014.

TOTRI, C. R.; DIAZ, L.; EICHENFIELD, L. F. 2014 update on atopic dermatitis in children. **Current opinion in pediatrics**, v. 26, n. 4, p. 466-471, 2014.

VALENTIN-TORRES, A. *et al.* Sustained TNF production by central nervous system infiltrating macrophages promotes progressive autoimmune encephalomyelitis. **Journal of neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 1, 2016.

VESTER, H. *et al.* HLA-DR expression on monocytes is decreased in polytraumatized patients. **European journal of medical research**, v. 20, n. 1, p. 1, 2015.

WIERDA, R. J. *et al.* Epigenetic control of CCR5 transcript levels in immune cells and modulation by small molecules inhibitors. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 16, n. 8, p. 1866-1877, 2012.

WONG, K. L. *et al.* Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. **Blood**, v. 118, n. 5, p. e16-e31, 2011.

XIE, L. *et al.* Overexpression of IL-10 in C2D macrophages promotes a macrophage phenotypic switch in adipose tissue environments. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e86541, 2014.

YANG, J. *et al.* Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. **Biomarker research**, v. 2, n. 1, p. 1, 2014.

YATIM, K. M.; LAKKIS, F. G. A brief journey through the immune system. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, p. CJN. 10031014, 2015.

YU, Y. *et al.* Impaired Toll-like receptor 2-mediated Th1 and Th17/22 cytokines secretion in human peripheral blood mononuclear cells from patients with atopic dermatitis. **Journal of translational medicine**, v. 13, n. 1, p. 1, 2015.

ZAWADA, A. M. *et al.* SuperSAGE evidence for CD14<sup>++</sup> CD16<sup>+</sup> monocytes as a third monocyte subset. **Blood**, p. blood-2011-01-326827, 2011.

ZHENG, M.; MROWIETZ, U. Phenotypic differences between human blood monocyte subpopulations in psoriasis and atopic dermatitis. **The Journal of dermatology**, v. 24, n. 6, p. 370-378, 1997.

ZIEGLER-HEITBROCK, L. *et al.* Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. **Blood**, v. 116, n. 16, p. e74-e80, 2010.

ZIEGLER-HEITBROCK, L. Blood monocytes and their subsets: established features and open questions. **Frontiers in immunology**, v. 6, 2015.

## 10 ANEXOS

### 10.1 ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO PROJETO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (UFPB)



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** DERMATITE ATÓPICA: RELAÇÃO ENTRE A GRAVIDADE DA DOENÇA E ALGUMAS ALTERAÇÕES PRESENTES NO SANGUE

**Pesquisador:** Tatjana Keesen de Souza Lima

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 47324115.4.0000.5183

**Instituição Proponente:** Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.217.205

##### Apresentação do Projeto:

Trata-se da segunda versão da submissão de projeto de pesquisa de mestrado do Centro de Biotecnologia, do Departamento de Biologia Celular e Molecular, de autoria da discente Renata da Silveira Rodrigues Paiva, sob a orientação da Dra. Tatjana Keesen de Souza Lima.

O presente projeto de pesquisa tem como objetivo central identificar e validar moléculas que potencialmente funcionem como marcadores prognósticos de apresentação clínica e gravidade da Síndrome de Eczema e Dermatite Atópica -SEDA, pelo estudo dos mecanismos associados à evolução da doença, além de identificar subpopulações de monócitos / macrófagos e o seu mecanismo de ação nos diferentes fenótipos encontrados. Para isso, será realizada identificação de marcadores de monócitos / macrófagos além de citocinas e moléculas sinalizadoras envolvidas nessa complexa patogênese. A hipótese que norteou esse projeto é que fatores imunológicos e celulares associados às diferentes formas de SEDA possam ser utilizados como marcadores de gravidade na doença.

Serão estudadas amostras provenientes de pacientes com história e sinais clínicos compatíveis com SEDA, colhidas no Ambulatório de Dermatologia Pediátrica do Hospital Universitário Lauro Wanderley, na Universidade Federal da Paraíba, e encaminhadas para o Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas do centro de biotecnologia da UFPB. Todas as amostras serão

**Endereço:** Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 58.059-900  
**UF:** PB **Município:** JOAO PESSOA  
**Telefone:** (83)3216-7964 **Fax:** (83)3216-7522 **E-mail:** comitedeetica@hulw.ufpb.br

*Dra. Renata da Silveira Rodrigues Paiva*  
 Coordenadora  
 Comitê de Ética em Pesquisa  
 HULW - EBSERH / UFPB



Continuação do Parecer: 1.217.205

acompanhadas de ficha de identificação e dados de coleta. Além disso, amostras de indivíduos não afetados serão coletadas e analisadas.

A amostra será por conveniência e será composta por 11 pacientes com SEDA e 7 saudáveis, provenientes do ambulatório de dermatologia pediátrica do HULW. Serão obtidos dados demográficos, anamnese, exame físico, questionário para avaliação da gravidade da doença e também coleta de sangue para análise laboratorial de IgE e de marcadores imunológicos e expressão de citocinas relacionadas a prognóstico. Critério de Inclusão:

Pacientes entre zero e (doze) anos, de ambos os sexos, com história e sinais clínicos compatíveis com SEDA, provenientes do Ambulatório de Dermatologia Pediátrica do Hospital Universitário Lauro Wanderley, na Universidade Federal da Paraíba, no período de julho de 2015 a junho de 2016.

Critério de Exclusão:

Pacientes portadores de doenças infecciosas, inflamatórias ou imunológicas.

A amostra utilizada nesse projeto é uma amostra de conveniência e é baseada em estudos anteriores que utilizaram metodologia semelhante (Keesen et al., 2011). Devido a ser um estudo de identificação de marcadores celulares em humanos, que envolve pacientes, os trabalhos de pesquisa em diferentes doenças, optam pela amostragem de conveniência, também por causa do alto custo da técnica imunológica (citometria de fluxo) para avaliação das amostras.

Os controles serão crianças atendidas no ambulatório de pediatria e que seriam submetidos a coleta de sangue de rotina por outras patologias.

Foram apresentados os TCLE de pacientes e controles, Termos de anuência de pacientes e controles com as recomendações feitas, bem como a planilha de custos e sua responsabilidade.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Geral:

Identificar crianças com dermatite atópica, fazendo uma criteriosa avaliação clínica e laboratorial, e correlacionar com subpopulações de monócitos/macrófagos e citocinas envolvidas no processo inflamatório com a gravidade da doença.

Objetivo específico 1: Avaliar clinicamente as crianças com SEDA, usando ferramentas semiológicas para classificar o quadro segundo sua gravidade e realizar dosagem de IgE sérica para, junto com critérios clínicos, classificar a criança como portadora de SEDA alérgica ou SEDA não-alérgica

Objetivo específico 2: Caracterizar subpopulações de monócitos (M1 e M2 envolvidos no

**Endereço:** Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 58.059-900  
**UF:** PB **Município:** JOAO PESSOA  
**Telefone:** (83)3216-7964 **Fax:** (83)3216-7522 **E-mail:** comitedeetica@hulw.ufpb.br



Continuação do Parecer: 1.217.205

estabelecimento do quadro clínico da SEDA, além de avaliar o potencial de diferentes marcadores imunológicos e expressão de citocinas (CD14, CD16, , CCR2, CCR5, CX3CR1, CD163, HLA-DR, LFA-1, IL1RA, PD-1, IL-10, IL-6, TNF- IL-1) dessas células para o prognóstico do desenvolvimento ou controle da doença.

Objetivo específico 3: Correlacionar dados clínicos com os achados imunológicos, objetivando o estudo de grau de desenvolvimento de gravidade da doença.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

A pesquisadora ressalta que os riscos e desconfortos decorrentes desse estudo são mínimos previsíveis, decorrentes da coleta: poderá ocorrer desmaio, sangramentos, equimoses ou infecção no local da coleta. Entretanto afirma que irá minimizar estes riscos com cuidados na realização deste procedimento, que são a limpeza no local da coleta através da utilização de álcool e pressionando a região do braço onde foi feita a coleta com algodão por alguns minutos, após a retirada da agulha.

Também foram devidamente acrescentados no TCLE a realização da entrevista e exame físico no paciente.

**Benefícios:**

Os pacientes e responsáveis legais destes serão informados sobre os resultados dos testes que serão realizados com o sangue coletado. E uma melhor caracterização das células e citocinas inflamatórias envolvidas nas diversas formas da doença poderão contribuir com a melhoria das estratégias terapêuticas.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

As pesquisadoras responsáveis atenderam todas as pendências apontadas no parecer anterior (nº 1.169.470). Portanto, o projeto apresenta-se bem delineado metodologicamente, e provavelmente trará dados relevantes sobre a patologia e conseqüente melhora terapêutica, com contribuições para comunidade acadêmica, científica e pacientes.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

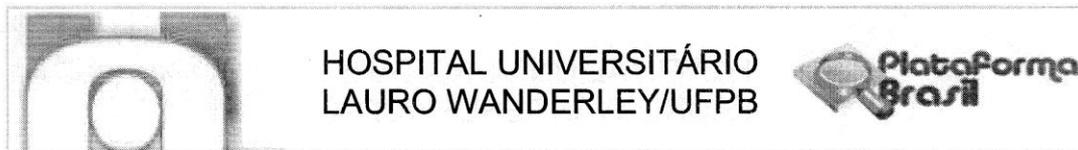
Foram apresentados: projeto, folha de rosto, TCLE (paciente e controle), Termo de Anuência (paciente e controle) e planilha de custos.

**Recomendações:**

Recomenda-se que o pesquisador responsável e demais colaboradores, CUMPRAM, EM TODAS AS FASES DO ESTUDO, A METODOLOGIA PROPOSTA E APROVADA PELO CEP-HULW. Caso ocorram

**Endereço:** Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 58.059-900  
**UF:** PB **Município:** JOAO PESSOA  
**Telefone:** (83)3216-7964 **Fax:** (83)3216-7522 **E-mail:** comitedeetica@hulw.ufpb.br

*Dra. Ma. Eliane Moreira Preire*  
 Coordenadora  
 Comitê de Ética em Pesquisa  
 HULW - UFPB  
 03 de 06



Continuação do Parecer: 1.217.205

Plataforma Brasil, para emissão da Certidão Definitiva por este CEP.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

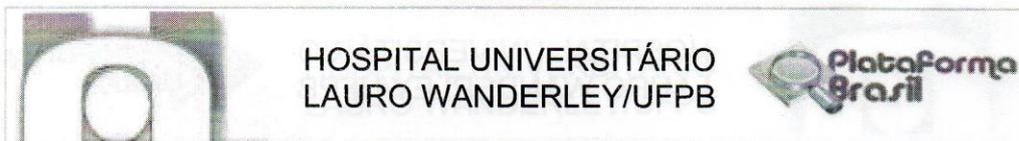
Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	FICHA DO PACIENTE.docx	18/05/2015 12:13:52		Aceito
Outros	SCORAD.docx	25/05/2015 11:48:47		Aceito
Outros	PO Scorad.pdf	26/05/2015 05:55:12		Aceito
Folha de Rosto	001.jpg	16/06/2015 12:43:13		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Ficha de cadastro do projeto 1.jpg	30/06/2015 11:39:22		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Ficha de cadastro do projeto 2.jpg	30/06/2015 11:39:39		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO 515303.pdf	06/07/2015 10:31:13		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO 515303.pdf	14/07/2015 10:23:58		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE DA controles .doc	09/08/2015 17:09:59		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE DA modificado.doc	11/08/2015 10:20:15		Aceito
Outros	ORÇAMENTO DETALHADO.doc	11/08/2015 10:20:48		Aceito
Outros	TERMO DE ANUÊNCIA.doc	11/08/2015 10:21:11		Aceito
Outros	TERMO DE ANUÊNCIA controles.doc	11/08/2015 10:21:32		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto completo modificado.pdf	16/08/2015 22:01:28		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO 515303.pdf	16/08/2015 22:03:51		Aceito

**Situação do Parecer:**

**Endereço:** Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 58.059-900  
**UF:** PB **Município:** JOAO PESSOA  
**Telefone:** (83)3216-7964 **Fax:** (83)3216-7522 **E-mail:** comitedeetica@hulw.ufpb.br

Página 05 de 06

Dr<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Eliane Moreira Freire  
 Coordenadora  
 Comitê de Ética em Pesquisa  
 HULW/BBERR/UFPB



Continuação do Parecer: 1.217.205

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

JOAO PESSOA, 07 de Setembro de 2015  
 Maria Eliane Moreira Freire  
 Coordenadora  
 Comitê de Ética em Pesquisa  
 HULW - EBSERH / UFPB

Assinado por:

**MARIA ELIANE MOREIRA FREIRE**  
 (Coordenador)

**Endereço:** Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 58.059-900  
**UF:** PB **Município:** JOAO PESSOA  
**Telefone:** (83)3216-7964 **Fax:** (83)3216-7522 **E-mail:** comitedeetica@hulw.ufpb.br



Scorad V3.0

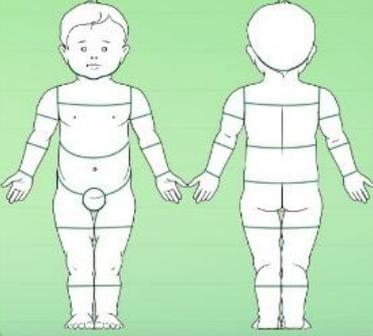
Submeter Ajuda Contato

### A : Superfície afetada

- Selecione a idade da pessoa afetada

- De 2 anos + De 2 anos

- Indique no desenho as zonas afetadas pelo eczema



### B : Intensidade dos sintomas (0 a 3)

Secura Vermelhidão

Inchaço Eliminação de líquido / Crostas

Lesões (ferida) de coçagem Espessamento

\* A secura é avaliada na pele sã (sem eczema)

### C : Sintomas subjetivos

Comichão - perturbações do sono

Escala visual numérica (valor de 0 a 10)

(Média das últimas 48 horas)

Sem perturbações do sono Perturbações do sono muito importantes

Sem coçagem Coçagem Intolerável

ETIAD 21/09/2016

Dermetite Atópica Teste 1

SCORAD