UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

Adriana Christie Lacerda Simões

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE PARVOVÍRUS B19 NA PELE PSORIÁTICA E SUA CORRELAÇÃO COM AS ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS *in situ*

BELÉM – PARÁ

2010

Adriana Christie Lacerda Simões

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE PARVOVÍRUS B19 NA PELE PSORIÁTICA E SUA CORRELAÇÃO COM AS ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS *in situ*

Dissertação de mestrado apresentada a banca examinadora do Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical, da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Mestre em Doenças Tropicais.
Área de Concentração: Clínica das Doenças Tropicais.
Orientador: Prof. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma.

BELÉM – PARÁ

2010

Dados Internacionais de Catalogação -na- Publicação (CIP) – Biblioteca do Núcleo de Medicina Tropical/UFPA, Belém-PA

Simões, Adriana Christie Lacerda.
Avaliação da presença de parvovírus B19 na pele psoriática e sua correlação com as alterações imunológicas in situ / Adriana Christie Lacerda Simões; orientador, Juarez Antônio Simões Quaresma. – 2012

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará. Núcleo de Medicina Tropical. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais. Belém, 2012.

1. Psoríase. 2. Parvovírus B19. 3. Infecção por parvovírus. I. Quaresma, Juarez Antônio Simões, orient. II. Título.

CDD: 22. ed. 616.526

Ficha catalográfica elaborada por Valdenira Moreira, NMT/UFPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

Adriana Christie Lacerda Simões

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE PARVOVÍRUS B19 NA PELE PSORIÁTICA E SUA CORRELAÇÃO COM AS ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS *in situ*

BANCA EXAMINADORA:

_____ - Membro
Dra Francisca Regina Carneiro
Centro de Ciencias biológicas e Saúde da
Universidade do Estado do Pará

_____ - Membro
Dra Marília Brasil
Núcleo de Medicina Tropical da Universidade
Federal do Pará

_____- Membro
Dr Arival Cardoso de Brito
Núcleo de Medicina Tropical da Universidade
Federal do Pará

_____- Suplente
Dra Denise Pinto
Núcleo de Medicina Tropical da Universidade
Federal do Pará

RESUMO

A psoríase é uma doença já considerada multissistêmica, cuja característica mais conhecida é o acometimento cutâneo e articular com etiologia ainda discutida. A pele acometida se apresenta comumente com eritema e descamação. Em nível celular, o processo envolve fundamentalmente as células T ativadas, macrófagos e polimorfonucleares. A participação dos ceratinócitos e a expressão imunodependente de moléculas de adesão revela uma complexa rede de mediadores com alta atividade biológica. A presença desses mediadores citocínicos determinam as alterações de funções imunorregulatórias traduzidas através do quadro clínico típico da doença. Após a comprovação do Streptococus B hemolítico como um agente desencadeador da psoríase gotada, vários estudos procuram relacionar outros fatores etiopatogênicos capazes de exercer uma expansão clonal de células T, como vimos na doença. Dentre alguns vírus estudados, o Parvovírus B19 foi relacionado como agente precipitador de artrite e de outras doenças autoimunes; e devido ser um vírus comum, produzir infecção por vezes assintomática, permanecer longamente no hospedeiro, induzir resposta inflamatória local e principalmente residir na pele também têm sido pesquisado como “agente de gatilho” no desenvolvimento da psoríase. Neste trabalho, utilizou-se a pesquisa do DNA viral através de técnica de PCR na pele de pacientes psoriásicos na pele de pacientes com eczema como controle e não foi observado nenhuma positividade significante que pudesse diferenciá-lo nos dois grupos, portanto, sem relação causal ou desencadeante da doença em questão. Na pesquisa de citocinas observou-seaquelas esperadas na pele psoriásica como TNF-a, mas também citocinas do tipo TH2. No grupo eczema, a presença de citocinas TH2 não foi alterada pela existência ou não do vírus no tecido. Apesar da predisposição genética para o desenvolvimento da doença, novos estudos são necessários a fim de pesquisar estímulos antigênicos capazes de alterar as funções imunológicas e criar um perfil e um fenótipo clínico que reconhecemos como psoríase.

Palavras-Chave: Psoríase, parvovírus B, TNF-a

ABSTRACT

Psoriasis is a disease already considered multisystemic, whose most known feature is the joint and skin involvement, with unclear etiology. The affected skin usually presents with erythema and desquamation. At the cellular level, the process involves primarily the activated T cells, macrophages and polymorphonuclear cells. Keratinocytes action and immune-dependent expression of adhesion molecules reveal a complex network of mediators with high biological activity. The presence of these inflammatory cytokines determines changes in Immunoregulatory functions translated by clinical symptoms of the disease. After verification of B hemolytic Streptococcus as a causative agent of guttate psoriasis, several studies has been attempted to relate other etiopathogenic factors capable of exerting a clonal expansion of T cells, as observed in the disease. Among some viruses studied, parvovírus B19 was listed as precipitating agent for arthritis and other autoimmune diseases, and due to be a common virus to produce infection often asymptomatic, spend time in the host, inducing local inflammatory response and mainly reside in the skin have also been researched as an "agent trigger" in the development of psoriasis. In this study, we used the viral DNA by PCR in the skin of psoriatic patients in the skin of eczema patients as controls and did not observe any significant positive results that would differentiate it in the two groups, therefore, no causal relationship or triggering the disease in question. In search of cytokines was observed that expected in psoriatic skin as TNF-a, but also of TH2 cytokines. Eczema in the group, the presence of TH2 cytokines was not altered by the presence of the virus in tissue. Despite the genetic predisposition to disease development, further studies are needed in order to study antigenic stimuli capable of altering immune function and create a profile and a clinical phenotype that can be recognized as psoriasis.

Key-Words: Psoriasis, Parvovírus B, TNF-a

LISTA DE SIGLAS

PASI	*Psoriasis Area and Severity Index*
FDA	*Food and Drug Administration*
DLQI	*Dermatology Life Quality Index*
APCs	Células apresentadoras de antígenos
PVB 19	Parvovírus B19
PCR	Reação de polimerase em cadeia
MHC	Major Histocompatibility Complex

LISTA DE QUADROS

QUADRO I – PASI (Psoriasis Area and Severity Index) 15

QUADRO II - Ítens Avaliados pelo DLQI Validado para a Língua Portuguesa 17

QUADRO III - Loci de Susceptibilidade de Psoríase 19

QUADRO IV - Co-Morbidades na Psoríase 22

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO 10

CAPÍTULO II – REFERENCIAL TEÓRICO 12

2.1. CONCEITOS SOBRE INFLAMAÇÃO CUTÂNEA 12

2.2. CONCEITOS SOBRE PSORÍASE E PARVOVÍRUS B 19 13

CAPÍTULO III – OBJETIVOS 27

3.1 OBJETIVO GERAL 27

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 27

CAPÍTULO IV – CASUÍSTICA E MÉTODOS 28

4.1 CARACTERÍSTICA DO ESTUDO 28

4.2 POPULAÇÃO ALVO 28

4.2.1 Pacientes e amostras de pele 28

4.2.2 Definição de Caso-controle 29

4.3 DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS 30

4.3.1 PCR para Detecção de PVB 19 30

4.3.2 Imunohistoquímica 31

4.3 DEFINIÇÃO DE CASO 29

4.4 DADOS COLETADOS 31

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA 32

4.6 ANÁLISE DE ASPECTOS ÉTICOS 32

CAPÍTULO V – RESULTADO 33

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES 33

5.2. PCR PARA DETECÇÃO DE DNA DO PARVOVÍRUS B19 38

5.3 IMUNOMARCAÇÃO PARA IL-2, IL-4, IFN-γ, TNF-α 40

CAPÍTULO VI – DISCUSSÃO 52

CAPÍTULO VII – CONCLUSÕES 57

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 58

ANEXOS

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

A psoriase é hoje considerada uma doença crônica, recorrente, inflamatória multissistêmica, imunologicamente mediada, cujo principal envolvimento é a pele e articulações. A incidência da psoríase praticamente dobrou desde a década de 1970 na população adulta norte-americana. O motivo desse aumento permanece desconhecido, porém estima-se ainda que uma grande parcela da população com a doença permaneça sem diagnóstico.

A característica clínica mais visível na pele são as placas escamosas laminares, prateadas acompanhadas de prurido ou não. Há ainda peculiaridades que permitem diferenciações das lesões especificando-as em várias formas clínicas a saber: psoriase em placas, psoriase palmo-plantar, eritrodérmica, pustulosa, gotada, acrodermatite, psoriase ungueal. Todas essas formas podem vir ou não de acometimento articular, ou a forma articular pode se apresentar isoladamente.

As escamas observadas na pele de um doente psoriático se deve ao turn-over acelerado das células epidérmicas, uma vez que o tempo do ciclo celular de queratinócitos hiperproliferativas é extremamente curto. Essa maturação de queratinócitos até chegar à camada mais superficial da epiderme leva 26 dias num indivíduo normal e 4 dias na epiderme psoriática.

Várias são as tentativas de estabelecer sua causa etiológica e a pesquisa da resposta imunológica nesses pacientes é certamente a que mais avança e novos dados nas áreas da epidemiologia, imunologia, clínica e diagnóstica colaboram para um melhor entendimento da doença.

Com base nas observações imunológicas, considera-se a psoríase uma doença inflamatória mediada por linfócitos T, confirmando as evidências clínicas em que o tratamento com imunossupressores leva à remissão da doença. Acredita-se então que o desenvolvimento e a manutenção das placas escamosas sejam devidos a linfócitos T (CD4, CD8, natural Killer- NK) ativados que proliferarem e a secretarem citocinas como IL2, IFN-γ e TNF-α (diz-se resposta Th1). Essas citocinas promovem um efeito cascata que culmina com a hiperproliferação da epiderme e dos vasos sanguíneos, além de efeitos pró-inflamatórios. Diversos argumentos reforçam

também as evidências genéticas da doença como a maior ocorrência entre familiares (18%- 36%), entre gêmeos monozigóticos (35%- 73%) e menor entre dizigóticos (23%-30%) . Os achados moleculares como o HLA-CW6 mostra ter associação à psoriase com acometimento articular e os HLA B 38, B39, e B27, mais associados ao acometimento axial. Dessa forma é inegável a participação genética, todavia, as lesões de psoríase necessitam de fatores do meio ambiente para surgir em indivíduos geneticamente predispostos.

Descrita pela primeira vez em 1916, a associação psoríase guttata e infecção de garganta por estreptococo β – hemolítico foi confirmada em diversos estudos subsequentes. Prováveis semelhanças antigênicas entre proteínas estreptocócicas (por exemplo, a proteína M) e peptídeos de queratina poderiam explicar certos casos de psoriase pós infecciosa (Valdimarsson 1995 immunol Today). Infecções virais também são descritas como o HIV, hepatite C, vírus Varicela – zoster, Epstein Barr e Parvovírus B19 (PVB 19). Este último foi encontrado no líquido sinovial de pacientes com artrite persistente e vem ganhando importância pois, alguns estudos o relatam em associações ao Lupus Eritematoso Sistêmico (LES), trombocitopenia auto-imune, esclerodermia, dermatomiosite, e outras doenças de caráter auto-imune. Dessa forma, há uma descrição na literatura de associação de psoríase com o PVB 19, e por essa razão nota-se a importância de estudá-lo e também relacioná-lo com a psoríase de forma inédita na região norte.

CAPÍTULO II- REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CONCEITOS SOBRE INFLAMAÇÃO CUTÂNEA

A pele é o maior órgão do corpo humano, responsável pelo revestimento do sistema músculo-esquelético e órgãos internos, além de ser dotado de um complexo sistema imunológico em toda a sua extensão. A função primordial desse sistema imunológico é conferir proteção contra patógenos, microorganismos e traumas externos visando a manutenção da integridade cutânea e/ou diminuição dos efeitos tissulares causados por esses agentes. Os fenômenos determinantes e indutores da resposta cutânea à infecção desencadeiam uma cascata de eventos, levando ao recrutamento de células da reposta imunológica e produção de proteínas inflamatórias no sítio do dano tecidual que se traduzem em inflamação. (MEDZHIT,2008)

A resposta inflamatória aguda é bem sucedida quando há eliminação do agente infeccioso seguido de fase de reparação e resolução mediada principalmente pelos macrófagos recrutados e os residentes nos tecidos. Entretanto, no insucesso ou falha na eliminação desses patógenos, o processo inflamatório persiste e adquire novas características. A persistência da inflamação crônica leva à angiogênese, liberação de citocinas determinando por vezes à modificação funcional e estrutural do tecido. Vale lembrar que por mecanismos diversos e ainda pouco conhecidos, a inflamação crônica pode resultar de outras causas de dano tecidual como as que podem ocorrer nas respostas auto-imunes (MEDZHITOV, 2008).

2.2 CONCEITOS SOBRE PSORÍASE e PARVOVÍRUS B19

A psoríase é uma doença hoje considerada multissistêmica com o acometimento cutâneo mais evidente, mas atinge também as articulações, chamando-se artrite psoriática ou psoríase artropática. Fases de regressão e de exacerbação podem seguir-se uma à outra, de forma que a extensão e a configuração das lesões varia de puntiforme a placas que cobrem extensas áreas do corpo.(POULALHON,2007)

A artrite psoriatica é uma artrite soronegativa encontrada em 10% a 40% dos doentes psoriáticos, geralmente afetando as articulações das mãos e pés e mais raramente tornozelos e joelhos-mono ou oligoartrite simétrica (POULALHON, 2007)..

A psoríase é uma das mais comuns doenças cutâneas, ocorre igualmente em homens e mulheres, e a idade de inicio é bimodal, isto é, um pico de incidência na segunda década de vida e outro na quinta década associando-se a antígenos de histocompatibilidade distintos (ARRUDA, 2001). A incidência da psoríase praticamente dobrou desde a década de 1970 na população adulta norte-americana. O motivo desse aumento permanece desconhecido; porém estima-se ainda que uma grande parcela da população com a doença permaneça sem diagnóstico.(POULALHON,2007)

Manifesta-se, na maioria das vezes, por placas eritemato-escamosas, bem delimitadas, ocasionalmente pruriginosas, em áreas de traumas constantes da pele como cotovelos, joelhos, região pré-tibial. O couro cabeludo e região sacra também são locais de eleição para o aparecimento de lesões. O tamanho e o número das lesões são variáveis, e toda a pele pode ser afetada. Em 50% a 80% dos casos são identificados alterações ungueais, especialmente onicólise (descolamento da unha) e depressões cupuliformes. As escamas observadas na pele de um doente psoriático se devem à renovação acelerada das células epidérmicas. Os queratinócitos se tornam hiper-proliferativos, apresentando ciclo celular mais acelerado e, consequentemente, fazendo com que o tempo de maturação destas células que, normalmente, leva 26 dias num indivíduo normal em pacientes psoriático diminui para 4 dias. Há outros estudos que mostram uma diminuição maior que 8 vezes no ciclo celular epidérmico, evidenciando um ciclo de 12 dias num

indivíduo normal e de 1 dia e meio na pele envolvida dos pacientes psoriáticos.(Christophers e Mrowietz, 2005. Fitzpatrick. Tratado de Dermatologia 5º edição)

Há vários padrões clínicos da doença, dentre eles as formas especificamente palmo plantares, gotada ou em gotas, invertida, em placas, eritrodérmica, acropustulosa e a pustulosa generalizada que confere gravidade e piora do estado geral. Todas essas formas podem vir acompanhadas de lesões de couro cabeludo e unhas. (BRAUN-FALCO,1991).

O padrão clínico mais comum de psoríase cutânea é em placas e chamada de psoríase vulgar; e apesar do tamanho variar muito, a borda em geral é circular, oval, ou policíclica, entretanto são uniformes e bem definidas. Essa lesão clássica quando submetida à curetagem metódica de Brocq, que é a raspagem da escama com a remoção da mesma, evidencia dois sinais clínicos na lesão: “o sinal da vela” que é a remoção pela curetagem das escamas branco-prateadas, revelando a estratificação das escamas , e o “sinal de Auspitz” (ou orvalho sangrante), obtido pelo aprofundamento da curetagem até as papilas dérmicas que provocam pequenos pontos hemorrágicos. Este último sinal tem valor diagnóstico, mas está ausente na psoríase invertida e pustulosa e na maioria dos casos eritrodérmicos. (Consenso Brasileiro de Psoriase,2009).

Além da forte característica clínica das lesões, a histopatologia da lesão psoriática conclui o diagnóstico. As primeiras alterações evidenciadas são a vasodilatação e o infiltrado inflamatório perivascular em faixa composto principalmente de linfócitos. Este infiltrado invade a epiderme onde surge discreta espongiose, invasão de neutrófilos e paraqueratose. Numa lesão bem definida é bem marcante na epiderme a hiperproliferação de queratinócitos com padrão de hiperplasia psoriasiforme (cristas epidérmicas alongadas), acantose, e presença de agrupamentos de neutrófilos (microabscessos de Munro). Na psoríase pustulosa principalmente,observa-se a presença de cavidades contendo neutrófilos chamadas de pústulas espongiformes de Kogoj. (MURPHY, 2007).

Na tentativa de compreender o quadro clínico, uma ferramenta de avaliação foi definida em 1978, cuja principal finalidade era identificar e inferir o grau de gravidade clínica apresentada pelo doente. Esse índice de extensão e gravidade chamado

PASI (Psoriasis Area and Severity Index) ganhou aplicação mundial após o FDA (Food and Drug Adminitration) estabelecê-lo como parâmetro de eficácia em estudos com medicamentos imunobiológico.O PASI pode variar de 0 (ausência de lesão) a 72 (quadro clínico grave) e é obtido atribuindo-se os valores 0 (sem manifestação) a 4 (gravíssimo) para os aspectos mais relevantes da psoríase: eritema (E), Infiltração (I) e descamação (D) nas quatro regiões do corpo: cabeça (C), membros superiores (MS), tronco (T) e membros inferiores (MI). Estima-se também a área (A) comprometida atribuindo-se valores: 1 (<10%), 2 (10%-29%), 3 (30% a 49%), 4 (50%-69%), 5 (70%-89%) e 6 (>90%). Considera-se que a cabeça, membros superiores, tronco e membros inferiores correspondem a aproximadamente 10%,20%,30% e 40% da superfície do corpo, respectivamente.(Consenso brasileiro de Psoríase)

O PASI então é calculado como o quadro abaixo. (SILVA, 2009).

QUADRO I - PASI (*Psoriasis Area and Severity Index*)

	ERITEMA	**INFILTRAÇÃO**	**DESCAMAÇÃO**	**SOMA**	**X FATOR**	**X ÁREA**	**TOTAL**
Cabeça	0 a 4	0 a 4	0 a 4	0 a 12	0,1	0 a 6	0 a 7,2
Tronco	0 a 4	0 a 4	0 a 4	0 a 12	0,3	0 a 6	0 a 21,6
MS	0 a 4	0 a 4	0 a 4	0 a 12	0,2	0 a 6	0 a 14,4
MI	0 a 4	0 a 4	0 a 4	0 a 12	0,4	0 a 6	0 a 28,8
							(0 a 72)

Na maioria das publicações de ensaios clínicos com fármacos imunobiológicos, considera-se quadro de psoríase como moderado a grave aqueles que apresentam PASI superior a 12. (SCHIMITT, 2005). Vale ressaltar que há críticas sobre esse mecanismo de avaliação, visto que existe diferenças entre o momento do exame, imprecisão na estimativa da área acometida, dificuldade de realização na prática clínica e principalmente a variação entre os avaliadores.

Ainda assim, diante do uso de medicamentos de alto custo, o PASI pode auxiliar a decisão de empregar esses novos fármacos e avaliar a resposta terapêutica de uma forma mais objetiva (ROMITI,2009).

O esclarecimento dos pacientes sobre a cronicidade dos sintomas e a reincidiva da doença é um aspecto importante para iniciar o tratamento. Uma grande variedade de tratamentos tópicos, sistêmicos e fototerapias podem ser indicadas de acordo com a gravidade e a extensão do quadro. O objetivo é alcançar maior tempo de remissão e controle da doença. (ROMITI, 2009)

O conceito de que o **principal** mecanismo fisiopatológico da psoríase tenha por base a epidermopoiese acelerada já não pode mais ser aceito. Portanto, por apresentar caráter auto-imune e grande polimorfismo de apresentações clínicas, sua causa e/ou agentes desencadeadores são multifatoriais, com aspectos ambientais, genéticos, alterações imunológicas e até fatores psicogênicos estão envolvidos no desenvolvimento da doença(PIETRZAK,2008)

Eventos estressores agudos são relatados pelos pacientes como agentes que pioram a doença. Num estudo com 132 pacientes psoriáticos acompanhados por 3 anos após clareamento das lesões com uso de ditranol, 39% deles referiram o aparecimento das lesões 1 mês após o estresse agudo. Esse estresse incluía morte na família, acidentes, provas estudantis e/ou admissionais e ataques sexuais. O intervalo do início do evento para o desenvolvimento da psoríase variaram de 2 dias a 1 mês. (GUDJONSSEN 2007).

A separação conjugal parece ser o acontecimento de maior risco para a psoríase segundo a *entrevista para eventos recentes* desenvolvidas por Eugene Paykel no Reino Unido. Outros eventos relevantes são a vida urbana e o aspecto econômico, pois este último é fonte de maior preocupação e interferência do doente, seja pelo custo do tratamento ou pela perda de produtividade decorrente dos afastamentos gerados pela própria doença ou pelos efeitos colaterais de determinadas terapias. (ROMITI, 2009. In. Luciane Donida Barteli Miot, Cap. VI, p. 82). Em outro e mais recente trabalho, 38 pacientes com psoríase foram divididos em 2 grupos- altamente estressados e pouco estressados, baseado em questionários específicos. Quando os dois grupos foram comparados, os pacientes altamente estressados apresentavam altos índices de PASI. Sabe-se que a psoríase é uma doença emocionalmente incapacitante, carreando uma série de dificuldades psicossociais, principalmente nos indivíduos mais afetados, portanto não é surpresa que os pacientes mais severamente afetados pela doença estejam incluídos no grupo dos mais estressados. (Gudjhonsson, 2007).

O mecanismo envolvido para esse fator atuar como agente de início ou exacerbação da doença permanece desconhecido, mas pode envolver algum mecanismo de modulação neuroendócrina das funções imunológicas. Sendo assim, para se avaliar o impacto de doenças na qualidade de vida dos pacientes, nos últimos anos, vários instrumentos foram desenvolvidos, e de aplicação mais prática, surgiram os questionários genéricos e específicos. (Gudjhonsson , 2007).

Alguns questionários foram elaborados na dermatologia e dentre eles, o DLQI *(Dermatology Life Quality Index)*, específico para doenças dermatológicas que contém dez questões que avaliam diferentes dimensões do prejuízo na qualidade de vida (Quadro II).

QUADRO II - Ítens Avaliados pelo DLQI Validado para a Língua Portuguesa.

Quanto sua pele coçou, ficou dolorida ou ardida?
Você teve vergonha ou se preocupou com a aparência da pele?
Interferiu com as compras ou atividades fora de casa?
Influenciou a escolha das roupas que vestiu?
Afetou as atividades sociais ou de lazer?
Atrapalhou a prática de esportes?
Causou problemas ou impediu de trabalhar ou ir à escola?
Causou problemas com o parceiro ou amigo próximo?
Causou dificuldades nas relações sexuais?
Deixou sua casa desarrumada, em desordem, tomando seu tempo?

Fonte: Extraído de Martins GA, Arruda L, Mugnani ASB. Validação de questionários de Avaliação de qualidade de vida em pacientes de psoríase. An Bras Dermatol. 2004;79:521-35.

Portanto, avaliar o impacto na qualidade de vida do portador de psoríase, relacionando a interferência da doença com o estilo de vida, tornou-se uma ferramenta de grande importância, que auxilia inclusive sobre a decisão de introdução de medicamentos de alto custo. (ROMITI, 2009 – In. Luciane Miot, p. 70-4).

Outros fatores que podem estar envolvido no desencadeamento da psoríase são o uso de medicamentos, de álcool e de fumo. Os medicamentos conhecidamente implicados em exacerbar os casos de psoríase são antimaláricos, beta-bloqueadores, lítio, anti-inflamatórios não hormonais, inibidores da enzima conversora de angiotensina como genfibrozil, interferons e imiquimode. O mecanismo de ação na piora das lesões permanece desconhecido, porém os interferons e o imiquimode são conhecidos estimuladores de resposta Th1. Com relação do fumo e álcool, ambos estão associados à psoríase, e dificultam a resposta terapêutica. O fumo é associado com o início de psoríase principalmente em mulheres, com risco aumentado em 2x para doença grave quando o consumo é superior a 20 cigarros ao dia. Essa associação é identificada para psoríase pustulosa (Gudjonson, 2007).

Considerando que a psoríase ocorre em indivíduos predispostos, vale ressaltar que as descobertas na área genética contribuem para o entendimento da fisiopatologia. O elemento genético para a psoríase se evidencia a partir de elevada incidência familiar com a possibilidade de nascer filhos afetados de 8,1% quando um dos pais é acometido e de 41% quando ambos o são. O grau de concordância entre gêmeos é de 70% entre monozigóticos e de 23% a 30% em dizigóticos (CHRISTOPHER and MROWIETZ, 2003).

A incidência de psoríase foi registrada em 117 gêmeos monozigóticos. Destes,65% apresentavam a doença. Essa porcentagem contrasta com os 30% de concordância de psoríase em 112 gêmeos dizigóticos, dos quais pelo menos um dos pares apresenta psoríase. Considerando esses estudos populacionais assim como os estudos de gêmeos, confirma-se que a psoríase é uma doença herdada com modelo de herança multilocular. Mais ainda, sugere que fatores ambientais tenham um papel como desencadeadores a doença. (Christophers e Mrowietz, 2005. Fitzpatrick. Tratado de Dermatologia 5º edição)

Comprovadamente existe grande associação entre o risco de desenvolvimento de psoríase e a presença do HLA-CW6, pois este foi freqüente em pacientes psoriáticos que apresentaram a doença antes dos 40 anos. Além disso, foi demonstrado que o risco relativo aumenta também pela presença de outros marcadores incluindo HLA-B13 e HLA-B17.(ROMITI,2009)

Em um estudo realizado por Elder e colaboradores com famílias de múltiplos afetados revelou quatro possíveis lócus de susceptibilidade para psoríase, os assim chamados Psors 1, 2, 3 e 4 localizados nos cromossomos 6q, 17q, 4q e 1q respectivamente (ELDER, 2001). Recentemente o PSORS 1 foi relacionado com o alelo HLACw-*0602, reforçando a hipótese da apresentação de autoantígenos na etiopatogenia da doença. (ROMITI, 2009. In. Helio Miot).

Em contrapartida, mais recentemente, outros loci de susceptibilidade de psoríase já foram demonstrados além dos primeiros existentes (Quadro3). Os achados moleculares com o HLA-CW6 mostraram ter associação à psoríase com acometimento articular e os HLA B 38, B39, e B27 estavam mais associados ao acometimento axial. (QUEIRO R, et. Al, 2006).

Dessa forma é inegável a participação genética, todavia, as lesões de psoríase necessitam de fatores do meio ambiente para surgir em indivíduos geneticamente predispostos.

QUADRO III - Loci de Susceptibilidade de Psoríase

Locus	Localização
Psors 1	... 6p21.3
Psors 2	17q24-q25
Psors 3	4q34
Psors 4	1q21
Psors 5	3q21
Psors 6	19p13
Psors 7	1p35-p34
Psors 8	16q12-q13

Fonte: Indian J. Dermatol, 2009, 54:7-12 (http://www.e-ijd.org/text.asp??2009/54/1/7/48977).

Os achados genéticos podem levar a compreensão dos achados imunológicos e estabelecer melhor a etiologia da psoríase. O que não se pode negar é que a

ocorrência de atividade imunológica desordenada na psoríase e as pesquisas nessas áreas avançam rapidamente.

Na resposta imunológica que ocorre na psoríase, os antígenos são inicialmente captados pelas células apresentadoras de antígenos (APCs). Essas APCS são extremamente importantes pois por meio da interação célula-célula apresentam os antígenos via MHC classe I ou II aos linfócitos T (CD8 e CD4, respectivamente; e natural killer-NK), e com o auxílio das moléculas co-estimulatórias (CD80, CD86, e CD40) levam esses linfócitos a proliferarem e a secretarem citocinas como IL2, IFN-γ e TNF-α (diz-se resposta Th1). Como esse padrão pode ser observado em outras dermatoses inflamatórias, no caso específico de psoríase novas descobertas tem atribuído outras funções a componentes antigos. As células dendríticas, por exemplo, foram detectadas nas lesões psoriáticas, cuja função seria o de ocasionar a ativação e a expansão clonal de células T, fazendo ligação entre a resposta imune inata e adaptativa, além de se apresentar com aumento da expressão de IFN-α. (NICKOLOFF, 2007).

Nas lesões de psoríase, a presença de mastócitos especialmente no tecido conjuntivo sub-epidérmico já é bastante conhecida. É possível que os queratinócitos, células epiteliais e fibroblastos secretem um fator cuja sigla é “SFC Kit ligand” responsável pela maturação, migração e ativação dos mastócitos. Nesse estágio inflamatório, os mastócitos secretam outras substâncias pró-inflamatórias como histamina, heparina e TNF-α, que tem um papel inicial no desencadeamento das lesões. (HARVIMA, 2008).

Como o caráter inflamatório da doença é muito extenso, há uma série de citocinas observadas na psoríase que são : IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8,IL-12, IL-15, IL-18, IL-19, IL-20, IL-23, e particularmente TNF – a (PIETRZAK, 2008).

As inúmeras citocinas liberadas atuam como mitógenos para queratinócitos, além de ativar outras citocinas como Fator de Crescimento Epitelial (EGF), com fundamental importância na hiperproliferação e hiperplasia persistente de camadas da epiderme. Recrutando neutrófilos para o interior da epiderme, a IL-8 passa a liberar mediadores inflamatórios que atuam nas células endoteliais, que por sua vez expressam mais moléculas de adesão perpetuando o processo inflamatório e

compõem o quadro de vasos neoformados observados no padrão histopatológico da lesão psoriática (TONEL, 2009).

O TNF-a é uma das principais citocinas envolvidas e vale ser destacado das demais, pois é a citocina bloqueada quando se usa os imunobiológicos (medicamentos contendo anticorpos inibidores dessa citocina) com melhora dramática do quadro cutâneo e articular. (LOWES, 2007).

Ainda que já se tenha descrito tantas citocinas, é indispensável o recente conhecimento da IL-17 descoberta em 1995 e descrita como uma glicoproteína secretada primariamente por células T ativadas. Em humanos, a formação de células Th17 totalmente funcionais depende da presença de IL-23. (BLAUVELT, 2008).

Essa IL-17 é uma das citocinas mais recentemente estudada e por essa razão vale a pena conhecê-la. Estudos de biópsia demonstraram que a expressão de IL-23 (citocina envolvida na secreção de IL-17 e IL-22 por células Th17) está aumentada nas lesões psoriática e a secreção de IL-22 por essas células foram associadas à geração de acantose, evento característico na psoríase. Além disso, outros trabalhos com modelo animal demonstrou que a aplicação intradérmica da proteína recombinante de IL-23 no dorso de camundongos produz uma inflamação crônica na pele, que compartilha várias características histopatológicas presentes na psoríase. (ROMITI, 2009. In. Gil, Benardo; Léia C. Rodrigues da Silva, Cap. II, p. 18-27).

Pode-se, então, afirmar que a psoríase é uma doença caracterizada principalmente por hiperproliferacão de queratinócitos mediada por células T mediante a secreção de citocinas inflamatórias (Pietrzak,2008).

O papel chave dessas células em psoríase foi inicialmente demonstrado em 1996, onde lesões psoriáticas foram induzidas por injeção autóloga de células T. (WRONE-SMITH, 1996). Desde então foram desenvolvidos vários estudos na determinação dos subtipos de células T e seus papéis no equilíbrio ou desregulação de algumas doenças.

Todos esses conhecimentos gerados por estudos in vivo e in vitro a respeito da imunopatogênese da psoríase nos fazem repensar sobre o fator desencadeante ou agravante da psoríase que desperte esses eventos imunológicos.

Além dos fatores ambientais apresentados, as co-morbidades encontradas na psoríase ganham maior importância na análise multifatorial que exacerba a doença (Rahat,2008).

Estudos recentes vêm mostrando que síndrome metabólica também tem prevalência aumentada nos pacientes psoriáticos. (QURESHI, 2009). Esta síndrome agrega um conjunto de fatores de risco para doença cardiovascular, que associados, apresentam um risco maior que cada um isoladamente. Os fatores encontrados são a obesidade abdominal, a dislipidemia aterogênica, a hipertensão arterial e a intolerância à glicose. A presença da síndrome aumenta o risco de morrer de doença coronariana em quase três vezes. (GISONDI, et al., 2007). Os critérios para o diagnóstico da síndrome metabólica encontram-se no quadro abaixo.

QUADRO IV- Co-morbidades na psoríase

Relacionadas com inflamação sistêmica	Obesidade, aterosclerose, síndrome metabólica, infarto do miocárdio, hipertensão arterial, *diabetes mellitus* e resistência à insulina.
Co-morbidades ou hábitos relacionados com comprometimento da qualidade de vida.	Ansiedade, depressão, idéias suicidas, tabagismo, etilismo.
Co-morbidades relacionadas ao tratamento.	Nefrotoxidade, hepatotoxicidade, câncer de pele não melanoma (pela fototerapia)

FONTE: Br J Dermatol 2008;1599 (Suppl 2): 2-9

A causa da associação da psoríase com a síndrome metabólica ainda é fonte de inúmeros estudos, porém a explicação pode estar no estado pró-inflamatório crônico encontrado tanto na psoríase como nos componentes da síndrome (ROMITI, 2009). Os mediadores inflamatórios da pele psoriática são semelhantes aos encontrados no tecido celular subcutâneo dos obesos, e dessa forma as citocinas produzidas na pele podem agir diretamente no tecido adiposo e vice-versa. Este dado é corroborado pelos elevados níveis circulantes de TNF-α, IL-2, IL-6 e proteína

C reativa, que são encontrados na psoríase,na obesidade e aterosclerose (GULLIVER, 2008).

E é nesse ínterim que cabe agora o avanço nas pesquisas quanto aos agentes causais ou desencadeadores a fim de lhes dar a devida importância para que questões como prevenção possam ser dirigidas e quem sabe efetuadas.

Um fator importante no desencadeamento de doenças auto-imunes é a presença de um agente infeccioso que pode iniciar o processo. Descrita pela primeira vez em 1916, a associação psoríase guttata e infecção de garganta por estreptococo β – hemolítico foi confirmada em diversos estudos subseqüentes. Prováveis semelhanças antigênicas entre proteínas estreptocócicas (por exemplo, a proteína M) e peptídeos de queratina poderiam explicar certos casos de psoríase pós infecciosa (VALDIMARSSON, 1995). Infecções virais também são descritas como o HIV, hepatite C, vírus Varicela – zoster, Epstein Barr e Parvovírus B19 (PVB 19). (MEHRAEIN, 2004). Este último foi encontrado no líquido sinovial de pacientes com artrite persistente e vem ganhando importância, pois alguns estudos o relatam em associações ao Lupus Eritematoso Sistêmico (LES), trombocitopenia auto-imune, esclerodermia, dermatomiosite, e outras doenças de caráter auto-imune(Meyer,2003) Há uma descrição na literatura de associação de psoríase com o PVB 19, e por essa razão notamos a importância de estudá-lo e também relacioná-lo com a psoríase (YAZICI, 2006).

O PVB 19 foi acidentalmente descoberto na Inglaterra em 1975 por Cossart ao examinar o sangue para hepatite B de vários doadores “saudáveis”. Chamado inicialmente de antígeno Aurillac (na França) e antígeno Nakagami (no Japão) porém recebeu o nome de vírus B19 porque foi na bolsa de sangue número 19, que primeiramente, o vírus foi isolado. Explica-se, então, que não existe Parvovírus B1 a B18. Nenhum efeito patogênico foi atribuído a esse vírus até 1981, quando foi descoberto como causador de crise aplástica em pacientes com anemia hemolítica crônica. Em 1985, foi identificado como agente etiológico do Eritema infeccioso (MEYER, 2003).

O PVB 19 é um vírus DNA não envelopado de cadeia simples , que seleciona alvos celulares específicos como precursores eritrocitários, causando anemia. O receptor celular para o vírus é o antígeno P (globosideo ou Gb4), o qual é expresso

não só nos precursores eritrocitários como também nos megacariócitos, células endoteliais, células placentárias, células de fígado fetal, e outras. Esses vírus possuem duas proteínas estruturais, a VP1 (83 kD) e VP2, além de uma proteína não estrutural , a NS1. A VP2 está contida dentro da VP1, e a resposta imunológica humana ao parvovírus consiste na produção de anticorpos ao VP2, inicialmente IgM e de IgG.(Meyer,2003)

A infecção é freqüente em humanos, e quando sintomática pode se apresentar como eritema infeccioso (com erupção facial bilateral avermelhada, bem simétricas e/ou erupção máculo-papular no tronco que se estende até as extremidades), crise aplástica transitória, artrite, morte fetal e anemia persistente em pacientes imunocomprometidos (VAFAIA, 2004). Já menos freqüentemente, outros sintomas podem ocorrer como rash isolados, citopenias, doença hepatobiliar, neuropatias, meningoencefalites, doença cardiovascular, doença reumática, vasculites, síndrome da fadiga crônica (CFS), e síndrome renal (KERR and MODROW, 2005).

A patogênese do vírus pode ocorrer por lise celular direta ou apoptose, citotoxidade ocasionada pela superprodução de NS1 (determinando granulocitopenia, trombocitopenia), efeitos indiretos mediados por respostas imunológicas contra NS1, indução de citocinas que estimulam as respostas inflamatórias e/ou aumento da invasividade de fibroblastos sinoviais (artrite aguda ou crônica), além de produção de complexos imunes e mimetismo antigênico (rash, atralgia, vasculite e glomerulonefrite) (SODERLUND-VENERMO, 2002).

No estudo de Meyer (2003) que avaliou a infecção por PVB19 em indivíduos sadios, mostrou que após a inoculação do vírus por via nasal, a viremia ocorreu entre 5-6 dias. Sua detecção permaneceu durante vários dias por hibridação do DNA viral e por várias semanas pela técnica de PCR. A produção de anticorpos IgM contra o vírus ocorreu após 10 a 12 dias do início da inoculação e persiste por 1-3 meses. A produção de IgG inicia poucos dias depois e persiste indefinidamente (MEYER,2003).

A infecção experimental permite a observação do curso do vírus em humanos e que se divide em duas fases. Durante a fase virêmica, alguns indivíduos podem permanecer assintomáticos, enquanto outros apresentam uma síndrome gripal de cefaléia, mal estar geral, mialgias e febre intermitente. A contagem de reticulócitos

cai para zero no pico da viremia, e retorna em poucos dias após o aparecimento de anticorpos específicos. A concentração de hemoglobina cai, e neutropenia, linfopenia e/ou trombocitopenia ocorre em alguns pacientes. A segunda fase é caracterizada por rash e dores articulares e alguns com artrite (MEYER,2003).

Na infecção natural o período de incubação é aproximadamente de 6 a 18 dias, embora possa chegar a 28 dias. Durante a fase virêmica o PVB19 é encontrado nas secreções oral e nasal, e essas pessoas podem disseminar a infecção na comunidade. Na fase de artrite, o paciente não é mais um comunicante. A prevalência de anticorpo IgG na população adulta atinge 40 a 80%, e a contaminação ocorre freqüentemente na idade escolar antes dos 5 anos, mas pode ocorrer em outras faixas etárias (MEYER,2003).

Assim como outros vírus, o PVB 19 pode induzir a produção de auto-anticorpos, porém essa produção geralmente é autolimitada e não é associada a sintomas crônicos. Os anticorpos encontrados são anticardiolipina, anti-DNAds, ANA, anti SSa/Ro e anti SSB/La, e fator reumatóide. Este vírus foi encontrado no líquido sinovial de pacientes com artrite persistente. Esses dados estimulam novas pesquisas para relacionar o PVB19 com doenças auto-imunes, como formas iniciais de Artrite Reumatóide (AR), LES, Esclerodermia, TRombocitopenia auto-imune, dermatomiosite, vasculites e também com Síndrome de Kawasaki (SOLONINKA,1989; LOUISOU, 1997; JOHNSTON, 2000; T.C. HSU, 2001; VENERMO, 2002).

Como descrito anteriormente, o PVB19 apresenta relação no desenvolvimento da artrite persistente. Sabe-se que a proteína NS1 do PVB19 causa secreção de citocinas pro inflamatórias, as quais promovem inflamação e dano celular como os vistos na artrite e outras desordens imunológicas (MITCHELL, 2002; MOFFAT, 1996) dentre elas, a psoríase. (YAZICI, 2006).

Yazici e colaboradores num estudo em 2006 sugerem que um modelo infeccioso deve ser considerado como importante na fisiopatogenia da psoríase. A investigação proposta por eles foi de analisar a presença do DNA de PVB19 no sangue de pacientes psoriáticos(n=47) em comparação com doadores saudáveis(n=20). Foi também determinada a presença de anticorpos Anti-PVB 19 IgG e IgM por técnica de ELISA. A conclusão dos autores foi o achado do DNA de

PVB 19 nos pacientes psoriáticos com alta significância em relação aos controles. Esse mesmo estudo analisou soro de pacientes infectados agudamente por PVB19 e mostrou aumento de IL 1-ß, IL-6, e IFN-g alem de TNF-a, cujos níveis permanecem altos e detectáveis por 2-37 meses de seguimento após a infecção. Por outro lado, encontraram elevadas concentrações de IL 1ß, IL-6 mRNA, e INF-g nas células mononucleares no sangue periférico durante infecção aguda por PVB19, os quais também estão aumentados na psoríase.

Dessa forma, puderam propor este vírus como um agente biológico com importância na fisiopatogenia da doença e que merecia ser mais investigado.

Com base nesses dados, verifica-se que muito há de se estudar e comprovar quanto aos efeitos ambientais na gênese de doenças auto-imunes, e a pesquisa é um campo aberto para isso.

Várias evidências indicam que a psoríase é uma doença mediada imunologicamente, entretanto, o evento molecular que promove o gatilho de estabilidade para o de ativação imunológica permanece desconhecido.

Há a necessidade de um melhor delineamento e investigação de outros agentes virais ou bacterianos que sejam capazes de desenvolver a doença nesses indivíduos geneticamente predispostos.

O mérito desta pesquisa então, se baseia no estudo do PVB 19,visto que esse vírus já foi relacionado com surgimento de doenças auto-imunes, dentre elas, a psoríase. Esta por sua vez, é uma doença dermatológica em ascensão, e a tentativa de estabelecer uma relação de causa-efeito, possibilitaria uma descoberta de como um fator ambiental atua em doença geneticamente predisposta.

E como se trata de doença inflamatória cutânea, cujo padrão de inflamação é de especial interesse, acha-se necessário a demonstração das principais citocinas inflamatórias que nela ocorrem se comparadas ao grupo controle, e principalmente, se há divergências quanto a positividade ao vírus dependendo da forma clínica da lesão, ou de acordo com os padrões inflamatórios encontrados.

CAPÍTULO III – OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença do DNA do Parvovírus B19 em amostras de pele de pacientes com Psoríase e com Eczema e sua correlação com a resposta imunológica nas lesões.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a presença do DNA do PVB 19 por PCR em biópsias de pele psoriática e na pele de pacientes com eczema.

- Avaliar por imunohistoquímica a imunomarcação de TNF-α, IL-2, IL-4, IFN-g na tentativa de estudar diferenças no perfil dessas citocinas diante da presença de PVB 19 nas biópsias de pele psoriática e na pele com eczema como controle.

- Correlacionar a presença do PVB e os achados imunológicos nos dois grupos estudados.

- Correlacionar a presença ou ausência do PVB 19 nas diversas formas clínicas de psoríase.

CAPÍTULO IV – CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 CARACTERÍSTICA DO ESTUDO:

Esta pesquisa tem como proposta a metodologia que contempla o estudo do tipo caso-controle, onde a amostra de casos consiste de 20 pacientes portadores de Psoríase e o grupo controle é constituído por 20 pacientes portadores de eczema. Será utilizado o grupo com eczema por apresentar características semelhantes ao do grupo estudado com relação a presença de doença inflamatória cutânea.

4.2. POPULAÇÃO ALVO:

4.2.1 Pacientes e amostras de pele

Os pacientes foram provenientes da região metropolitana de Belém e cidades do interior do Pará, atendidos pelo autor da pesquisa em consultório particular. As amostras foram de biópsia de pele emblocadas em parafina, uma vez coletadas para a realização do diagnóstico da doença. Os blocos foram recolhidos dos vários laboratórios, onde foram realizados o exame histopatológico, após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelo paciente participante

Foram avaliados 20 pacientes com diagnóstico clínico-histológico de psoríase, classificadas em psoríase em placas ou vulgar (estacionária ou disseminada) e acral. A seleção desses pacientes foi indiferente quanto ao sexo, ou tempo de doença, todos maiores de 18 anos. Foram incluídos apenas pacientes com evidente comprometimento cutâneo, caracterizado por lesões escamosas típicas da doença, de vários locais do corpo como cotovelos, região lombar, tornozelos, dorso das mãos.

Ficam excluídos os pacientes com psoríase em período de tratamento (quaisquer que seja), e portadores de artrite psoriática ou história de qualquer artrite anterior. Os pacientes assinaram termo de consentimento informado livre e esclarecido (anexo 2) como disposto na resolução CNS 196/96 e na resolução CEP 016/2000, concordando em fornecer material biológico para o estudo.

Os laboratórios onde estão armazenadas as amostras são:

1. Laboratório de Histopatologia do Hospital Adventista de Belém:

O hospital Adventista de Belém é um hospital privado com atendimento em diversas áreas clínicas e cirúrgicas. Sua maior demanda de pacientes são oriundos de Planos de Saúde com a procura de forma espontânea (não referenciada). Possui laboratório de análises clínicas e Laboratório de Histopatologia, onde neste último conta-se com acervo amplo de peças histológicas obtidas por meio cirúrgico de várias especialidades médicas, dentre elas, a dermatologia.

Através do consentimento do seu diretor clínico (anexo 1) foram obtidas as peças histológicas de tecido cutâneo emblocadas em parafina que constavam no banco de dados hospitalar, tanto para psoríase quanto para eczema.

O período de retirada e armazenamento que foi concedido por parte do Hospital é por 3 anos. Os laboratórios onde estavam armazenadas as amostras são o Laboratório de Histopatologia do Hospital Adventista de Belém, o Laboratório Paulo Azevedo e o Departamento de Histopatologia do consultório do Dr. Mário Miranda. A obtenção do material foi após a assinatura pelo pacientes do termo de consentimento informado livre e esclarecido (anexo 2) como disposto na resolução CNS 196/96 e na resolução CEP 016/2000, concordando em fornecer material biológico para o estudo e o de acordo dos responsáveis dos laboratórios envolvidos.

4.2.2 Definição de Caso-controle

Foram selecionados 20 pacientes com diagnóstico clinico de eczema cujo diagnóstico clínico foi de eczema atópico e de contato para observação similar aos efetuados em psoríase, indicando parâmetro paralelo das alterações ocorridas em outra desordem inflamatória cutânea. Esses pacientes foram alocados exclusivamente de Hospital privado (Hospital Adventista de Belém). A pesquisa poderia ser interrompida pelos pacientes que integraram a seleção a qualquer momento e em qualquer tempo.

4.3 DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS

4.3.1 PCR para Detecção de PVB 19

A extração de DNA foi feita a partir de amostras teciduais parafinadas. Inicialmente, com o auxílio de uma navalha para micrótomo, 30 a 40mg de material foram retiradas e desparafinizados e hidratados para posterior digestão do tecido por proteína K. Após a digestão do tecido, o DNA foi extraído utilizando o kit QIAamp DNA FFPE Tissue kit (Qiagen). Em seguida, a amostra de DNA extraído foi amplificada utilizando o kit repli G (Qiagen).

A reação de PCR foi realizada utilizando 100ng de DNA em 20µL de tampão composta por por 20 mM Tris-HCL (pH 8.4 ou 8.6), 0,25-1.5mM MgCl2, 50 mM KCl, 0.02mM dNTP, 200 nM de oligos específicos para detecção de PVB19 e 0,25 unidades de Taq polimerase. A reação foi de um ciclo de desnaturação inicial de 94ºC por 5 minutos, e 35 ciclos da amplificação de PCR foram executados. Cada ciclo consistiu em 94ºC por 30 segundos, 52ºC por 30 segundos e 72ºC por 30 segundos. A extensão final ocorreu à 72ºC por 5 minutos. Para todas as amostras, foi realizada uma PCR para controle de presença de DNA com o gene constitutivo □-Actina nas mesmas condições acima descritas.

Oligos Iniciadores Utilizados:

PVB19

B19 FWD: 5’- CGC CTG GAA CAC TGA AAC CC- 3’

B19 REV: 5’- GAA ACT GGT CTG CCA AAG GT- 3’

β-Actina

F: 5´ TCGGAGTCAACGGATTTGG 3´

R: 5´GATGGCAACAATATCCACTTTACCA 3´

4.3.2 Imunohistoquímica

Inicialmente foram realizados cortes histológicos em lâminas silanizadas das biópsias. Em seguida os cortes foram desparafinizados e foi realizada a recuperação antigênica. O método utilizado para realizar esta recuperação foi de acordo com a necessidade do antígeno a ser pesquisado. O bloqueio de peroxidase endógena foi efetuado em câmara escura com quatro incubações em água oxigenada 3% por 10 minutos cada e, em seguida, os preparados submetidos novamente em água corrente e água destilada por 5 minutos cada, sendo colocados posteriormente em tampão PBS pH 7,4.

Na etapa seguinte executou-se a incubação das amostras com os anticorpos primários, diluídos em solução 1% de albumina bovina fração V acrescida de azida sódica 0,1% em PBS pH 7,4,“overnight” a 4ºC. Após três lavagens com tampão PBS pH 7,4 por cinco minutos cada, as próximas etapas foram realizadas utilizando o reagente LSAB (Dako) de acordo com o fabricante. Resumidamente, as amostras foram incubadas com o anticorpo secundário (biotinylated link) por 30 minutos e lavadas novamente três vezes com tampão PBS pH 7,4 por cinco minutos cada. Depois, foram incubadas com estreptavidina-peroxidase por 30 minutos. Após nova lavagem em tampão PBS pH 7,4, a reação foi revelada com solução cromógena de diaminobenzidina (3,3’- diaminobenzidine) 0,03% acrescida de 1,2 ml de água oxigenada 3%. Os preparados assim processados submetidos em água corrente por 10 minutos, contra-corados com Hematoxilina de Harris por 20 segundos, lavados em água corrente, desidratados em etanol e diafanizados em xilol. A montagem das lâminas foi feita com resina Permount. O painel de anticorpos primários utilizados foram anti-IFN-g, anti-TNF-α, anti-IL-2, anti-IL-4.

4.4 DADOS COLETADOS

Foram coletados de todos os casos e controles com informações preenchidas em ficha através de entrevista obtida no momento da consulta do paciente no consultório e realizada pelo pesquisador. A saber: data de Nascimento, nível social, tempo de aparecimento da doença, momento (data) de biópsia, história familiar de

doença semelhante, principal sintoma, forma clínica, doenças ou co-morbidades associadas. Em relação às co-morbidades associadas, vale ressaltar que estes dados foram coletados do prontuário do paciente.

Foi de responsabilidade do pesquisador a coleta das amostras e a execução das técnicas apresentadas em local de infra-estrutura já citadas.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na distribuição dos grupos de acordo com sua classificação clínica e sexo, foi realizado o Teste do Qui-quadrado de aderência. O teste exato de Fisher foi realizado na maioria das correlações. O Teste de Kruskal-Wallis e o Teste de Mann-Whitney foi utilizado na correlação das citocinas e o grupo psoríase e eczema, respectivamente.

4.6 ASPECTOS ÉTICOS

Considerando as diretrizes e normas reguladoras contidas na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, que trata das pesquisas envolvendo seres humanos, informamos que o presente estudo foi submetido ao parecer do Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Pará do Núcleo de Medicina Tropical com o protocolo nº 018/2010, manifestando-se com aprovação pelo relator no dia 31 de março de 2010.

CAPÍTULO V - RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES:

Os pacientes deste estudo são provenientes de consultório particular cujas amostras obtidas foram de laboratórios particulares. Ao todo, coletaram-se amostras de 20 pacientes portadores de psoríase e de 20 pacientes portadores de lesão eczematosa de contato ou atópica, totalizando 40 amostras.

As variáveis sóciodemográficas entre os dois grupos estudados se apresentaram de forma semelhante (tabela 1). Ressalta-se um maior número de casos de pacientes psoriáticos acima de 50 anos.

Tabela 1 – Variáveis sociodemográficas x Condição Clínica

Variáveis	Grupo Psoríase						Grupo Eczema					
	Geral		Masculino		Feminino		Geral		Masculino		Feminino	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Faixa Etária												
20 a 39	7	35%	5	50%	2	20%	7	35%	1	14%	6	46%
40 a 49	5	25%	3	30%	2	20%	3	15%	1	14%	2	15%
50 ou mais	8	40%	2	20%	6	60%	10	50%	5	71%	5	38%
Raça												
Branca	7	35%	3	30%	4	40%	9	45%	5	71%	4	31%
Parda	11	55%	6	60%	5	50%	7	35%	1	14%	6	46%
Negra	2	10%	1	10%	1	10%	3	15%	1	14%	2	15%
Amarela	-	-	-	-	-	-	1	5%	-	-	1	8%
Condição social												
Baixa	6	30%	6	60%	-	-	7	35%	-	-	7	54%
Média	11	55%	2	20%	9	90%	7	35%	4	57%	3	23%
Alta	3	15%	2	20%	1	10%	6	30%	3	43%	3	23%
Total	20	100%	10	100%	10	100%	20	100%	7	100%	13	100%

(-) Valore numérico igual a zero não resultante de arredondamento.

Os pacientes psoriáticos apresentaram diagnóstico de psoríase vulgar estacionária (13 pacientes), acral (4 pacientes) e (3 pacientes) e vulgar disseminada. As características clínicas estão descritas na tabela 2. Os pacientes com diagnósticos para eczema apresentaram diagnóstico de eczema atópico (8 pacientes) e eczema de contato (11 pacientes). Não apresentaram co-morbidades influenciadores da doença, como pode ser visto na tabela 3.

Tabela 2. Painel de caracterização clínica dos pacientes psoriáticos

Pacientes	Sexo	Diagnostico	Idade	Tempo de aparec	Área de acometimento	Class.	Hist Fam	Cond. Social	Co-morbidades
1. LCB	Feminino	Psoriase	56	3 anos	Dorso de mão/pé	Vulgar	Não	Média	NDN
2.LTSL	Feminino	Psoriase	22	9 anos	Cot/joe/tron/c cabelud/	Vulgar	Não	Média	NDN
3.ALF	Feminino	Psoriase	26	3 anos	Pernas, braços, tronco	Vulgar	Não	Média	Diabetes/obesid
4. WLH	Masculino	Psoriase	50	4 anos	Cotve/pernas	Vulgar	Sim	Alta	Obesid/depress
5. JRD	Feminino	Psoriase	78	4 anos	Pernas	Vulgar	Não	Média	NDN
6. VSNP	Feminino	Psoriase	48	4 anos	Cotovelo	Vulgar	Não	Média	NDN
7. LMNO	Feminino	Psoriase	54	10 anos	Dorso dos pés/mãos	Acral	Não	Média	Depressão
8.SAS	Masculino	Psoríase	23	6 anos	Cotovelos	Vulgar	Sim	Média	Depressão
10.FMS	Masculino	Psoríase	42	9 anos	Cotovelos/pés	Vulgar	Não	Baixa	Bipolar
11. ILML	Feminino	Psoriase	57	1 ano	Cotovelos/ maleolo	Vulgar	Não	Média	Obesidade
12.VM	Masculino	Psoriase	38	5 anos	Dorso das mãos	Acral	Não	Alta	Obesidade
13. ER	Masculino	Psoriase	44	1 ano	Dorso das mãos	Acral	Não	Baixa	NDN
14.AX	Masculino	Psoriase	56	1 ano	Cotovelo	Vulgar	Não	Baixa	NDN
15.DBL	Feminino	Psoriase	64	8 anos	Pernas e pé	Vulgar	Não	Média	Obesid/trigl/ Diabetes
16. MG	Masculino	Psoriase	45	5 anos	Dorso das mãos	Acral	Não	Baixa	NDN
17.GJT	Masculino	Psoriase	46	2anos	Pernas,cotov Pés	Vulgar	Não	Média	Obesid
18.FA	Masculino	Psoriase	34	10anos	Corpo disseminadas	Vulgar	Não	Baixa	Bipolar/ Ex obeso
19. ACPJ	Masculino	Psoriase	34	9 anos	Corpo disseminadas	Vulgar	sim	Baixa	NDN
20.DSR	Feminino	Psoriase	59	6anos	Corpo disseminadas	Vulga	Sim	Alta	Obesidade /Depressão

Tabela 3. Painel de caracterização clínica dos pacientes com eczema

Pacientes	SEXO	Diagnostico Histologico	Idade (anos)	Tempo De aparec	Área de Acometimento	Class.	Hist Fam	Hist pessoal
1.JLDF	Masculino	Dermatite Espongiótica	50	2 meses	Pernas	Eczema de contato	Não	Ndn
2. MCCS	Feminino	Dermatite espongiótica	23	2 anos	Coxas	Eczema atópico	Sim	Hipotiroidismo induzido
3. LL	Feminino	Dermatite espongiótica	28	10	Braços	Eczema atópico	Sim	Atopia
4.JNMM	Feminino	Dermatite espongiótica	55	3 meses	Mamilos	Eczema de contato	Hist de atopia	Infecção urinaria
5. LRC	Feminino	Dermatite espongiótica	28	3 meses	Mamilos	Eczema de contato	Hist de atopia	Mamoplastia hist de atopia
6.TJC	Feminino	Dermatite espongiotica	67	6 anos	Mãos e pés	Eczema de contato	Hist de atopia	Hipercolesterol, Hipertriglic
7.AT	Masculino	Dermatite espongiotica	53	1 ano e meio	Pernas	Eczema atópico	Não	Esteatose, Hipertriglic, uso de antidepressi
8. CIN	Masculino	Dermatite espongiotica	54	5 anos	Braços/coxas	Eczema atópico	Não	Suspeita de doença linfoproliferativa
9. CO	Masculino	Dermatite espongiotica	42	15 dias	Pernas	Eczema de contato	Não	Hist pessoal de atopia
10.RMO	Feminino	Dermatite espongiotia	53	3 meses	Tronco e braços	Eczema atopico	Sim	Hist pessoal de atopia
11. CAHD	Feminino	Dermatite espongiotica	60	4 meses	Antebraços	Eczema atópico	Não	Tabagista/ Sobrepeso
12.FFR	Masculino	Dermatite espongiotica	68	1 ano	Pernas	Eczema de contato	Não	Ca de pele varias Xs
13.MC	Feminino	Dermatite espongiotica	38	10 anos	Braços	Eczema atopico	Sim	Sobrepeso
14.G	Feminino	Dermatite espongiotica	45	2 anos	Braços	Eczema atopico	Sim	Obesidade

15.BCS	Feminino	Dermatite espongiotica	29	20 dias	Quadril	Eczema de contato	Não	NDN
16.M	Feminino	Dermatite espogiotica	36	1 mes	Braços	Eczema de contato	Não	NDN
17. AMS	Masculino	Dermatite espongiotica	53	20 anos	Braços	Eczema atópico	Sim	Asma
18.DBP	Feminino	Dermatite espongiotica	50	5 anos	Palmo plantar	Eczema de contato	Não	Patch teste postitivo
19. TPP	Masculino	Dermatite spongiotica	25	1 mes	Palmo plantar	Eczema de contato	Não	Infecção urinaria
20.CAS	Feminino	Dermatite espongiotica	42	2 meses	Palmar	Eczema de contato	Não	Histerectomia

A distribuição dos tipos clínicos foi avaliada neste estudo e pode-se verificar que, como esperado, a psoriase vulgar em placas foi mais freqüente nos dois sexos (tabela 4). Em relação ao eczema, a distribuição das formas clínicas atópico e de contato, apresentaram-se com mesma freqüência (tabela 4)

Tabela 4 – Distribuição dos grupos do estudo de acordo com sua classificação clínica, segundo sexo. Belém – Pará- 2010.

Classificação	**Grupo Psoríase**						
	Geral			**Masculino**		**Feminino**	
	n	**%**	**p-valor**	**n**	**%**	**n**	**%**
Vulgar em placas	13	65	0,0106*	5	50	8	80
Vulgar disseminado	3	15		2	20	1	10
Acral	4	20		3	30	1	10
	Grupo Eczema						
	Geral			**Masculino**		**Feminino**	
	n	**%**	**p-valor**	**n**	**%**	**n**	**%**
Eczema Atópico	9	45	0,0863	3	30	6	60
Eczema de Contato	9	45		4	40	5	50
Eczema Desidrótico	2	10		-	-	2	20

* Diferença estatisticamente significante (teste do Qui-quadrado de Aderência, $p \leq 0,05$.
(-) Valor numérico igual a zero não resultante de arredondamento.

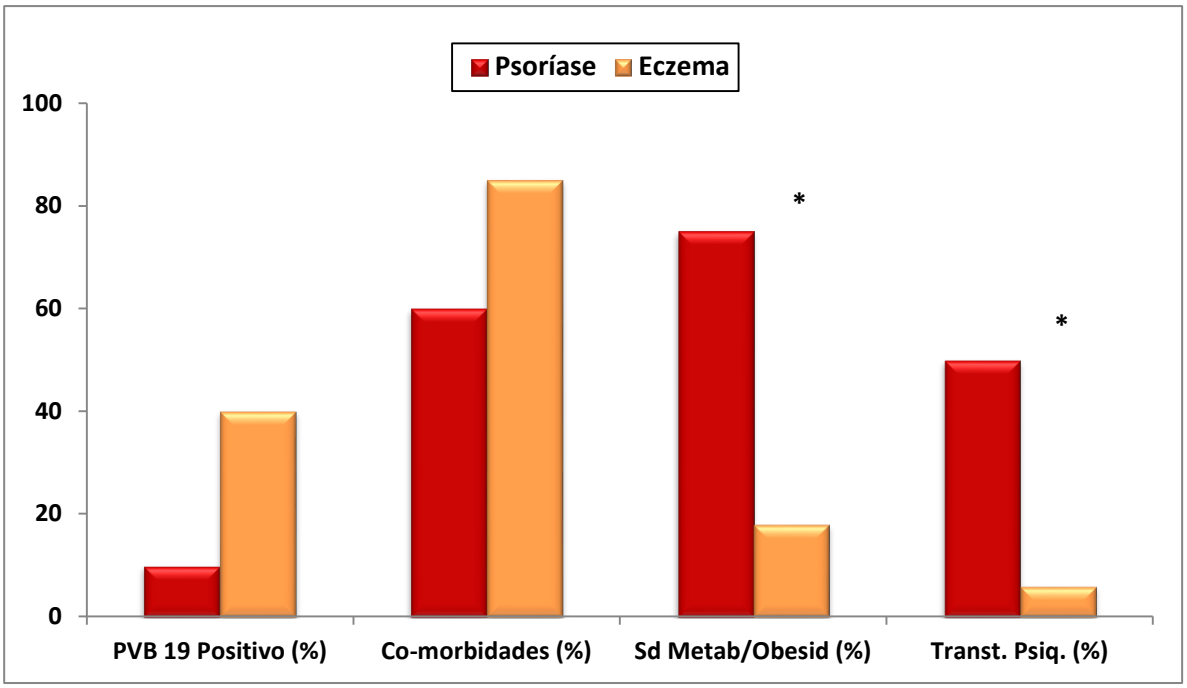
Na análise das co-morbidades mostradas na figura A, pode-se verificar que no eczema houve maior ocorrência, entretanto, elas não são fatores relacionados à doença. Porém, em relação aos pacientes psoriáticos, as co-morbidades presentes, como obesidade, dislipidemia e diabetes, sabidamente freqüentes nesses pacientes, se apresentaram na maior parte deles com OR= 14 e p= 0,0068 (tabela 4). Na amostra estudada outro fato importante que chamou a atenção é a alta prevalência de transtorno psiquiátrico na psoríase (gráfico 1), apresentando OR= 16, com p= 0,0218 (tabela). Isso não está relacionado ao desencadeamento da doença, porém, é um fator também freqüente nos pacientes psoriáticos (tabela 5).

Tabela 5– Associação entre Co-morbidades X Condição Clínica.

Variáveis	**Psoríase**		**Eczema**		**OR**	**p-valor***
	n	**%**	**n**	**%**		
Relato de co-morbidades em geral						
Sim	12	60	17	85	0,26	0,1567
Não	8	40	3	15		
Sd Metabolica/Obesidade						
Sim	9	75	3	18	14,0	0,0068*
Não	3	25	14	82		
Transtornos psiquiátricos						
Sim	6	50	1	6	16,0	0,0218*
Não	6	50	16	94		

[1] OR = *Odds Ratio* (razão de chances).

*Associação estatisticamente significante (teste exato de Fisher, $p \leq 0,05$).



* Associação estatisticamente significante (teste exato de Fisher, $p \leq 0,05$).

Gráfico 1 – Associação entre PVB 19, co-morbidades gerais, síndrome metabólica, obesidade e transtornos psiquiátricos a ocorrência de Psoríase e Eczema. Belém – PA – 2010.

5.2. PCR PARA DETECÇÃO DE DNA DO PARVOVÍRUS B19

A técnica de pesquisa do PVB 19 foi realizada com o kit QIAamp DNA FFPE Tissue kit (Qiagen). Em seguida, a amostra de DNA extraído foi amplificado utilizando o kit repli G (Qiagem).

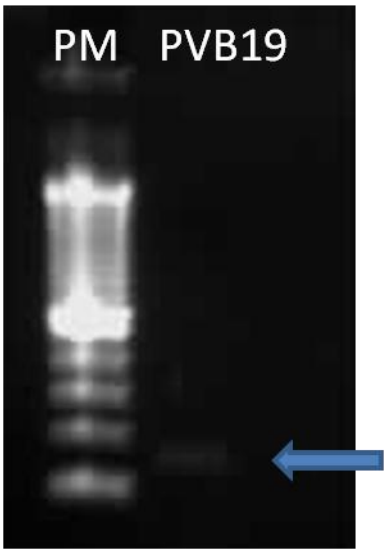


Figura 1: Gel de agarose 1% para PVB19, mostrando banda de 146 pb, correspondendo a banda esperada pelo par de oligonucleotídeos iniciadores.

A análise da presença do DNA de PVB19 mostrou que dos vinte pacientes psoriáticos, dois apresentaram positividade para PVB19 (10%), enquanto oito pacientes, dos vinte de eczema, apresentaram positividade (40%) (Gráfico 1, tabela 5).

A análise estatística mostrou que pacientes que desenvolveram eczema possuem maior chance de ter entrado em contato com o PVB19 em comparação aos pacientes psoriáticos (OR=0,2). Entretanto, devido a pequena amostra, não houve significância estatística para isso (p=0,0648).

Tabela 5 – Associação PVB 19 x Condição Clínica

PVB 19	Psoríase		Eczema		OR[1]	p-valor*
	n	%	n	%		
Positivo	2	10	8	40	0,2	0,0648
Negativo	18	90	12	60		

[1] OR = *Odds Ratio* (razão de chances).
*teste exato de Fisher.

A tabela 6 mostra a distribuição da infecção por PVB19 nos diferentes tipos clínicos dos dois grupos estudados.

Tabela 6 – PVB 19 positivo x Classificação de Psoríase e Eczema

Grupo Psoríase			Grupo Eczema		
Classificação	PVB		Classificação	PVB	
	n	%		n	%
Vulgar em placas	1	50	Eczema Atópico	3	38
Vulgar disseminado	1	50	Eczema de Contato	4	50
Acral	-	-	Eczema Desidrótico	1	13

(-) Valor numérico igual a zero não resultante de arredondamento.

5.3 IMUNOMARCAÇÃO PARA IL-2, IL-4, IFN-γ, TNF-α

A análise imunoistoquímica avaliou a expressão das citocinas IL-2, IL-4, IFN-γ e TNF-α nas lesões de pele dos pacientes psoriáticos (Figuras 2) e pacientes com eczema (Figura 3).

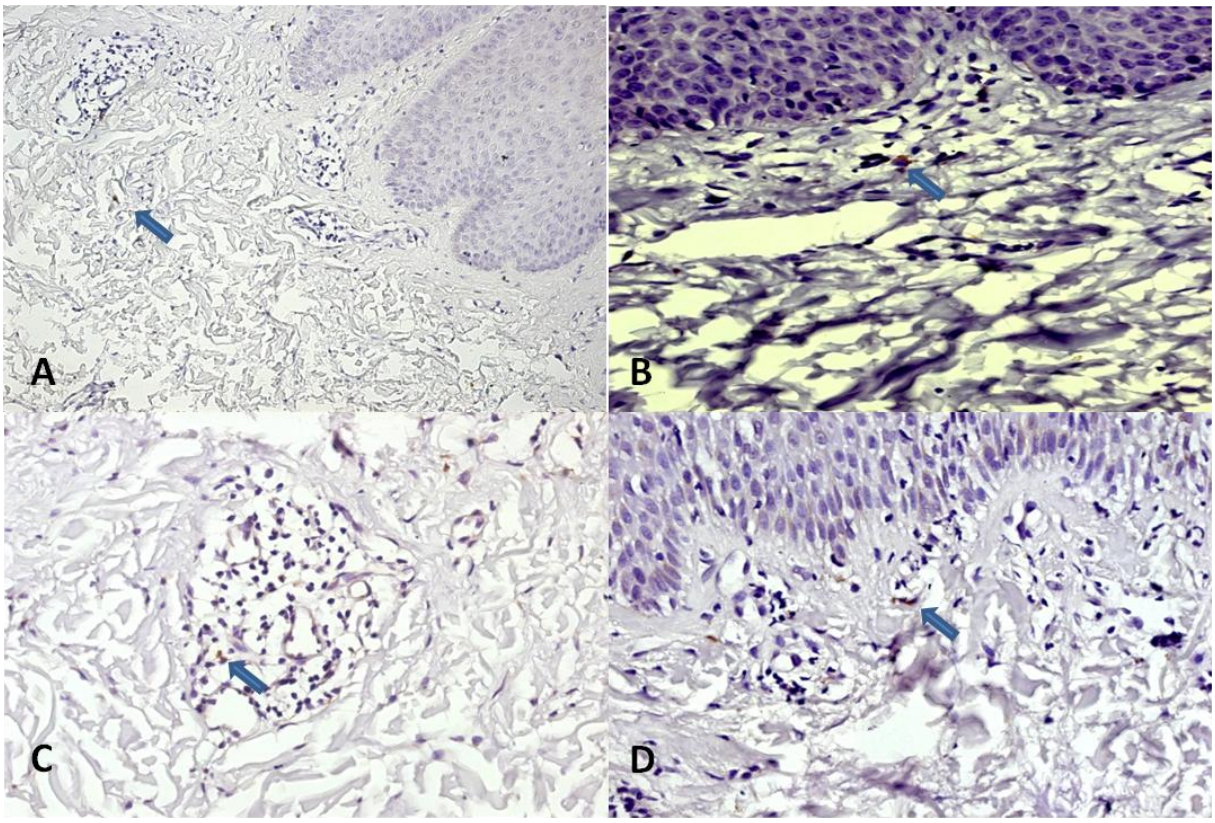


Figura 2. Imunoistoquímica de lesão de pele de pacientes psoriáticos para citocinas IL-2, A; IFN-γ, B; TNF-α, C; IL-4, D. As setas azuis indicam a marcação. Aumento de 400X.

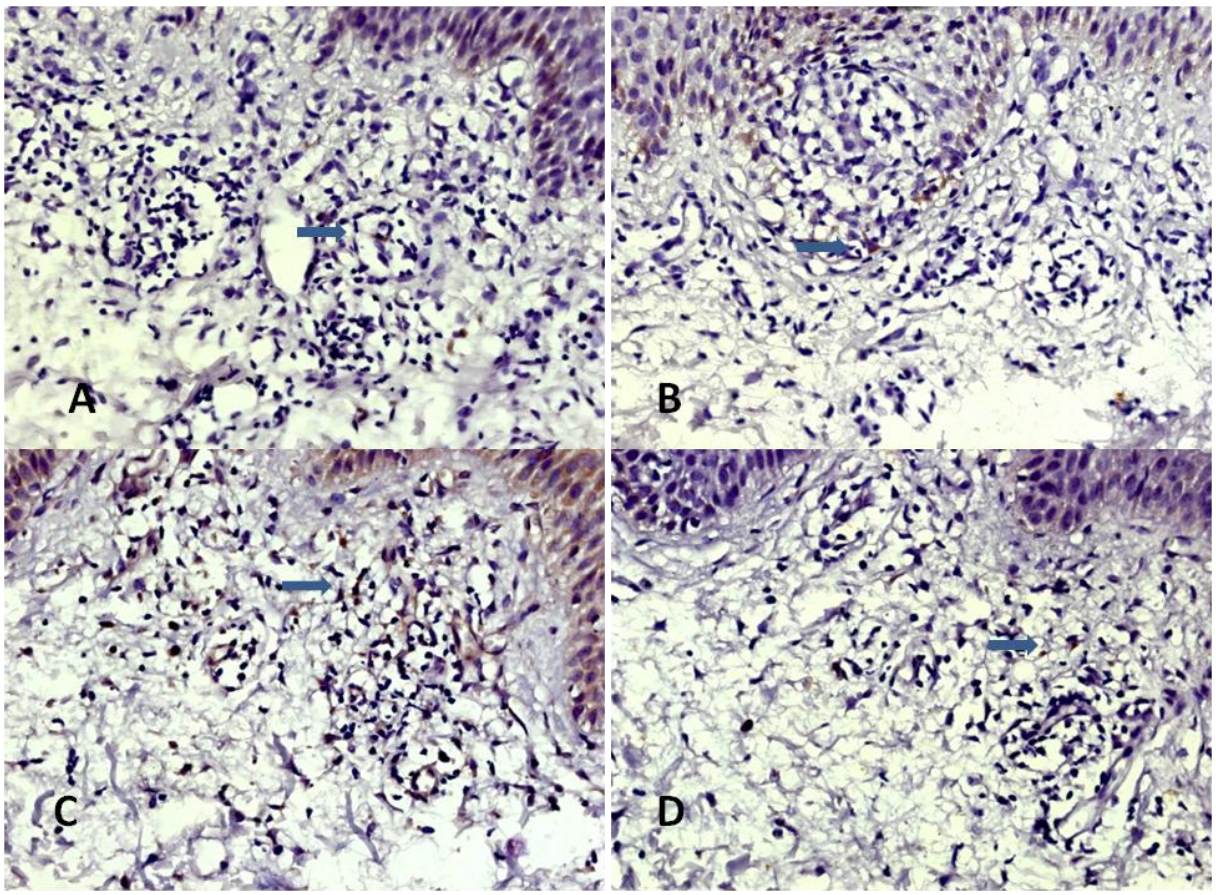


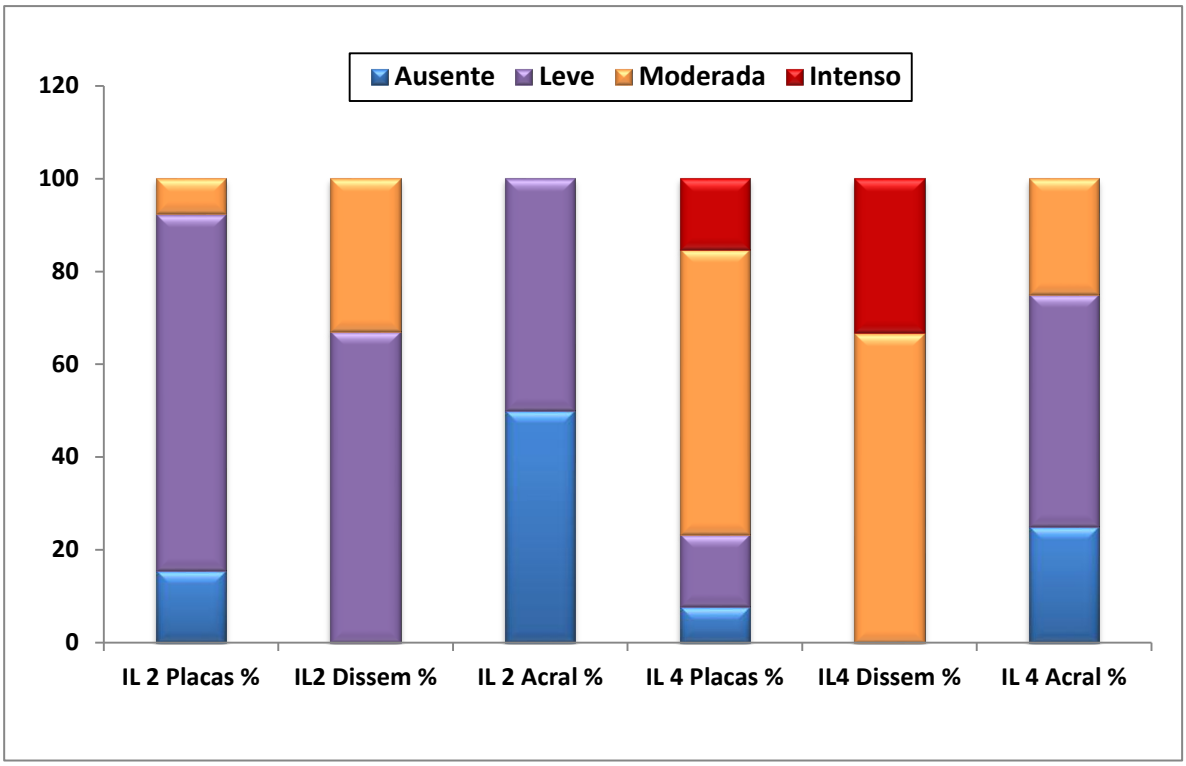
Figura 3. Imunoistiquímica de lesão de pele de pacientes de eczema para citocinas IL-2, A; IFN-γ, B; TNF-α, C; IL-4, D. As setas azuis indicam a marcação. Aumento de 400X.

A comparação entre as diferentes formas clínicas dos pacientes psoriáticos não apresentou diferenças estatisticamente significantes com relação à expressão das citocinas estudadas (tabela 7), que pode ser melhor vista nas figuras 2B e 2C. O mesmo resultado foi obtido com os pacientes de eczema (tabela 8, figuras 3D e 3E)

Tabela 7 – Perfil de marcação tecidual pelas citocinas IL2, IL4, IFN e TNF entre os indivíduos do grupo Psoríase de acordo com a classificação clínica. Belém – PA – 2010.

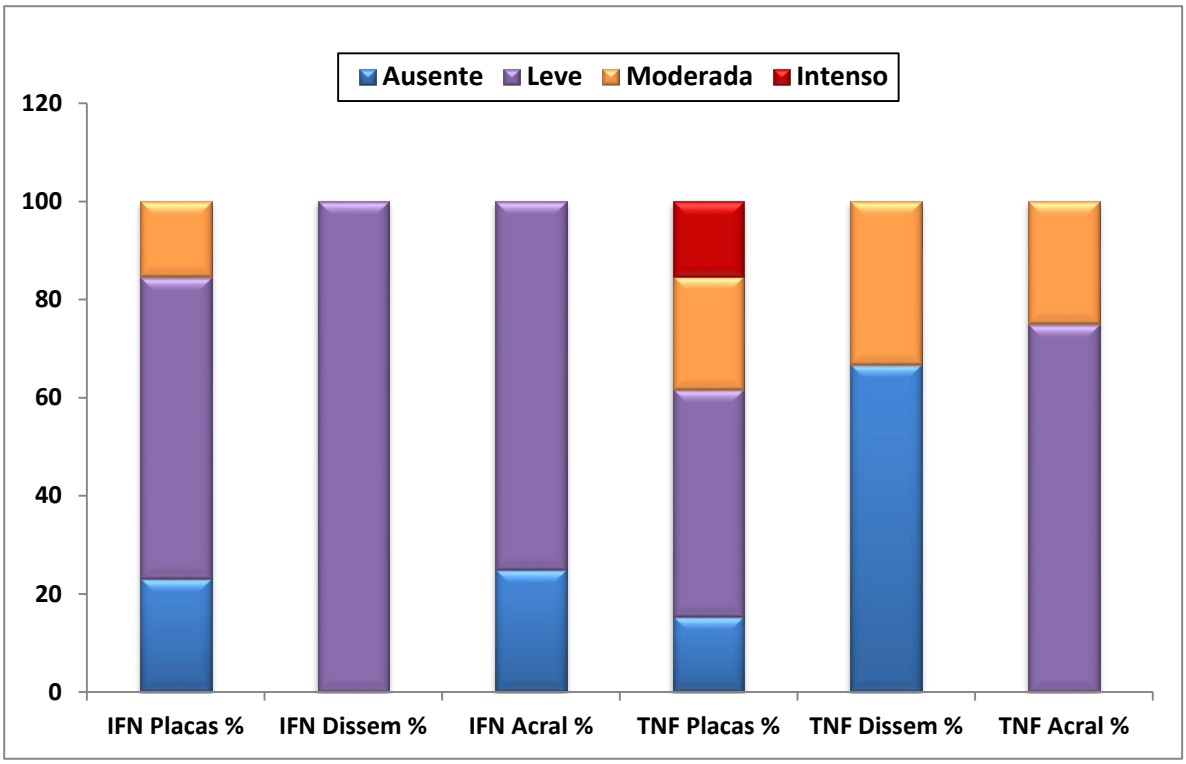
Marcação	Vulgar em placas		Vulgar disseminado		Acral		p-valor*
	n	%	n	%	n	%	
IL 2							
Ausente	2	15,4	-	-	2	50,0	
Leve	10	76,9	2	67,0	2	50,0	0,1413
Moderada	1	7,7	1	33,0	-	-	
IL 4							
Ausente	1	7,7	-	-	1	25,0	
Leve	2	15,4	-	-	2	50,0	0,0823
Moderada	8	61,5	2	66,7	1	25,0	
Intenso	2	15,4	1	33,3	-	-	
IFN							
Ausente	3	23,1	-	-	1	25,0	
Leve	8	61,5	3	100,0	3	75,0	0,8124
Moderada	2	15,4	-	-	-	-	
TNF							
Ausente	2	15,4	2	66,7	-	-	
Leve	6	46,2	-	-	3	75,0	0,4955
Moderada	3	23,1	1	33,3	1	25,0	
Intenso	2	15,4	-	-	-	-	

(-) Valor numérico igual a zero não resultante de arredondamento.
* Teste de *Kruskal - Wallis* ($p > 0,05$)



Placas: Psoríase Vulgar em placas; **Dissem**:Psoríase Vulgar disseminada

Gráfico 2 – Caracterização da marcação tecidual pelas citocinas IL 2 e IL 4 de acordo com a classificação clínica das amostras do grupo Psoríase. Belém – PA – 2010.



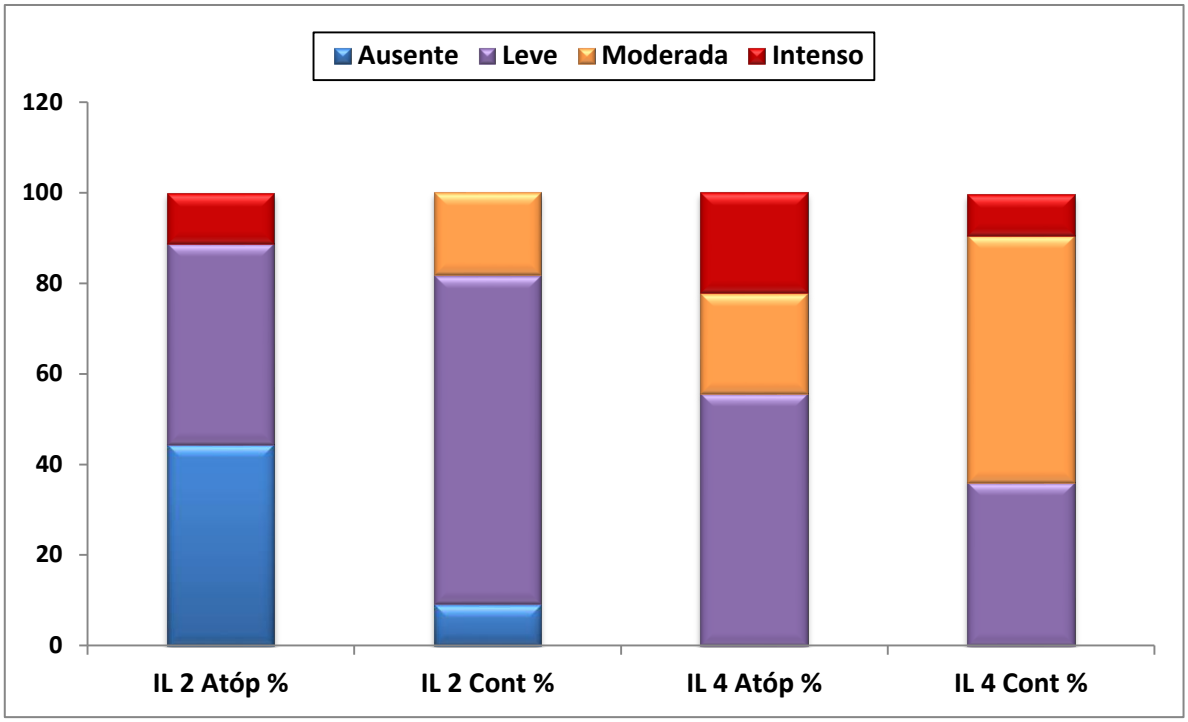
Placas: Vulgar em placas, **Dissem**: Vulgar disseminada

Gráfico 3 – Caracterização da marcação tecidual pelas citocinas IFN e TNF de acordo com a classificação clínica das amostras do grupo Psoríase. Belém – PA – 2010.

Tabela 8 – Perfil de marcação tecidual pelas citocinas IL2, IL4, IFN e TNF entre os indivíduos do grupo Eczema de acordo com a classificação clínica. Belém – PA – 2010.

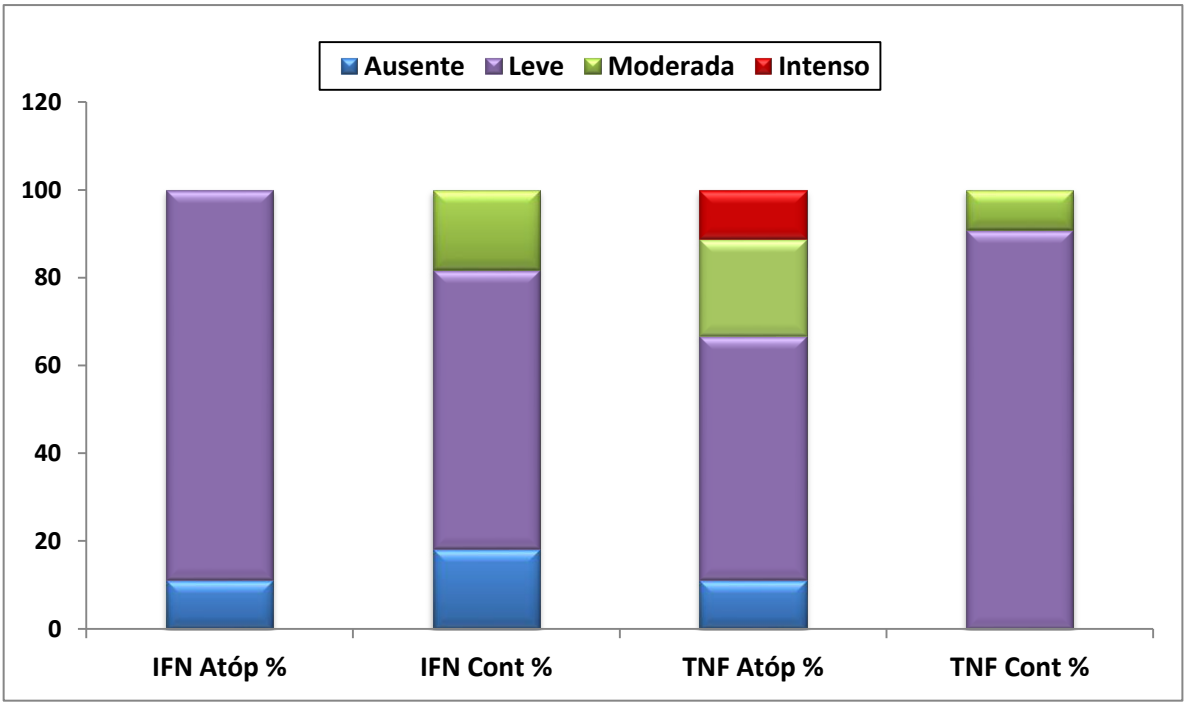
Marcação	Atópico		Contato		p-valor*
	n	%	n	%	
IL 2					
Ausente	4	44,4	1	9,1	
Leve	4	44,4	8	72,7	0,2100
Moderada	-	-	2	18,2	
Intenso	1	11,1	-	-	
IL 4					
Leve	5	55,6	4	36,4	
Moderada	2	22,2	6	54,5	0,7324
Intenso	2	22,2	1	9,1	
IFN					
Ausente	1	11,1	2	18,2	
Leve	8	88,9	7	63,6	0,7324
Moderada	-	-	2	18,2	
TNF					
Ausente	1	11,1	-	-	
Leve	5	55,6	10	90,9	0,4474
Moderada	2	22,2	1	9,1	
Intenso	1	11,1	-	-	

(-) Valor numérico igual a zero não resultante de arredondamento.
* Teste de *Mann – Whitney* ($p > 0,05$)



Atóp: Eczema Atópico; **Cont**: Eczema de Contato

Gráfico 4 – Caracterização da marcação tecidual pelas citocinas IL2 e IL 4 de acordo com a classificação clínica das amostras do grupo Eczema. Belém – PA – 2010.



Atóp: Eczema Atópico; **Cont**: Eczema de Contato

Gráfico 5 – Caracterização da marcação tecidual pelas citocinas IFN e TNF de acordo com a classificação clínica das amostras do grupo Eczema. Belém – PA – 2010.

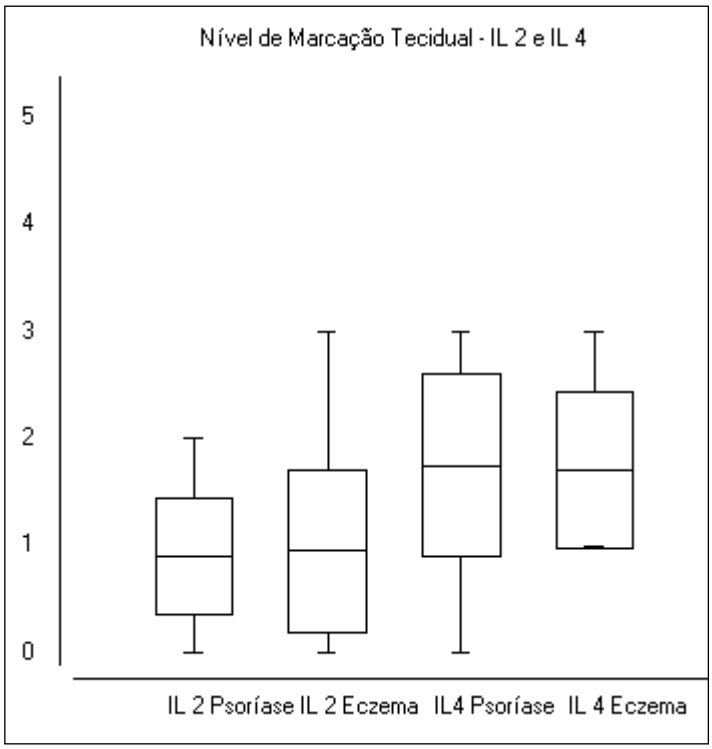


Gráfico 6 - Caracterização do nível de marcação tecidual pelas citocinas IL 2 e IL 4 nas amostras do grupo Psoríase e do grupo Eczema. Belém – PA – 2010.

A comparação da expressão de citocinas entre os pacientes psoriáticos e de eczema, não apresentou diferença estatística, mostrando um mesmo perfil citocínico (tabela 9). Porém ao avaliarmos o gráfico Box plot para TNF-α, verificou-se uma tendência dos pacientes psoriáticos a expressarem mais (Figura G), o que seria esperado.

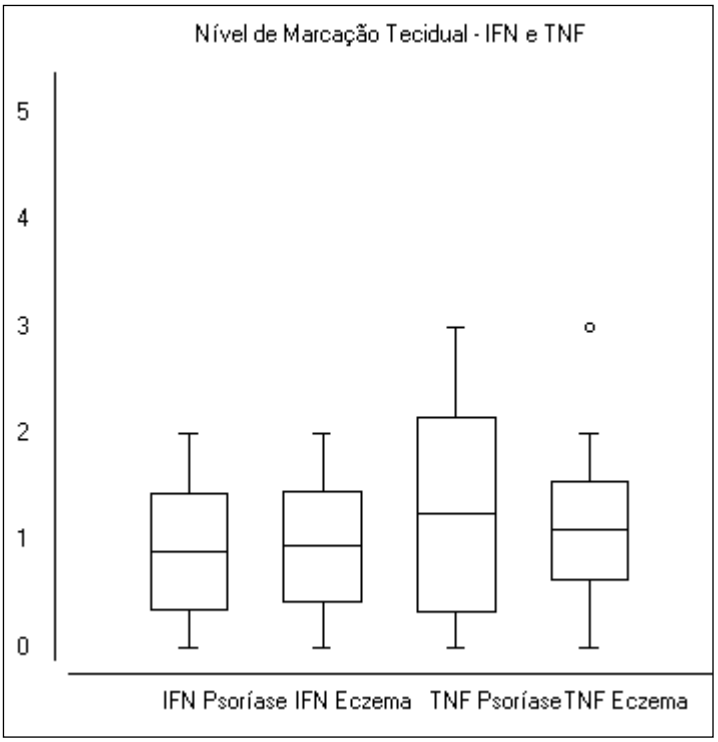


Gráfico 7 - Caracterização do nível de marcação tecidual pelas citocinas IFN e TNF nas amostras do grupo Psoríase e do grupo Eczema. Belém – PA – 2010.

Comparando os dois grupos estudados, psoriáticos e de eczema, não houve diferença significante na expressão das citocinas analisadas (tabela 9)

Tabela 9 – Perfil de marcação tecidual pelas citocinas IL2, IL4, IFN e TNF de acordo com os diferentes grupos do estudo, Psoríase e Eczema. Belém – PA – 2010.

Marcação	Psoríase		Eczema		p-valor*
	n	%	n	%	
IL 2					
Ausente	4	20,0	5	25,0	
Leve	14	70,0	12	60,0	0,6873
Moderada	2	10,0	2	10,0	
Intenso	-	-	1	5,0	
IL 4					
Ausente	2	10,0	-	-	
Leve	4	20,0	9	45,0	0,6564
Moderada	11	55,0	8	40,0	
Intenso	3	15,0	3	15,0	
IFN					
Ausente	4	20,0	3	15,0	
Leve	14	70,0	15	75,0	0,8077
Moderada	2	10,0	2	10,0	
TNF					
Ausente	4	20,0	1	5,0	
Leve	9	45,0	15	75,0	0,8924
Moderada	5	25,0	3	15,0	
Intenso	2	10,0	1	5,0	

(-) Valor numérico igual a zero não resultante de arredondamento.

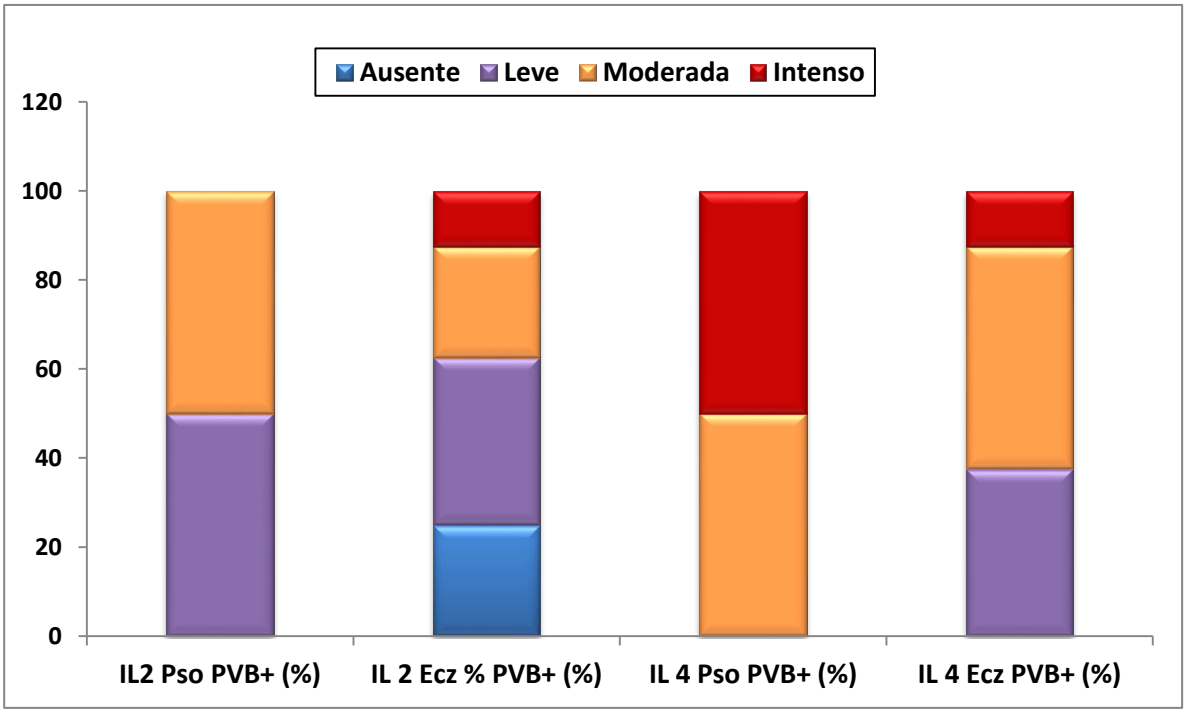
* Teste de *Mann – Whitney* ($p > 0,05$)

Neste estudo levando em consideração a presença de PVB19, não foi possível realizar a análise estatística, pois o número de amostras era pequeno.(tabela 10).

Tabela 10 – Perfil de marcação tecidual pelas citocinas IL2, IL4, IFN e TNF de acordo com os diferentes grupos do estudo, Psoríase e Eczema, positivos para PVB 19. Belém – PA – 2010.

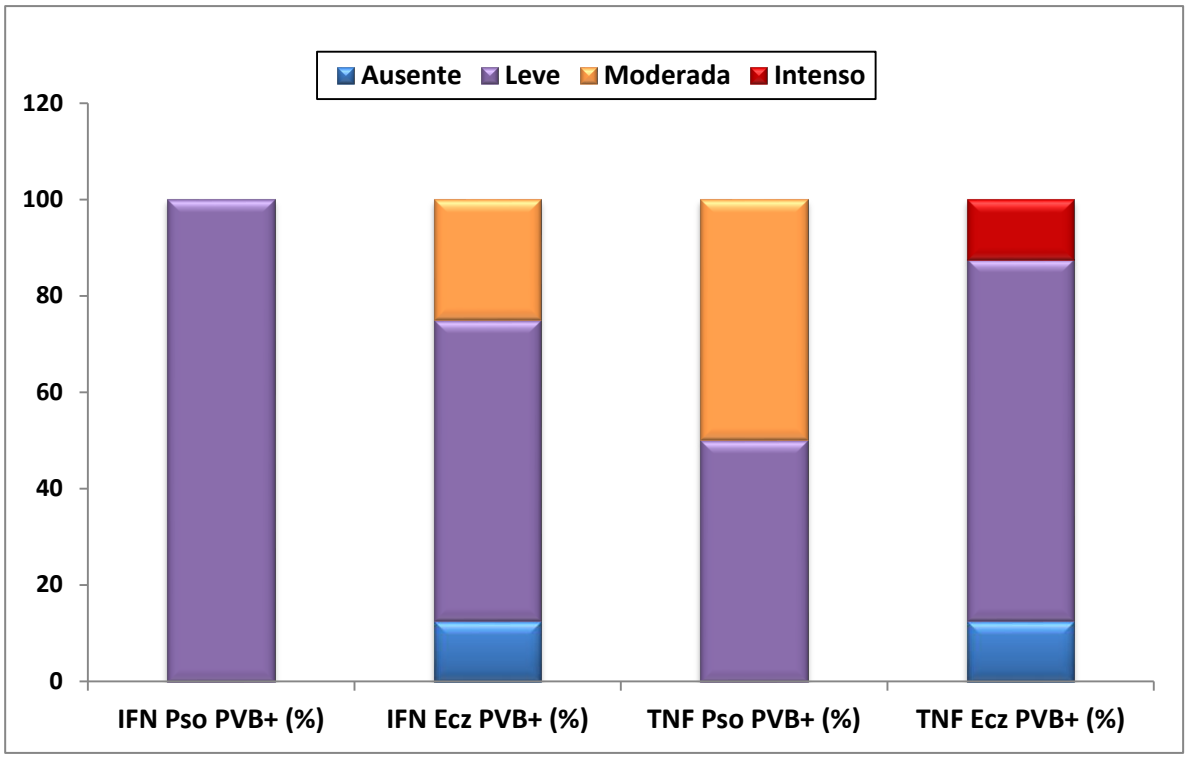
Marcação	Psoríase		Eczema	
	n	%	n	%
IL 2				
Ausente	-	-	2	25,0
Leve	1	50,0	3	37,5
Moderada	1	50,0	2	25,0
Intenso	-	-	1	12,5
IL 4				
Leve	-	-	3	37,5
Moderada	1	50,0	4	50,0
Intenso	1	50,0	1	12,5
IFN				
Ausente	-	-	1	12,5
Leve	2	100,0	5	62,5
Moderada	-	-	2	25,0
TNF				
Ausente	-	-	1	12,5
Leve	1	50,0	6	75,0
Moderada	1	50,0	-	-
Intenso	-	-	1	12,5

A correlação entre a presença de PBV19 e a expressão das citocinas nos pacientes estudados não pode ser realizada, pois o número de amostras era pequeno (tabela...). As figuras.. mostram a distribuição da expressão das citocinas apenas nas amostras positiva para PVB19.



Pso PVB+: Psoríase positivo para PVB 19; **Ecz PVB+**: Eczema positivo para PVB 19.

Gráfico 8 – Caracterização da marcação tecidual pelas citocinas IL 2 e IL 4 nas amostras positivas para PVB 19 do grupo Psoríase e do grupo Eczema. Belém – PA – 2010.



Pso PVB+: Psoríase positivo para PVB 19; **Ecz PVB+**: Eczema positivo para PVB 19.

Gráfico 9 – Caracterização da marcação tecidual pelas citocinas IFN e TNF nas amostras positivas para PVB 19 do grupo Psoríase e do grupo Eczema. Belém – PA – 2010.

CAPÍTULO VI - DISCUSSÃO

Avaliar a psoríase como doença universal e traçar seus principais aspectos epidemiológicos, nos garante um melhor conhecimento da doença, do doente, e dos mecanismos desencadeadores para o seu desenvolvimento. Embora a doença seja encontrada em várias partes do mundo, sua freqüência varia entre os diferentes grupos étnicos, além de haver variáveis confundidoras devem ser consideradas na análise desses dados, principalmente quanto ao método de averiguação, como a análise baseada na clínica, ou nos grupos populacionais, ou nos exames verificados, ou apenas baseados em questionários.

A fisiopatologia da psoríase ainda não esta bem esclarecida, com isso, este estudo tem a proposta de acrescentar dados sobre o mecanismo de desencadeamento da doença. Em muito trabalhos realizados sobre doenças que tem caráter imunológico, como artrite e lúpus, há a associação com a presença de agentes infecciosos (MEYER,2003). O presente trabalho estudou a relação da infecção por PVB19 como um fator participante no desenvolvimento da psoríase. O estudo incluiu vinte pacientes psoriáticos e vinte pacientes de eczema.

Os pacientes psoriáticos apresentaram o início da doença na sua maioria após os 40 anos de idade acompanhados de informação negativa quanto ao antecedente familiar para a doença. Esses achados concordam com Henseler e Christophers que propõem duas diferentes formas de Psoríase: a tipo I, com idade de início antes dos 40 anos de idade, doença mais severa e associada ao HLA; e a tipo II, com início após os 40 anos, e sem associação com o HLA (Gudjonsson,2007). Na tabela 2, discreta diferença é observada no grupo masculino com psoríase cuja idade mais incidente foi entre 20 a 39 anos, e nas mulheres foi acima de 50 anos. Como demonstrado por vários estudos, a maioria de os pacientes desenvolve as lesões iniciais de psoríase na terceira década de vida. Entretanto, há outros estudos mostrando dois picos; um ocorrendo aos 16 anos em mulheres, e 22 anos em homens e outro próximo à idade de 60 anos em ambos os sexos demonstrando pico bimodal (Fitzpatrick 5º Ed).

Na tabela 3, destacamos o tempo de início de aparecimento da doença foi muito semelhante entre os sexos, com média de 5,2 anos, mas vale lembrar que dois casos de psoríase disseminada tiveram o seu início antes dos 15 e o outro

próximo aos 20 anos. Um início precoce (antes dos 15 anos) se relaciona com a doença mais severa tanto em relação à porcentagem da superfície corporal atingida como na resposta terapêutica. Portanto, o tempo ou o início da psoríase constitui um ameaça por toda a vida (Fitzpatrick,2005).

Embora alguns trabalhos mostrem pequenos desvios na distribuição da doença quanto ao sexo, homens e mulheres são atingidos igualmente. Além disso, não existe nenhuma diferença morfológica ou clínica entre os sexos masculino e feminino (Gudjonsson, 2007).

Como se pode constatar na tabela , não há diferença alguma entre os sexos e a doença em questão, e os pacientes com eczema tiveram maior nº de casos entre as mulheres, mas essa freqüência foi, provavelmente, ocasionada pela baixa amostragem.

Neste estudo, os aspectos clínicos mais encontrados foram o de psoríase em placas, estacionária, que é o mais comum, e a psoríase acral não pustulosa localizada na superfície dos artelhos acompanhadas de descamação palmo plantar. Durante a abordagem clínica, pôde ser notado que as manifestações de fenômenos psíquicos como a depressão, e o trauma físico estariam relacionados com o desencadeamento da doença. Outros possíveis fatores seriam o estresse e ansiedade. Nos pacientes psoriáticos estudados verificou-se freqüência alta de transtornos psiquiátricos, cerca de 75%, enquanto, os pacientes de eczema apresentaram apenas 18%. O fato de psoríase estar relacionado com transtornos psiquiátricos vem sendo estudado e mostra um alto número de pacientes com doença psiquiátrica diagnosticada, além de estar correlacionada com incidência de depressão, transtorno de ansiedade e idéias suicidas com a gravidade da psoríase (Hayes, 2010).

Outro fator importante na psoríase é a presença de co-morbidades relacionadas à síndrome metabólica. Neste estudo isso pode ser visto com significância estatística. As co-morbidades relacionadas com a psoríase como colesterol ou triglicerídeos alto, obesidade centrípeta e diabetes, foram vistas e apresentaram forte correlação, com OR= 14 e p= 0,0068. Isso reforça o conceito de que a psoríase é uma doença sistêmica, cujos mediadores inflamatórios observados na pele, unhas e articulações podem ser encontrados no tecido adiposo. Segundo

Vena e colaboradores a presença de co-morbidades na psoríase oferece risco importante para doença cardiovascular (Vena, 2010).

Com relação ao caráter imunológico das lesões psoriáticas e de eczema, são duas doenças que possuem características imunológicas distintas, porém mostram pontos semelhantes no que diz respeito à presença de células CD4+ e CD8+, tanto na derme quanto epiderme, e, como mostra Cesinaro e colaboradores, na diferenciação de psoríase palmo-plantar e eczema de contato alérgica de palmas e plantas, há diferenças moleculares, citocínicas, que permitem a identificação da fisiopatogenia separadas (Cesinaro,2009). No eczema de contato alérgico, ocorre o processamento, a apresentação do antígeno, e as células dendríticas ligadas aos antígenos migram para os linfonodos para desencadear a sensibilização. Na fase eferente, as células T de memória antígeno-específicas, bem como outras células inflamatórias, invadem a pele causando uma resposta citocínica. O resultado final deste desencadeamento orquestrado de citocinas e moléculas de adesão é a entrada na pele de células TH1 secretando IL-2 e IFN-γ. Permanece ainda controverso, mas a IL-4 também participa na diminuição da expressão do eczema de contato alérgico (Fitzpatrick, 1451). Já no eczema atópico, os linfócitos na pele responsáveis pelas alterações imunológicas são CD3+, CD4+ e células de memória CD45RO+, ou seja, já encontraram antígeno anteriormente. Além disso, a maioria dos linfócitos T que se infiltram em lesões cutâneas atópicas expressa altos níveis de receptores de endereçamento de linfócitos cutâneos, de antígeno cutâneo linfocitário (ACL), um ligante para E-seletina. Por sua vez, células endoteliais, molécula de adesão intercelular, molécula-1 de adesão celular vascular expressam mais E-selectina, que exerce um papel fundamental no direcionamento de linfócitos T CLA+ a sítios de inflamação cutânea. Dessa forma, a expressão de citocinas, dentre elas a IL-4, mostra–se elevada como observado por Hamid e colaboradores em estudo de biópsias de pele atópica. Mais recentemente, esses pesquisadores também descobriram que a expressão de IL-13 foi mais alta nas lesões cutâneas agudas em comparação com as lesões crônicas de dermatite atópica ou psoriática. Esses dados reforçam o suporte à hipótese de que a dermatite atópica aguda é mediada por citocinas do tipo TH2.(Fitzpatrick, 5º Ed, pag 1473)

Na observação dos pacientes psoriáticos, nota-se que dois tipos celulares fundamentais interagem na formação da lesão psoriática: os ceratinócitos

epidérmicos e os leucócitos mononucleares. Dessa forma, existem dois conjuntos de respostas celulares na lesão psoriática que potencialmente cria a relação entre a ativação de tipos celulares da resposta imunológica inata e adquirida, e os fatores produzidos pelos ceratinócitos epidérmicos que afetam diretamente as células T e células dendríticas e vice e versa. Uma vez ativados, as células T se polarizam como linfócito T helper 1 (CD4) e que se localiza em sua maioria na derme afetada, enquanto que o linfócito T citotóxico (CD8) migra para a epiderme. Vale lembrar que os produtos dos ceratinócitos influenciam a ativação imune e os produtos de imunócitos ativados alteram a resposta dos ceratinócitos incluindo novas moléculas de adesão para células T. Por sua vez, a liberação de citocinas incluindo IL 1,IL 6,IL 17,IL 19, IL 20,IL 22, TNF e Interferons podem regular a proliferação ceratinocítica, e as citocinas imune-derivadas servem como mitógenos alternativos para este tipo de célula (Lowes,2007).

A análise do pefil citocínico para IL-2, IL-4, TNF-a e IFN-g nos pacientes psoriáticos e de eczema não mostrou diferenças relevantes neste estudo. Apenas pode-se verificar que a variação de expressão de IL-4 nos pacientes de eczema foi menos do que em relação aos psoriáticos.. E a expressão de TNF-α mostrou tendência de maior expressão nos pacientes psoriáticos. Essas diferenças, talvez, se tornem mais evidentes com o aumento de amostras.

No objetivo de verificar se há a participação de agentes infecciosos no desencadeamento ou modulação da psoriase, em particular PVB 19, analisou-se a presença deste vírus nas lesões de pele de psoriáticos e de eczema.

O PVB 19 é comum entre os adultos, cerca de 50% das pessoas adultas já contraíram a infecção e a imunidade é adquirida pra toda a vida em indivíduos imunocompetentes (Tofvestam,2009). É um vírus de distribuição universal, e a soroprevalência aumenta com a idade e cerca de 15% na infância, 50% em jovens e 85% dos adultos mostram evidencia sorológica de infecção passada (Tolfvestam,2009). A persistência do DNA viral pode representar tanto infecção viral ou DNA residual de uma infecção remota (Tolfvestam, 2009).

Uma questão importante é se a persistência viral do PVB19 poderia influenciar no desenvolvimento de outras doenças (inclusive auto-imunes) no período pós-infecção. Segundo Söderlund-Venermo e colaboradores, o parvovírus pode ser

persistente na medula óssea, no líquido sinovial, na pele e em outros tecidos. Em se tratando da pele, esses autores relatam que o DNA viral foi detectado em 50% das amostras de pacientes com urticária e em 34% de pacientes com outras doenças cutâneas (Söderlund-Venermo,2002). Yazici e colaboradores pesquisaram o DNA viral no sangue de indivíduos saudáveis versus indivíduos psoriáticos, e constatou maior positividade no grupo com psoríase. A amostra avaliada desses autores não foi numerosa, n de 47 psoriáticos e 20 de controles sadios, e os achados podem não mostrar os dados concretos se comparados a um número maior de pacientes.

Neste trabalho, foi utilizado amostras de lesões de pele dos pacientes, para associar a presença local do vírus com a patologia. Das vinte amostras de pacientes psoriáticosanalisadas, apenas dois indivíduos foram positivos para o DNA viral de PVB 19, em contrapartida, no grupo de 20 pacientes de eczema, oito indivíduos foram positivos para PVB 19. Portanto, foi observada uma positividade maior no grupo eczema do que no grupo psoríase e isso não corrobora com os achados de Yazici e colaboradores, que mostraram a maioria dos pacientes psoriáticos apresentavam positividade para PVB 19.

Não foi possível analisar a relação do PVB 19 e o perfil citocínico da pele psoriática e da pele de eczema, pois o número de amostras era pequeno.

Há muitos pontos a serem esclarecidos na fisiopatologenia da psoríase. O estudo das citocinas envolvidas nesta doença têm sido muito descrita e pesquisada visando a descoberta Relatos mostrando a participação de agentes infecciosos em doenças auto-imunes(inclusive psoríase) existem, porém são necessários estudos a longo prazo e com grande número de pacientes.

CAPÍTULO VII - CONCLUSÕES

1. A frequência do DNA de PVB 19 em amostras de pacientes de psoriáticos foi de 10%.
2. A frequência do DNA de PVB 19 em amostras de pacientes com eczema foi de 40%.
3. A imunomarcação para as citocinas estudadas foi semelhantes tanto para psoríase quanto para eczema.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARRUDA, LHF; CAMPBELL, GAM; TAKAHASHI, MDF. ***Psoríase***. *An bras Dermatol* 76:141-167, 2001.

BLAUVELT, AT. ***Helper 17 cells in psoriatics plaques and additional genetic links between IL 23 and psoriasis***. J. Invest Dermatol 2008; 128 (5): 1064-7.

BRAUN-FALCO, O.; PLEWIG, G.; WOLFF, H. Erythematous and Erythematosquamous skin diseases. In: BRAUN-FALCO, O.; PLEWIG, G. ***Dermatology***. Terceira Edição. Würzburg:Springer-Verlag, 1991 (1): 417-437.

CHRISTOPHERS, E and MROWIETZU. Psoriasis. In: Fitzpatrick's. ***Dermatology.*** In General Medicine. 6th edition. Chapter 8:407-427,New York,2003.

CONSENSO Brasileiro de Psoríase. 2009.

DAS, RP. ***Current concepts in the pathogenesis of psoriasis***. Vol. 54 (1). 7-12, 2009. Revista Indian Journal of Dermatology.

ELDER, JT; NAIR, RP; VOORHEES, JJ. ***Epidemiology and genetics of psoriasis***. *J Invest Dermatol* 102:24s-27s. 1994.

GUDJONSSON, JE.; ELDER, JT. ***Psoriasis: epidemiology***. Clinics in Dermatology 2007; 25: 535-46.

GUDJONSSON, JE.; JOHNSTON, A.; SIGMUNDSDOTTIR, H. & VALDIMARSSON, H. ***Immunopathogenic mechanisms in psoriasis***. Clin Exp Immunol 2004; 135: 1-8.

HARVINA, IT.; NILSSON, G.; SUTTLE, MM.; NAUKKARINEN, A. ***Is there a role for mast cells in psoriasis?*** Arch Dermatol Res. 2008; 300 (9): 461-78.

HSU, TC; TSAY, GJ. ***Human parvovirus B19 infection in patients with systemic lupus erythematosus***. *Rheumatology;* 40:152-157,2001.

JOHNSTON, AM; HILL, K; WOOKCOOK, BE. ***Lupus anticoagulant in a patient with parvovirus B19 infection***. *Clin Lal Haematol* 22:19-110,2000.

KERR JR, and MODROW, S. Human and primate Erythrovirus Infections and Associated Disease. In: Kerr JR. ***Parvoviruses***. Hodder Arnold: 385-416, London, 2005.

LOUISOU, S; CAZABON, JK; WALPORT, MJ; TAIT, D; SO, AK. ***Similarities of specificity and cofactor dependence in serum antiphospholipid anti-bodies from patients with human parvovirus B19 infection and from those with systemic lupus erythematosus***. *Arthritis Rheum* 40:103-8,1997.

LOWES, MA.; BOWLOCK, AM.; KRUEGER, JG. ***Patogenesis and therapy of psoriasis***. Nature 2007; 445 (7130): 866-73.

MEDZHITOV, R. ***Origin and physiological roles of inflamation***. *Nature* Vol 454(24), july,2008.

MEHRAEIN, Y. ***Replicative multivirus infection with cytomegalovirus, herpes simplex virus 1,and parvovirus B19, and latente infection in the synovial tissue of a psoriatic arthritis patient***. *J clin virol* 31:25-31,2004.

MEYER, O. ***Parvovirus B19 and autoimmune diseases***. *Joint Bone Spine*; 70:6-11, 2003.

MOFFAT, S; TANAKA, N; TADA, K; NOSE, M; NAKAMURA, M; MURAOKA, O. et al. ***A cytotoxic nonstructural protein,NS1,of human parvovirus b19 induces activation of Interleukin-6 gene expression***. *J virol* 70:8485-8491,1996.

MURPHY, M.; KERR, P.; GRANT-KELS, JM. ***The histopatologic spectrum of psoriasis***. Clinic in Dermatology. 2007, 25: 524-8.

NICKOLOFF, BJ; OIN, JZ.; NESTLE, FO. ***Immunpathogenesis of psoriasis***. Clin Rev. Allergy Immunol. 2007, 33 (1-2): 4-5.

QUEIRO, et. AL. HLA, AC. ***Locus alleles may modulate the clinical expression of psoriatics arthrits Res Ther***. 2006, 8 R185.

ROMITI, R. ***Novos Conceitos em Psoríase***. Maria Flávia Pereira da Silva, autora do Capítulo V – Índices de Avaliação da Gravidade Clínica. Editora Elsevier. P. 64-66.

SCHIMITT, J.; WOZEL, G. ***The psoriais área and severity índex is the adequate criterion to define severity in chronic plaque-type psoriasis***. Dermatology, 2005. 210: 194-9.

SODERLUND-VENERMO, M. ***Persistence of human parvovirus B19 in human tissues***. *Pathol Biol* 50:307-316, Paris,2002.

SOLONINKA, CA; ANDERSON, MJ; LASKIN, CA. ***Anti-DNA and antilymphocyte antibodies during acute infection with human parvovirus B19***. *J Rheum* 1989;16:777-81,1989.

TONEL, G.; CONRAD, C. ***Interplay between keratinocytes and immune cells-recent insights into psoriasis pathogenesis***. Int J Biochem Cell Biol. 2009; 41 (5): 963-8.

VAFAIE, J. ***Parvovirus B19 infections***. *International Journal of Dermatology*;43: 747-49,2004.

WRONE-SMITH, T; NICKOLOFF, BJ. ***Dermal injection of immunocytes induces psoriasis***. *J clin Invest* 98:1878-87, 1996.

YAZICI, AC.; ASLAN, G.; BAZ, K.; IKIZOGLU, G.; API, H.; SERIN, MS.; TEZCAN, S.; EKDAS, G.; TASDELEN, B. ***A high prevalence of parvorius B19 DNA in patients with psoriasis***. Arch Dermatol Res 2006: 298 (5): 231-5.

RAHAT S, JOEL M et al. Psoriasis: a possible risk factor for development of coronary artery calcification. Br J Dermatol 2007; 156(2): 271-76.

A N E X O S

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO OBTIDO PELO HOSPITAL ADVENTISTA DE BELÉM

Caro diretor do Hospital Adventista de Belém,

Solicito de VSª. a obtenção temporária de amostras de tecido cutâneo de pacientes portadores de Psoríase, confirmados através de histopatológico realizados nessa instituição que servirão para pesquisas celulares e investigação de participação viral (PARVOVIRUS B19) no desenvolvimento da doença.

Desde já informo à Vsa que as peças solicitadas estão armazenadas e emblocadas em parafina no Hospital Adventista de Belém , e seguirão para pesquisa a ser realizada no Núcleo de Medicina Tropical sob a responsabilidade do Dr. Prof Juarez Quaresma.

A necessidade desse material e a contribuição que ele trará, será para realização de minha TESE de Mestrado, cujo título é Avaliação da Presença de Parvovirus B19 na pele psoriática e suas alterações imunológicas.

Asseguro completamente o sigilo, e que não haverá fornecimento de informações ou identificação pessoal qualquer durante e após todo o andamento e conclusão da pesquisa.

Em nenhum momento será reaproveitado o material para pesquisas posteriores.

Não possuo nenhum vínculo financeiro com indústria farmacêutica ou com o Hospitais privados no sentido de financiamento ou alteração dos resultados.

De forma alguma, essa pesquisa será utilizada para obtenção de patrocínios, ganho pessoal, de fama, imagem ou financeira.

O beneficio e sua maior contribuição será para a área de pesquisa em psoríase, corroborando ao estudo da doença e compreensão dos seus mecanismos de ação para que medidas efetivas/terapêuticas futuras permitam uma nova abordagem no controle da doença.

Dessa forma, solicito gentilmente a concessão desse material por parte da Instituição, com total gratidão e sentimento de dever na busca pelo conhecimento e pelo saber que a pesquisa proporciona.

Descrevo para VSª., o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido a ser assinado pelo paciente, e aguardo resposta para retirar e armazenar as peças de tecido cutâneo por um período máximo de 3 anos.

Adriana Christie Lacerda Simões - CRM 6090 - Pará

Mestranda em Doenças Tropicais pela Universidade Federal do Pará

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO COMO DISPOSTO NA RESOLUÇÃO CNS 196/96 E NA RESOLUÇÃO CEO-016/2000.

TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA:

Avaliação da presença de parvovírus B19 na pele psoriática e sua correlação com as alterações imunológicas.

Estamos realizando uma pesquisa que objetiva investigar a presença de parvovírus B19 na pele de doentes portadores de Psoríase (manchas vermelhas escamosas), bem como estudar as alterações se presentes e se exercem algum papel no estado inflamatório da doença. Dessa forma, será também pesquisado a presença de células de defesa e suas funções visando a associação da perda de "vigilância" dessas células na ocorrência da doença.

A psoríase é uma doença comum que afeta principalmente a pele deixando com "manchas" avermelhadas e com um "casca" encima dessas manchas, e se localizam principalmente nos cotovelos, joelhos, pés.

O tratamento ainda é um desafio e há controle dessas "manchas" deixando-as menos vermelhas e sem casca incômoda. Sua causa não é ainda totalmente conhecida. Há uma característica genética, mas nem todos os casos são explicados pela genética. Sabemos que há fatores que pioram como infecções, medicamentos, "stress", entretanto não há muitos estudos que se disponham a estudar suas causas. Portanto, a finalidade desse estudo é verificar se a presença do vírus (Parvovírus B 19) contribui de alguma forma para o agravamento das lesões ou se ele aparece com maior frequência nas formas de Psoríase mais graves.

FASES DE COLETA:

A **1ª fase da colheita**, já ocorreu, visto que já foram realizadas as biopsias de pele (colheita de tecido da pele) e a obtenção será desse tecido que já está devidamente armazenado no **Departamento de Histopatologia do Hospital**

Adventista de Belém (banco de peças histológicas) , e sua participação será **na doação** desse material biológico para que a pesquisa possa ser realizada.

Declaro que a diretoria do Hospital Adventista de Belém no nome do Dr. Markus Barcellos e Dr. Walter Streithorst, permitiu a retirada desse material (pele) do seu departamento de Histopatologia mediante a sua assinatura e consentimento explícito através deste termo de consentimento.

De nenhuma forma haverá risco físico para você pois o material já foi obtido em momento anterior por método diagnóstico seguro, eficaz, de fácil execução (biópsia de pele) e que já foi realizado (mesmo que não fosse efetuada a pesquisa) pelo seu médico dermatologista. A sua biópsia foi feita para que através dela o seu diagnostico de psoríase fosse instituído, e o tratamento adequado pudesse ser conduzido.

Asseguro completamente o sigilo, e que não haverá fornecimento de informações ou identificação pessoal qualquer durante e após todo o andamento e conclusão da pesquisa.

Asseguro ainda que não haverá qualquer finalidade de interesse pessoal do pesquisador como finalidade financeira, de fama, ou de imagem com o material a ser doado muito menos com os resultados obtidos.

Em nenhum momento será reaproveitado o seu material doado para pesquisas posteriores, exceto com o seu novo e devido consentimento e permissão.

A **2ª fase** ou pesquisa propriamente dita, será realizada no Laboratório de Biologia e Imunologia da Universidade Federal do Pará, localizada no Núcleo de Medicina Tropical, onde serão armazenados os tecidos de pele doados por um período de 3 anos cuja responsabilidade será do Prof. Juarez Quaresma. O estudo a ser realizado nesse material biológico serão de Pesquisa de Vírus (Parvovirus B 19) e células de inflamação que ocorrem frequentemente na Psoríase. Dessa forma, nenhum perfil individual será descoberto e sim dados de uma coletividade, o que implica em total sigilo de identidade na positividade ao vírus caso ela ocorra.

Não há vínculo desta instituição nesta pesquisa com indústria de medicamentos ou qualquer outra relação financeira com órgãos ou hospitais privados.

Os resultados serão analisados e descritos em contribuição ao estudo e defesa de dissertação de mestrado por mim, Adriana Christie Lacerda Simões, e declaro não possuir nenhum conflito de interesse econômico, de imagem, de fama, ou qualquer outro relacionados a pesquisa.

Não serão realizadas nenhum tipo de pesquisa genética humana com esse material.

Não haverá indenização em dinheiro, premiação ou favores aos participantes doadores para a pesquisa e aqueles que doarem o seu material biológico será de livre e espontânea vontade.

O beneficio e sua maior contribuição será para a área de pesquisa em psoríase, corroborando ao estudo da doença e compreensão dos seus mecanismos de ação para que medidas efetivas/terapêuticas futuras permitam uma nova abordagem no controle da doença.

A sua participação será de livre e espontânea vontade e informamos também que sua privacidade será assegurada e que o Sr(a) tem a plena liberdade de interromper a sua participação na pesquisa, em qualquer tempo.

Responsável pela pesquisa: Adriana Christie Lacerda Simões

Rua dos Mundurucus, 3100

Fone: 32491211

Celular: 9146-4046 email: christiesimoes@bol.com.br

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro que li as informações acima sobre a pesquisa, que me sinto perfeitamente esclarecido sobre o conteúdo da mesma. Declaro ainda que, por minha livre vontade, concordo em participar da pesquisa, desde que sejam respeitadas todas as disposições citadas.

Belém, _____/_____/_____

Nome: _____

End: _____

Tel: _____

ANEXO 3

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO COMO DISPOSTO NA RESOLUCÃO CNS 196/96 E NA RESOLUÇÃO CEP 016/2000.

TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA:

Avaliação da presença de parvovírus B19 na pele psoriática e sua correlação com as alterações imunológicas.

Estamos realizando uma pesquisa que objetiva investigar a presença de parvovírus B19 na pele de doentes portadores de Psoríase (manchas vermelhas escamosas), bem como estudar as alterações se presentes e se exercem algum papel no estado inflamatório da doença. Dessa forma, será também pesquisado a presença de células de defesa e suas funções visando a associação da perda de "vigilância" dessas células na ocorrência da doença.

Porém para efeito comparativo, necessito de tecido de pele com outra doença dermatológica, como o ECZEMA ATÓPICO DE ÁREAS DE BRAÇO E ANTEBRAÇO,DE CONTATO, ou DESIDRÓTICO.

Esta doença (ECZEMA) é uma forma de "alergia" que se desenvolve na pele e se apresenta com coceira, às vezes como pequenas bolinhas,escamas, pele áspera, engrossada, e pode atingir qualquer parte do corpo.

Muitas vezes é possível encontrar a causa desse eczema como perfumes, tecidos, tintas, solventes como tinner, material plástico ou borracha encontrado nas sandálias . Porém em outras formas de eczema como o atópico não há um causador bem definido visto que é uma doença multifatorial com influ~encia genética determinante.

Vale lembrar que para Psoríase não há causa bem definida, daí a razão do estudo, e a sua participação na doação de sua amostra de pele será justamente para efeitos comparativos com essa doença em questão(Psoríase).

Dessa forma, o estudo para ser aplicado precisa de tecido de pele de pacientes com PSORÍASE (doença que estou pesquisando) e de outra doença, que nesse caso foi escolhido o ECZEMA, para comparar se as alterações que serão vistas em uma doença são iguais entre elas ou não.

FASES DE COLETA:

A **1ª fase** da colheita, já ocorreu, visto que já foram realizadas as biopsias de pele (colheita de tecido da pele) e obtenção será desse tecido que já está devidamente armazenado no d**epartamento de Histopatologia do Hospital Adventista de Belém**, e sua participação **será na doação** desse material biológico para que a pesquisa possa ser realizada.

De nenhuma forma haverá risco físico para você pois o material já foi obtido por método diagnóstico seguro, eficaz, de fácil execução (biópsia de pele) e que já foi realizado (mesmo que não fosse efetuada a pesquisa) visto que torna-se imprescindível a biopsia de pele para que o diagnóstico seja confirmado (eczema) com a finalidade de que o tratamento adequado seja instituído.

Asseguro completamente o sigilo, e que não haverá fornecimento de informações ou identificação pessoal qualquer durante e após todo o andamento e conclusão da pesquisa.

Em nenhum momento será reaproveitado o seu material doado para pesquisas posteriores, exceto com o seu novo e devido consentimento e permissão.

A 2ª fase ou pesquisa propriamente dita, será realizada no Laboratório de Biologia e Imunologia da Universidade Federal do Pará, localizada no Núcleo de Medicina Tropical, onde serão armazenados os tecidos de pele doados por um período de 3 anos cuja responsabilidade será do Prof Juarez Quaresma . O estudo a

ser realizado nesse material biológico serão de Pesquisa de Vírus (Parvovirus B 19) e células de inflamação. Estas últimas ocorrem frequentemente em doenças inflamatórias.

Dessa forma, nenhum perfil individual será descoberto e sim dados de uma coletividade, o que implica em total sigilo de identidade na positividade ao vírus caso ela ocorra.

Não serão realizadas nenhum tipo de pesquisas genéticas humanas com esse material.

Declaro ainda que não haverá premiação, gratificações em dinheiro, favores aos que se propuserem à doação de seu material.

Este material (tecido de pele armazenado no departamento de Histopatologia do Hospital) será doado de LIVRE e ESPONTÂNEA VONTADE.

Não possuo nenhum vínculo com empresas, hospitais privados, indústria farmacêutica, e nada do que será pesquisado serão financiadas por essas instituições.

De forma alguma, essa pesquisa será utilizada para obtenção de patrocínio pessoal, fama , imagem ou ganho financeiro.

O beneficio e sua maior contribuição será para a área de pesquisa em psoríase, corroborando ao estudo da doença e compreensão dos seus mecanismos de ação para que medidas efetivas/terapêuticas futuras permitam uma nova abordagem no controle da doença.

A sua participação será de livre e espontânea vontade e informamos também que sua privacidade será assegurada e que o Sr(a) tem a plena liberdade de interromper a sua participação na pesquisa, em qualquer tempo.

Responsável pela pesquisa: Adriana Christie Lacerda Simões

Rua dos Mundurucus, 3100

Fone: 32491211

Celular: 9146-4046 email: christiesimoes@bol.com.br

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro que li as informações acima sobre a pesquisa, que me sinto perfeitamente esclarecido sobre o conteúdo da mesma. Declaro ainda que, por minha livre vontade, concordo em participar da pesquisa, desde que sejam respeitadas todas as disposições citadas.

Belém, _____/_____/_____

Nome: _____

End: _____

Tel: _____

Cel: _____

ANEXO 5

FICHA DE COLETA DE DADOS

IDENTIFICAÇÃO:

Nome: .....

Idade: .....

Data de Nascimento: .....

Nº do Exame: ..... **Sexo**: Masculino ( ) Feminino ( )

Cor: Branca ( ) Negra ( ) Parda ( )

Laboratório: .....

Data da Biópsia: .....

Diagnóstico: .....

Descrição Histológica: .....

Classificação Clínica: .....

Tempo de Evolução: .....

AMP: .....

AMF (Família portadora da doença) Sim ( ) Não ( )

Co-Morbidades:

( ) HAS ( ) Obesidade ( ) Hipertrigliceridemia/Hipercolesterolemia

( ) IAM ( ) DM