



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

STEPHANY CARES HUBER

**CARACTERIZAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)
AUTÓLOGO E SEUS EFEITOS BIOLÓGICOS EM PACIENTES
PORTADORES DA DOENÇA DE BEHÇET**

CAMPINAS

2017

STEPHANY CARES HUBER

CARACTERIZAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) AUTÓLOGO E SEUS EFEITOS BIOLÓGICOS EM PACIENTES PORTADORES DA DOENÇA DE BEHÇET

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

ORIENTADORA: PROF. DRA. JOYCE MARIA ANNICHINO BIZZACCHI

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA STEPHANY CARES HUBER E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. JOYCE MARIA ANNICHINO BIZZACCHI.

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

H862c Huber, Stephany Cares, 1988-
Caracterização do plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo e seus efeitos biológicos em pacientes portadores da Doença de Behçet / Stephany Cares Huber. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Joyce Maria Annichino-Bizzacchi.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Imunomodulação. 2. Plasma rico em plaquetas. 3. Síndrome de Behçet. I. Annichino-Bizzacchi, Joyce Maria, 1957-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Characterization of autologous platelet rich plasma and its biological effects in patients with Behçet Disease

Palavras-chave em inglês:

Immunomodulation

Platelet-rich plasma

Behçet syndrome

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Joyce Maria Annichino-Bizzacchi [Orientador]

Luciôla da Silva Barcelos

Alexandra Ivo de Medeiros

Simone Appenzeller

Lício Augusto Velloso

Data de defesa: 06-04-2017

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

STEPHANY CARES HUBER

ORIENTADOR: PROFA. DRA. JOYCE MARIA ANNICHINO BIZZACCHI

MEMBROS:

1. PROFA. DRA. JOYCE MARIA ANNICHINO BIZZACCHI

2. PROFA. DRA. LUCIOLA DA SILVA BARCELOS

3. PROFA. DRA. ALEXANDRA IVO DE MEDEIROS

4. PROFA. DRA. SIMONE APPENZELLER

5. PROF. DR. LICIO AUGUSTO VELLOSO

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 06 de abril de 2017

Dedico este trabalho aos meus pais Gustavo e Blanca.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Professora Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi e a Profa. Dra. Zoraida Sachetto, por toda orientação, paciência e contribuição tanto profissional quanto pessoal. Vocês são pessoas que me inspiram, e deixo aqui registrado todo meu carinho, agradecimento e admiração.

Agradeço a minha supervisora e amiga Silmara Montalvão pela grande colaboração técnica e pessoal, me auxiliando diariamente no desenvolvimento do estudo e na superação de desafios. Admiro seu conhecimento, disponibilidade e amor à ciência!

Agradeço a Profa. Dra. Priscyla Marcato Gaspari, que me mostrou os caminhos para me tornar a profissional que sou hoje, com toda paciência e carinho. Meus primeiros contatos com a área acadêmica da forma você me apresentou, foram apaixonantes e essenciais. Muito obrigada!

Agradeço aos meus pais Gustavo e Blanca, por terem me apoiado em todas minhas escolhas, e me mantendo firme quando tive dificuldades. Obrigada por me fazer enxergar lições boas mesmo diante de situações difíceis. Obrigada por acreditarem em mim quando eu mesma já não tinha esperança.

Agradeço aos meus amigos em especial Kamilla Dias, que sempre esteve comigo tanto nas comemorações quanto nos lamentos. Sua amizade é essencial para mim! Muito obrigado!

Agradeço aos meus amigos e colegas de laboratório que passam pelas mesmas situações e vibramos juntos a cada nova conquista. Obrigada por fazerem parte desta jornada: Letícia Queiroz, Maiara Fiusa, Yzabella Nogueira, Kiara Zapponi, Bruna Mazeto, Luis Fernando Bittar, Aline Urban, Fernanda Bassora, Bruno Lima, Devanira Paixão, Beatriz Martinelli, José Luiz Rosenberis, João Ricardo Carreteiro, Priscilla Elidio, Ariane, Carmen.

Agradeço aos pacientes que participaram do estudo por terem confiado no meu trabalho e por terem colaborado tanto para esta pesquisa, vocês fizeram parte de um momento muito importante para mim. Obrigada por tudo que me ensinaram.

Agradeço a agência de fomento CNPq pelo apoio e incentivo para que este projeto fosse viável.

Agradeço a Deus por me dar motivos pelos quais agradecer e por me proporcionar sabedoria para o desenvolvimento deste estudo.

RESUMO

A doença de Behçet (DB) é uma vasculite crônica sistêmica imunomediada, caracterizada por manifestações clínicas que incluem: úlceras muco-cutâneas, comprometimento ocular, alterações imunológicas, envolvimento vascular e neurológico. Sua etiologia ainda é desconhecida, mas acredita-se que está relacionada com a interação de fatores genéticos, ambientais e imunológicos que definem o curso da doença. Os tratamentos disponíveis apresentam limitações como alto custo e efeitos colaterais, sendo que a busca por um tratamento biológico de baixo custo com potencial imunomodulador, torna-se de grande valia. O plasma rico em plaquetas (PRP) apresenta algumas características que poderiam indicar o seu uso como imunomodulador devido a vasta gama de citocinas secretadas, especialmente pela participação do TGF- β na diferenciação das células Treg. Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi: caracterizar o PRP de pacientes com DB e úlceras em atividade, e avaliar seus efeitos como imunomodulador através de aplicação subcutânea. Para isto, foram selecionados pacientes com diagnóstico de DB segundo os critérios do ISGBD, acompanhados no Ambulatório de Vasculites do Hospital das Clínicas da Unicamp, no período de fevereiro de 2014 a agosto de 2015. Os critérios de inclusão foram o uso de dose máxima de 10 mg de prednisona ao dia, e presença de úlceras orais. Os critérios de exclusão foram atividade neurológica ou ocular, uso de anticoagulante ou antiagregante plaquetário, e neoplasia nos últimos 5 anos. O P-PRP foi caracterizado através da contagem de plaquetas e leucócitos, e pela quantificação de 17 citocinas. Os efeitos do uso do P-PRP foram avaliados pela frequência de células TCD4+, TCD8+, Treg, NK e NK ativada, além do perfil de 17 citocinas no plasma dos pacientes, e também pelas manifestações clínicas através do escore BR-BDCAF, do questionário SF-36, e da avaliação do número e do tempo de fechamento das úlceras orais. Os pacientes mantiveram a terapia padrão, com baixa dose de prednisona e o P-PRP foi utilizado como adjuvante, sendo realizadas 9 aplicações de 3 mL, num período de 6 meses, com acompanhamento de um ano.

Os resultados mostraram uma mediana do número de plaquetas de 1.130.000 células/ μ L e leucócitos de 1500/ μ l, apresentando valores adequados e sem variações significativas inter e intra-individual. Os níveis de citocinas presentes no P-PRP foram relativamente homogêneos, com exceção do TGF- β 1, o qual apresentou um aumento significativo ($p < 0,0001$) nos 6 meses (última aplicação). As avaliações sistêmicas mostraram alterações significativas, caracterizadas pelo aumento da frequência de células Treg ($p = 0,0416$) e diminuição de células NK ativadas ($p = 0,0010$), durante o período de

seguimento dos pacientes. Contudo, não se observou uma correlação clínica com as dosagens sistêmicas. O dado clínico mais relevante foi a diminuição no tempo de fechamento das úlceras durante todo o período de aplicação. Apesar de resultados preliminares e ao pequeno número de pacientes, nossos resultados indicam que a avaliação da função celular de Treg seria interessante para implementar o conhecimento sobre o efeito do P-PRP. Além disso, critérios clínicos mais objetivos para análise dos resultados seriam importantes para definição dos efeitos.

Palavras-chave: imunomodulação, plasma rico em plaquetas, doença de Behçet.

ABSTRACT

Behçet's disease (DB) is an immune-mediated chronic systemic vasculitis, characterized by clinical manifestations that include: mucocutaneous ulcers, ocular involvement, immunological alterations, vascular and neurological involvement. Its etiology is still unknown, but it is believed to be related to the interaction of genetic, environmental and immunological factors that define the course of the disease. The available treatments present limitations such as high cost and side effects, and the search for a low cost biological treatment with immunomodulatory potential, becomes of great value. Platelet rich plasma (PRP) has some characteristics that could indicate its use as an immunomodulator due to the wide range of secreted cytokines, especially by the participation of TGF- β in the differentiation of Treg cells. In view of the above, the objective of this study was: to characterize the PRP of patients with DB and active ulcers, and to evaluate its effects as an immunomodulator through subcutaneous application. For this, we selected patients with a diagnosis of DB according to the criteria of the ISGBD, followed in the Vasculitis Outpatient Clinic of the Hospital das Clínicas of Unicamp, from February 2014 to August 2015. The inclusion criteria were the use of a maximum dose of 10 mg prednisone per day, and presence of oral ulcers. Exclusion criteria were neurological or ocular activity, use of anticoagulant or antiplatelet agent, and neoplasia in the last 5 years. P-PRP was characterized by platelet and leukocyte counts, and quantification of 17 cytokines. The effects of the use of P-PRP were evaluated by the cell frequency of TCD4 +, TCD8 +, Treg, NK and NK activated, as well as the cytokine profile (17) in the patients' plasma, and the clinical manifestations through the BR-BDCAF score, SF-36 questionnaire, and the assessment of the number and timing of oral ulcer closure. Patients maintained standard therapy with a low dose of prednisone and P-PRP was used as an adjuvant, with 9 applications of 3 mL, over a 6-month period, with a follow-up of one year.

The results showed a median platelet count of 1130,000 cells/ μ L and leukocytes of 1500/ μ L, presenting adequate values and without significant inter- and intra-individual variations. The levels of cytokines present in P-PRP were relatively homogeneous, with the exception of TGF- β 1, which presented a significant increase ($p < 0.0001$) at 6 months (last application). The systemic evaluations during the use of P-PRP showed significant alterations, characterized by the increase in Treg cell frequency ($p = 0.0416$) and decrease in activated NK cells ($p = 0.0010$) during the follow-up. However, no clinical correlation was observed with systemic dosages. The most relevant clinical data was the decrease in

the closing time of ulcers throughout the application period. Despite preliminary results and small numbers of patients, our results indicate that the evaluation of Treg cell function would be interesting to implement knowledge about the effect of P-PRP. In addition, more objective clinical criteria for outcome analysis would be important in defining effects.

Keywords: Immunomodulation, platelet rich plasma, Behçet disease.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema do preparo do P-PRP produzido <i>in house</i>	36
Figura 2: Desenho do estudo apresentando esquema de aplicação e avaliação clínica, biológica e a caracterização do P-PRP dos pacientes com DB.....	38
Figura 3: Aplicação periumbilical do P-PRP em pacientes de DB.....	38
Figura 4: Fluxograma de inclusão e exclusão dos pacientes segundo os critérios de elegibilidade do estudo.....	41
Figura 5: Recuperação de plaquetas no P-PRP.....	43
Figura 6: Recuperação de leucócitos no P-PRP.....	43
Figura 7: Concentração dos fatores de crescimento no P-PRP, quantificadas através da plataforma Luminex, durante o período de aplicação nos pacientes.....	45
Figura 8: Concentração de TGF- β 1 ativo no P-PRP, quantificado através do Luminex com tratamento de acidificação prévio, durante o período aplicação nos pacientes de Behçet.....	46
Figura 9: Concentração de sCD40L e IL-6 quantificados por meio do CBA de sensibilidade normal no P-PRP dos pacientes ao longo do período das aplicações.....	47
Figura 10: Concentração de fatores de crescimento quantificados através de CBA de alta sensibilidade no P-PRP dos pacientes ao longo do período das aplicações.....	48
Figura 11: Escore clínico mensurado por meio do BR-BDCAF dos pacientes ao longo do período de seguimento.....	49
Figura 12: Gráfico evidenciando a mediana do número de úlceras orais dos pacientes com DB ao longo do período de seguimento.....	49
Figura 13: Gráfico representando o número de úlceras orais de cada paciente ao longo do período de seguimento.....	50
Figura 14: Gráfico evidenciando a mediana do tempo (em dias) para o fechamento das úlceras orais dos paciente com DB no período de seguimento.....	50
Figura 15: Gráfico evidenciando o tempo (em dias) para o fechamento das úlceras orais de cada paciente no período de seguimento do estudo.....	51
Figura 16: Caracterização fenotípica da população de células NK dos pacientes com DB. <i>Dots plots</i> representativos da análise de citometria de fluxo.....	53
Figura 17: Caracterização fenotípica da população de células TCD4+ dos pacientes com DB. <i>Dots plots</i> representativos da análise de citometria de fluxo.....	53

Figura 18: Frequência (%) dos diferentes tipos celulares durante o período de seguimento dos pacientes.....	54
Figura 19: Caracterização fenotípica da população de células TCD8+ dos pacientes com DB. <i>Dots plots</i> representativos da análise de citometria de fluxo.	54
Figura 20: Caracterização fenotípica da população de células NK ativadas dos pacientes com DB. <i>Dots plots</i> representativos da análise de citometria de fluxo	55
Figura 21: Caracterização fenotípica da população de células Treg dos pacientes com DB. <i>Dots plots</i> representativos da análise de citometria de fluxo	56
Figura 22: Frequência de diferentes populações celulares ao longo do período de seguimento	57
Figura 23: Concentração de citocinas no plasma dos pacientes ao longo do período de seguimento, quantificados por meio da plataforma Luminex, não apresentando alterações significativas.....	58
Figura 24: Concentração dos fatores de crescimento no plasma dos pacientes ao longo do período de seguimento, quantificados por meio da plataforma Luminex.....	59
Figura 25: Concentração de IL-6 plasmática quantificada por meio de CBA de sensibilidade normal, não apresentando alterações significativas ao longo do período de seguimento dos pacientes com DB.....	60
Figura 26: Concentração de citocinas no plasma dos pacientes de DB ao longo do período de seguimento, quantificadas por através do CBA de alta sensibilidade e baixa (sCD40L).....	61
Figura 27: Principais resultados do estudo evidenciando os resultados dos perfis pró e anti-inflamatório e suas variações durante todo o período de seguimento dos pacientes com DB.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Critérios diagnósticos do ISGBD para a doença de Behçet (1990).....	21
Tabela 2: Critérios diagnósticos ICBDD (<i>International Criteria for Behçet Disease</i>).....	21
Tabela 3: Frequência das manifestações clínicas dos pacientes acometidos com DB em uma população da região metropolitana de Campinas.....	25
Tabela 4: Tratamentos disponíveis na DB.....	29
Tabela 5: Anticorpos utilizados para identificação fenotípica através da citometria de fluxo.....	39
Tabela 6: Descrição dos pacientes inclusos na pesquisa considerados elegíveis	42
Tabela 7: Frequência das variáveis categóricas dosadas no P-PRP dos pacientes com DB.....	46
Tabela 8: Descrição dos dados relacionados ao questionário de qualidade de vida (SF-36), com os valores de mediana, mínimo e máximo e valor de p de cada domínio durante o período de seguimento dos pacientes.....	52
Tabela 9: Frequência das variáveis cateóricas dosadas no plasma dos pacientes com DB.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACD – Ácido Citrato Dextrose

AZA – Azatioprina

BR-BDCAF – *Behçet Current Activity Form*

CD40L - Ligante solúvel de CD40

CBA – *Cytometric Bead Array*

CE – Corticoesteróide

COX-2 – Ciclo-oxigenase-2

CXCR4 – Receptor da citocina tipo 4

DAMPS – Padrões moleculares associados a dano

DB – Doença de Behçet

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

EGF - Fator de Crescimento Epidérmico

EROS – Espécies Reativas de Oxigênio

FCM – Faculdade de Ciências Médicas

FoxP3 – Forkhead Box P3

FSC – *Foward Side Scater*

GM-CSF – Fator estimulante de colônias granulocíticas e macrófagos

HC – Hospital de Clínicas

HGF – Fator de Crescimento de Hepatócitos

HSP – Proteínas de Choque Térmico

HSV – Herpes simples vírus

ICBD – *International Criteria for Behçet's Disease*

IDO - Enzima indolamina-desoxigenase

IFN- α - Interferon α

IFN- γ – Interferon γ

IFN-I - Interferon tipo I

IL-1 α – Interleucina 1 α

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-2 – Interleucina 2

IL-4 – Interleucina 4

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8
IL-10 – Interleucina 10
IL-12 – Interleucina 12
IL-13 – Interleucina 13
IL-17 – Interleucina 17
IL-21 – Interleucina 21
IL-22 – Interleucina 22
IL-23 – Interleucina 23
IL23R – Receptor da Interleucina 23
IL12R β 2 – Receptor da Interleucina 12 subunidade β 2
ISGBD – *International Study Group for Behçet's Disease*
LTA – Ácido Lipoteicoico
MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade
MSC - Célula Tronco Mesenquimal
MTX – Metotrexato
NF- κ B - Fator nuclear kappa B
NK – Células *Natural Killer*
PBS – Tampão Fosfato
PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGF-AA - Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas AA
PDGF-BB - Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas BB
PDGF-AB - Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas AB
PDN – Prednisona
PF4/CXCL4 – Fator Plaquetário 4
PPP – Plasma Pobre em Plaquetas
PRP – Plasma Rico em Plaquetas
P-PRP- Plasma Rico em Plaquetas pobre em leucócitos
RNA_m – RNA mensageiro
RMI - Ressonância Magnética
SF-36 – Short- Form 36
SNC- Sistema Nervoso Central
SSC – *Side Scatter*
TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- β 1 - Fator Transformador do Crescimento β 1

TGF- β 2 - Fator Transformador do Crescimento β 2

TGI- Trato Gastro Intestinal

TLR2-2 – Toll Like Receptor 2

TLR3 - Toll Like Receptor 3

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral α

TREG – Células T reguladoras

VEGF - Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

VHS – Velocidade de Hemossedimentação

3M – 3 meses

6M – 6 meses

9M – 9 meses

12M – 12 meses

LISTA DE ANEXOS

Anexo I. Termo de consentimento livre esclarecido	88
Anexo II. Parecer circunstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa.....	94
Anexo III. Formulário de atividade da doença de Behçet.....	95
Anexo IV. Versão brasileira do questionário de qualidade de vida (SF-36).....	97
Anexo V. Registro de úlceras orais.....	101

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. Doença de Behçet.....	20
1.2. Etiologia e patogênese.....	22
1.2.1. Susceptibilidade genética.....	22
1.2.2. Anormalidades imunológicas.....	22
1.3. Manifestações clínicas.....	24
1.3.1. Lesões muco-cutâneas.....	25
1.3.2. Comprometimento ocular.....	26
1.3.3. Manifestações neurológicas.....	26
1.3.4. Manifestações vasculares.....	26
1.4. Tratamento.....	27
1.5. Plasma Rico em Plaquetas (PRP).....	29
2. JUSTIFICATIVA.....	32
3. HIPÓTESES.....	33
4. OBJETIVOS.....	33
4.1. Geral.....	33
4.2. Específicos.....	33
5. METODOLOGIA.....	33
5.1. Seleção de pacientes e aspectos éticos da pesquisa	33
5.1.1. Critérios de inclusão e exclusão.....	34
5.2. Tipagem de HLA-B.....	34
5.3. Preparo do PRP.....	35
5.4. Caracterização do P-PRP.....	37
5.5. Tratamento com P-PRP autólogo.....	37
5.6. Avaliações sistêmicas.....	39
5.6.1. Perfil biológico.....	39
5.6.2. Quantificação celular.....	39
5.7. Critérios de avaliação.....	40
5.8. Análise Estatística.....	40

6. RESULTADOS.....	41
6.1. Casuística.....	41
6.2. Caracterização do P-PRP autólogo.....	43
6.2.1. Quantificação de plaquetas e leucócitos.....	43
6.2.2. Quantificação de fatores de crescimento.....	44
6.2.3. Quantificação de citocinas.....	46
6.3. Avaliação biológica dos pacientes de Behçet.....	48
6.3.1. Escore clínico.....	48
6.3.2. Tempo de cicatrização e número de úlceras orais.....	49
6.3.3. Avaliação da qualidade de vida (SF-36).....	51
6.3.4. Frequência celular.....	53
6.3.5. Avaliação sistêmica.....	57
6.3.5.1. Fatores de crescimento.....	57
6.3.5.2. Concentração das citocinas.....	59
7. DISCUSSÃO.....	62
8. CONCLUSÃO.....	74
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
10. ANEXOS.....	88
10.1. Anexo I – Termo de consentimento livre esclarecido.....	88
10.2. Anexo II – Parecer circunstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa.....	94
10.3. Anexo III - Formulário de atividade da doença de Behçet.....	95
10.4. Anexo IV - Versão brasileira do questionário de qualidade de vida.....	97
10.5. Anexo V- Registro de úlceras orais.....	101

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Behçet

A doença de Behçet (DB) é uma doença inflamatória sistêmica crônica que causa vasculite, com quadro clínico caracterizado principalmente por lesões aftosas orais e genitais, lesões de pele e alterações oculares. Outras manifestações clínicas da doença incluem o envolvimento do sistema nervoso central (SNC), do trato gastrointestinal (TGI), pulmonar e cardíaco. A doença apresenta períodos de remissão e exacerbação e sua sintomatologia pode variar de acordo com a localização geográfica (Gul, 2001; Hirohata e Kikuchi, 2003; Harman *et al.*, 2013).

O primeiro relato da doença foi feito em 1937, pelo dermatologista turco Hulusi Behçet, o qual descreveu a tríade que caracteriza a doença: inflamação ocular recorrente, ulcerações orais e genitais (Behçet, 1937).

A DB apresenta distribuição mundial bastante diversa, sendo mais comum nos países do Mediterrâneo, e em países do leste europeu. As taxas mais elevadas de prevalência são observadas em Instambul, na Turquia, com 400 casos por 100.000 adultos (Yazici, 2010; Azizleri *et al.*, 2003). A prevalência diminui em outros países, como por exemplo, na Espanha (6,4 casos por 100.000 adultos) e nos Estados Unidos (8,6 casos por 100.000 adultos). No Brasil ainda não há dados disponíveis.

A etiologia e patogênese ainda não foram totalmente elucidadas, porém a literatura relata a associação com o antígeno de histocompatibilidade HLA-B5, mais especificamente o seu subtipo HLA-B51, como maior fator genético para susceptibilidade à DB (Gul, 2001). Infecções virais (Herpes simples vírus (HSV-1)), algumas cepas de *streptococcus*, e fatores ambientais também desempenham papel na patogênese da doença. Além disso, estudos recentes têm demonstrado o envolvimento das células Th1, relacionadas à imunidade adquirida, bem como o sistema imune inato, em sua patogênese (Harman *et al.*, 2013; Khabbazi *et al.*, 2013).

Dentre os fatores de mau prognóstico destacam-se o gênero masculino, e o desenvolvimento precoce da doença, antes dos 25 anos (Harman *et al.*, 2013).

O diagnóstico da DB é essencialmente clínico, e sabe-se que sua sintomatologia varia de acordo com o grupo étnico estudado. O critério diagnóstico universalmente aceito e mais utilizado é o determinado pelo *International Study Group for Behçet Disease* (ISGBD) em 1990, apresentado na tabela 1. Este critério tem sensibilidade de 91%, e especificidade de 96% (Mat *et al.*, 2013). De acordo com este critério, para o paciente ter o diagnóstico da DB, o mesmo deve apresentar úlceras orais como critério obrigatório,

pelo menos três vezes ao ano, acompanhados de ao menos dois critérios menores. Em 2014 foram publicados os critérios diagnósticos da DB baseados em pontuação, onde a doença é diagnosticada se o paciente obtiver pontuação ≥ 4 . Este critério de diagnóstico está evidenciado na tabela 2.

Tabela 1: Critérios diagnósticos do ISGBD para doença de Behçet (1990).

CRITÉRIO	DESCRIÇÃO
Obrigatório Úlceras orais recorrentes	Úlceras orais maiores, menores ou herperiformes, observada por médico ou pacientes que tiverem pelo menos três episódios em um ano.
Menores Úlceras genitais recorrentes	Ulceração ou cicatriz observada por médico.
Lesão ocular	Uveíte anterior ou posterior ou células no humor vítreo observadas na lâmpada de fenda ou vasculite retiniana observada por médico (reumatologista).
Lesões cutâneas	Eritema nodoso observado por médico ou paciente, pseudofoliculite ou lesões pápulo-pustulosas ou acneiformes observadas por médico em paciente fora da adolescência ou quando esteja em uso de corticoesteróides.
Teste de patergia positivo	Observada por médico em 24-48 horas.

Tabela 2: Critérios diagnósticos ICBD (*International Criteria for Behçet's Disease*).

Critérios	Pontuação
Úlcera oral	2
Úlcera genital	2
Manifestações oculares	2
Manifestações articulares	1
Manifestações vasculares	1
Manifestações neurológicas	1
Teste de patergia	1

Doença de Behçet é diagnosticada se ≥ 4 pontos. (ICBD, 2014)

1.2. Etiologia e patogênese

1.2.1. Susceptibilidade Genética

Vários estudos demonstram que o HLA-B51 está fortemente associado à doença, em diferentes grupos étnicos. A região crítica para a doença de Behçet no gene do complexo principal de histocompatibilidade humano (MHC) compreende um segmento de 46 kb, entre o gene MHC classe I ligada às cadeias do gene MIC-A e o gene HLA-B (Hirohata e Kikuchi, 2003). Defeitos genéticos nessa região comumente resultam em atividade inflamatória crônica de baixo grau, que se exacerba de forma intermitente, determinando o quadro clínico da doença.

O aumento da resposta inflamatória com aumento das funções de neutrófilos, tais como quimiotaxia, fagocitose, e produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROS), e a superexpressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-8, IL-17, IFN- γ , são os achados proeminentes, responsáveis pelos danos na DB (Shahneh *et al.*, 2013).

Recentemente, uma meta-análise (Liang *et al.*, 2013) buscou associar polimorfismos encontrados em várias citocinas (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-10), com a susceptibilidade para DB. Os polimorfismos: -308A/G do TNF- α , e -1082G/A e -819C/T da IL-10 apresentaram uma associação significativa para a susceptibilidade à doença (Liang *et al.*, 2013).

Estudos de associação genômica ampla (GWAS) identificaram *loci* de susceptibilidade para a DB nos receptores da IL-23 (IL23R), e da IL-12 subunidade β 2 (IL12RB2) e na IL-10 (Sugita *et al.*, 2013).

1.2.2. Anormalidades imunológicas

Vários estudos sugerem que na DB há um predomínio da resposta imune de células Th1 e Th17, encontradas em maior número no sangue periférico; e também pelo aumento dos níveis de citocinas relacionadas, como IFN- γ , IL-12, TNF- α e IL-17. A atividade da doença é caracterizada pelo aumento da IL-17, quando comparada à doença em remissão ou controles. Os linfócitos Th17 circulantes estão envolvidos na ativação de neutrófilos (Sugita *et al.*, 2013; Neves e Spiller, 2013).

Estudos recentes descreveram o aumento dos níveis de IL-22 no humor vítreo de pacientes com uveíte autoimune não infecciosa. As células Th22 são um subtipo de TCD4⁺ efetora, que primeiramente secretam IL-22 e TNF- α . Similar às células Th17, as células Th22 secretam IL-22, mas não IL-17 (marcador de Th17), IL-4 (marcador de

Th2), ou IFN- γ (marcador de Th1). As células TCD4⁺ diferenciam-se em células Th22 na presença de IL-6 e TNF- α , e a produção de IL-22 promove uma resposta inflamatória nos pacientes (Sugita *et al.*, 2013).

As células *natural killer* (NK) são precursores linfoides com atividade citotóxica, e também são capazes de produzir IL-17 e parecem regular a resposta Th1, em relação ao estado da DB (ativo ou inativo). As células NK do estado inativo suprimem a expressão do receptor da IL-12 e do IFN- γ das células TCD4⁺. Pela supressão do IFN- γ , estas células podem também regular negativamente a diferenciação de Th17, reduzindo o recrutamento de neutrófilos (Neves e Spiller, 2013). Inicialmente envolvidas na imunidade inata, e devido à secreção de citocinas e interleucinas também apresentam envolvimento na imunidade adquirida (Zhang *et al.*, 2006). Em 2010, Yamaguchi e colaboradores publicaram um estudo avaliando a célula NK e seu estado de ativação através de citometria de fluxo com o marcador CD69, um marcador de ativação recente de linfócitos, encontrando uma frequência significativamente elevada em pacientes em atividade quando comparados à inatividade.

As células T de pacientes com DB são hipersensíveis para uma variedade de antígenos, e isto foi demonstrado quando de sua estimulação para produzir IFN- γ na presença de baixas concentrações de enteroxina B de *Staphylococcus* e SEC1, que não são capazes de estimular células T de indivíduos saudáveis. Estes achados sugerem que antígenos de origem microbiana podem funcionar como um gatilho da resposta autoimune na DB, em indivíduos geneticamente susceptíveis, além de justificar os recorrentes períodos de remissão e exacerbação da resposta inflamatória, característicos do curso da doença. Além do mais, as proteínas de choque térmico (HSP) estreptocócicas apresentam homologia com o HSP humano, que podem contribuir para a patogênese da doença, devido à resposta imunológica exacerbada após reconhecimento pelas células T (Hirohata e Kikuchi, 2003; Neves e Spiller, 2013).

Em 1995, Sakaguchi et al. identificaram uma sobpopulação de células TCD4⁺ que expressam a cadeia α (CD25) do receptor da IL-2, denominadas células T reguladoras (Treg) (Sakaguchi *et al.*, 1995). As populações celulares de Treg são heterogêneas e previnem a resposta imune prejudicial dirigida a autoantígenos e não-autoantígenos. Estas células emergem do timo como parte normal do desenvolvimento de linfócitos T, e residem nos tecidos periféricos, onde mantêm a autotolerância, e previnem a autoimunidade através da inibição dos linfócitos auto-reativos. A proteína *Forkhead Box P3* (FoxP3) é considerada o marcador específico para Treg. Estas células desempenham

um importante papel na patogênese de doenças autoimunes, sendo que alterações na proporção destas células no sangue periférico, ou defeito supressivo de sua função *in vitro*, tem sido reportado na esclerose múltipla, diabetes tipo I, DB, entre outras (Kim *et al.*, 2012; Shim *et al.*, 2011). O papel dessas células parece ser tão relevante, que alguns autores sugerem sua infusão no tratamento dessas doenças (Sakaguchi *et al.*, 2001).

Em relação aos neutrófilos, estas células de pacientes da DB apresentam uma quimiotaxia aumentada quando incubados com plasma humano, sugerindo que fatores solúveis presentes no plasma são necessários para a hiperquimiotaxia (Neves *et al.*, 2009). Em lesões oculares, intestinais, neurológicas e perivasculares foi verificado um infiltrado inflamatório composto principalmente de neutrófilos e linfócitos, justificando assim seu papel relevante na patogênese (Matsuo *et al.*, 2002; Hayasaki *et al.*, 2004; Borhani *et al.*, 2007).

A reação de patergia é uma reação de hipersensibilidade cutânea não-específica, praticamente única na DB. O teste de patergia é realizado através da inserção de uma agulha no antebraço do paciente após desinfecção com álcool, observando-se a formação de uma pápula ou pústula. Ao contrário da DB, o indivíduo normal não apresenta essas lesões. A histologia de amostras de pele de pacientes com DB, coletadas 4 e 24 horas após o teste de patergia, revela inicialmente a presença de neutrófilos, que são posteriormente substituídos por um infiltrado perivascular de células mononucleares (linfócitos T, monócitos/macrófagos), e 5% de neutrófilos (Fresko *et al.*, 1993; Neves e Spiller, 2013).

1.3. Manifestações clínicas

As manifestações clínicas da doença são diversificadas, variando de acordo com o grupo étnico estudado. As manifestações gastrointestinais são mais comuns no Japão e nos Estados Unidos da América (EUA), e turcos apresentam mais lesões oculares do que os pacientes de etnia alemã (O'Neil *et al.*, 1993; Zouboulis *et al.*, 1997).

Um estudo realizado em uma população brasileira, da região metropolitana de Campinas, incluiu 87 pacientes acompanhados no Hospital das Clínicas da UNICAMP, demonstrando a prevalência das manifestações clínicas (Sachetto *et al.*, 2012), representadas na tabela 3.

Tabela 3: Frequência das manifestações clínicas dos pacientes acometidos com DB em uma população da região metropolitana de Campinas.

N=87		
Sintomas	Número de pacientes	%
Úlceras orais	87	100
Oculares	70	80,46
Úlceras genitais	67	77,01
Cutâneos	58	66,77
Sistema Nervoso Central	27	31,03
Artralgia	27	31,03
Artrite	12	13,79
Vasculares	12	13,79

Os pacientes homens e jovens tem um curso da doença mais grave, e maior risco de desenvolver complicações, quando comparados com pacientes do gênero feminino em idade mais avançada. O envolvimento vascular, ocular e neurológico são as causas mais graves de morbimortalidade (Kural-Seyahi *et al.*, 2003; Saadoun *et al.*, 2010).

1.3.1. Lesões muco-cutâneas

A estomatite aftosa recorrente é um dos sinais mais comuns da DB, com alta frequência (Yurdakul e Yazici, 2008). A afta pode ser observada em qualquer superfície da mucosa não queratinizada da cavidade oral; geralmente inicia-se como pápula dolorosa, e rapidamente torna-se ulcerada. As lesões mais comuns são as chamadas lesões aftosas menores, que apresentam um diâmetro inferior a 10 mm e costumam cicatrizar entre 7 a 10 dias, normalmente sem a formação de cicatriz (Mat *et al.*, 2013).

As úlceras genitais em homens são mais comumente encontradas no escroto e na área inguinal, e em mulheres na vulva e nas regiões femoral e inguinal. As lesões iniciam-se como pápulas, evoluindo para pústulas ou necrose, formando as lesões ulceradas. Estas lesões cicatrizam em torno de 2 a 4 semanas (Mat *et al.*, 2013).

O eritema nodoso é usualmente encontrado nas extremidades inferiores, caracterizado por nódulos vermelhos e doloridos de 1 a 5 cm de diâmetro, geralmente observado em mulheres, e sua cura ocorre em torno de 1 a 6 semanas, acompanhado por pigmentação (Mat *et al.*, 2013).

1.3.2. Comprometimento ocular

O envolvimento ocular na DB ocorre com alta frequência, e geralmente é bilateral (63 a 100% dos casos). Em geral, as primeiras crises são unilaterais e anteriores. A partir daí as recorrências comprometem o segmento posterior e se tornam bilaterais. A uveíte é o sintoma mais característico, e manifesta-se por uma diminuição súbita da acuidade visual, associada à hiperemia e dor periorbital de intensidade variável. A uveíte posterior, presente em 32-53% dos casos, é a forma mais grave, e pode comprometer o prognóstico funcional. Ocorrem focos de retinite branco-amarelados, hemorragia, em número e localização variáveis. A presença desses focos pode estar associada com uma diminuição da acuidade visual, quando localizadas na região macular (Zeghidi *et al.*, 2014).

1.3.3. Manifestações neurológicas

O acometimento neurológico na DB é caracterizado por lesões parenquimatosas neurais primárias (Síndrome de neuro-Behçet), ou pelo envolvimento vascular (Hirohata e Kikuchi, 2003). As lesões parenquimatosas caracterizam-se por lesões morfológicas de natureza inflamatória e de pequeno porte, principalmente no tronco cerebral e da junção meso-diencefálica à ressonância magnética (RMI). As lesões vasculares podem ter uma ampla manifestação clínica, identificadas morfolologicamente por angioressonância magnética ou angio-tomografia. Clinicamente, os sintomas mais representativos são: cefaléia (> 50% dos casos), seguido por uma síndrome piramidal unilateral ou bilateral (50-90%), ataxia cerebelar, e alterações de controle dos esfíncteres (25-40%). Este envolvimento difuso do parênquima cerebral pode também assumir a forma de encefalite, com retardo psicomotor e distúrbios de comportamento (Noel *et al.*, 2014).

1.3.4. Manifestações vasculares

O envolvimento vascular ocorre mais frequentemente em homens, e é a maior causa de morte em pacientes jovens (Koç *et al.*, 1992), e caracteriza-se por tromboflebite, trombose venosa profunda, oclusão e aneurisma de grandes artérias. O envolvimento venoso é mais frequente (20-40%) em relação ao arterial (Harman *et al.*, 2013). A associação com trombofilia hereditária, presença de anticorpos antifosfolipídios, ou alteração da fibrinólise foi investigada, mas os resultados são conflitantes.

O mecanismo responsável pela trombose nesses pacientes ainda não foi totalmente definido. Alteração da função plaquetária, hiperviscosidade, alteração da deformabilidade eritrocitária podem estar envolvidos. Acredita-se que a ativação endotelial ligada à

vasculite neutrofílica tenham um papel chave nesse processo trombótico (Chambrun *et al.*, 2012).

1.4. Tratamento

O tipo de tratamento depende do tipo e gravidade dos sintomas, duração da doença, idade e gênero do paciente.

A colchicina tem sido usada devido ao seu efeito inibitório sobre as funções dos neutrófilos, resultando em melhora da artralgia, eritema nodoso e úlceras genitais. Os efeitos colaterais como náusea, dor abdominal e diarreia são mínimos. Contudo, a inibição dos neutrófilos pela colchicina pode não ser suficiente para tratar as manifestações mais graves (Mat *et al.*, 2013; Hirohata e Kikuchi, 2003).

A azatioprina (AZA) foi testada em pacientes homens, para tratar lesões oculares e muco-cutâneas (Yazici *et al.*, 1990). A AZA diminuiu significativamente os surtos de uveíte, e o desenvolvimento de outras doenças oculares, preservando a acuidade visual. Ela também foi efetiva no controle de úlceras orais e genitais, e na artrite e nenhum efeito colateral sério foi atribuído ao seu uso (Hamuryudan *et al.*, 1997; 2002).

A talidomida foi estudada para o tratamento de úlceras genitais e orais em pacientes do gênero masculino, com redução da repetição dos eventos, e esteve associada a um aumento de eritema nodoso nos 2 primeiros meses de uso. Os efeitos adversos do uso da talidomida são: polineuropatia, teratogênese e sedação. (Hamuryudan *et al.*, 1998; Mat *et al.*, 2013).

A ciclosporina A, um inibidor da função de células T, é usualmente o medicamento de primeira linha utilizado para tratar os sintomas de envolvimento ocular, como uveíte, e vasculite da retina. Seu uso diminui a gravidade e a frequência de acometimentos oculares, e melhora a acuidade visual, além de possuir efeitos benéficos nas lesões muco-cutâneas. Na prática clínica são utilizadas baixas doses devido aos seus efeitos colaterais como hipertensão, comprometimento renal e neurotoxicidade (Masuda *et al.*, 1989; Hirohata e Kikuchi, 2003).

Apesar dos corticóides serem amplamente utilizados na DB, existe apenas um estudo com a inclusão de um grupo controle placebo, e observou-se apenas melhora nas lesões de eritema nodoso em mulheres (Mat *et al.*, 2006).

O uso de agentes biológicos apresentam resultados promissores em pacientes que são resistentes ao tratamento convencional. O IFN- α diminuiu as lesões muco-cutâneas, e uma resposta parcial ou total da uveíte. Suas limitações incluem alto custo, frequentes

efeitos colaterais como artralgia, reações no sítio de injeção, febre, leucopenia, alopecia, e depressão (Deuter *et al.*, 2010; Onal *et al.*, 2011).

O bloqueador de TNF- α (infliximab) foi testado em um estudo controlado placebo, com eficácia na maioria das lesões muco-cutâneas em homens. Contudo, trata-se de um medicamento de alto custo e com efeitos colaterais, como o aumento do risco de infecções bacterianas e tuberculose (Melikoglu *et al.*, 2005, Sfikakis *et al.*, 2007).

Apesar do grande progresso nas últimas décadas para controlar as manifestações oculares, muco-cutâneas e de articulações, mais estudos randomizados controlados são necessários para avaliação da eficácia no controle dos outros sintomas presentes na DB (Mat *et al.*, 2013).

O custo anual de um paciente com DB é de US\$ 3226 \pm 3488, porém quando ocorre o envolvimento neurológico este custo é bem maior – US\$ 5005 \pm 2707 (Sut *et al.*, 2007).

Os novos estudos na busca de tratamentos utilizando imunobiológicos ainda possuem muitas limitações, como alto custo e efeitos colaterais importantes. Portanto, a busca de novos tratamentos, de baixo custo, com menores efeitos colaterais e que auxiliem no controle imunológico são um desafio, com grande valia na prática clínica. A tabela 4 sintetiza os principais tratamentos utilizados no tratamento da DB.

Tabela 4: Tratamentos disponíveis na DB.

Fármaco	Efeito principal / Indicação	Efeito colateral
1- Colchicina	Inibe função neutrófilo	Náusea, diarreia e dor abdominal
2- Azatioprina	Diminui surtos de uveíte	Mínimo de 3 meses
3- Talidomida	Úlceras orais/genitais resistentes	Polineuropatia, teratogênese e sedação
4- Ciclosporina	Inibidor função da célula T – envolvimento ocular	Hipertensão, comprometimento renal e neurotoxicidade
5- Corticoides	Artralgia, comprometimento ocular	Diminuição da produção dos hormônios naturais corticoides, osteoporose, ganho de peso, azia persistente e hipertensão
Tratamentos biológicos		
1-IFN- α	Lesões muco-cutâneas, resposta parcial em uveíte	Alto custo, artralgia, febre, leucopenia, alopecia e depressão
2- Bloqueador de TNF- α	Lesões muco-cutâneas	Alto custo, risco de infecções

Portanto, a busca por um novo tratamento biológico de baixo custo e efeitos colaterais menores, torna-se de grande valia na prática clínica.

1.5. Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

O PRP é definido como um concentrado de plaquetas acima do valor basal em um pequeno volume de plasma (cerca de 4-7 vezes a concentração normal de plaquetas) (Eppley *et al.*, 2006; Marx, 2004). A metodologia de preparo do PRP é muito diversa, e nenhuma padronização de força ou tempo de centrifugação foi definido para uso comum em todas as suas aplicações clínicas (Liao *et al.*, 2013).

O PRP tem mostrado resultados positivos no tratamento da osteoartrite, degeneração de cartilagem, condropatia e úlceras crônicas (Patel *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2011; Torrero *et al.*, 2012; Sarvajnamurthy *et al.*, 2013). Além disso, o PRP tem atraído atenção para aplicações em outras áreas, como doenças em que a fisiopatologia imune está envolvida.

As plaquetas contêm os α -grânulos e os grânulos densos, sendo que, já foram descritos mais de 1100 biomoléculas incluindo fatores de crescimento, mensageiros do sistema imune, enzimas, inibidores enzimáticos e outros componentes bioativos (Andia e

Abate, 2013; Arnoczky e Sheibani-Rad, 2013). Dentre os fatores de crescimento destacam-se nas publicações: fator de crescimento derivado das plaquetas e seus isômeros (PDGF-AA, PDGF-BB e PDGF-AB), fator de transformação do crescimento (TGF- β 1 e TGF- β 2), fator de crescimento derivado do endotélio vascular (VEGF) e fator de crescimento epitelial (EGF), entre outros (Eppley *et al.*, 2006). As plaquetas e os fatores de crescimento liberados são essenciais para regular os eventos celulares que ocorrem após um dano tecidual. Elas aderem, agregam, ativam a coagulação, culminando com a formação da malha de fibrina, e subsequentemente liberam uma grande variedade de fatores de crescimento e citocinas (Lippress *et al.*, 2011).

Além disso, é evidente o papel mais abrangente das plaquetas, não limitado apenas às suas funções hemostáticas. As plaquetas participam do processo de inflamação, liberando diferentes substâncias que são capazes de modular a resposta inflamatória via interação com células endoteliais e leucócitos. Os principais imunomoduladores descritos são: PDGF, TGF- β , ligante de CD40 solúvel (sCD40L) e o fator plaquetário 4 (PF4/CXCL4) (Cognasse *et al.*, 2006). O TGF- β é o principal imunossupressor e evidências sugerem que a diferenciação de Treg é dependente de TGF- β . Isto foi sugerido quando pacientes com trombocitopenia imune, os quais apresentam diminuição de células Treg e TGF- β , foram tratados com terapias que aumentam o número de plaquetas (ex: imunoglobulina, dexametasona), e observou-se a restauração funcional e quantitativa de células Treg (Semple *et al.*, 2011).

Além do mais, CD154 que é expresso em plaquetas ativadas pode afetar a imunidade adaptativa. Este receptor pode dar suporte à diferenciação de células B e promove resposta protetora a infecções mediada por células T (Semple *et al.*, 2011). CD40L é expressa primeiramente em células T ativadas e plaquetas, sendo uma molécula transmembrana que desempenha um importante papel na resposta imune inata e adaptativa. As formas solúveis de CD40L (sCD40L) possuem a habilidade de formar trímeros, os quais sinalizam vários processos biológicos através da ligação a receptores, incluindo CD40 nas células apresentadoras de antígeno (Elgueta *et al.*, 2009). As plaquetas são responsáveis por 95% da concentração de C40L solúvel na circulação (Andre *et al.*, 2002). O CD40L solúvel tem sido reportado em várias patologias imune mediadas, incluindo a DB, por ser um mediador da inflamação, devido à indução da produção de citocinas e ativação das proteínas de adesão celular (Toubi e Shoenfeld., 2004, Menchén *et al.*, 2009; Lievens *et al.*, 2009). São encontrados níveis aumentados de sCD40L em pacientes com síndromes coronarianas agudas, lúpus eritematoso sistêmico

e doenças inflamatórias intestinais (Garlich *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 1999; Danese *et al.*, 2004).

O PF4/CXCL4 humano é uma proteína da família de quimiocinas CXC, que se liga à heparina e é secretado dos α -grânulos após a ativação plaquetária (Luster, 1998). A literatura é contraditória quanto às suas propriedades pró e anti-inflamatórias. Estudos reportaram que esta proteína tem se mostrado inibidor de alguns processos como: de proliferação de progenitores hematopoiéticos e de células endoteliais e angiogênese (Strieter *et al.*, 1995; Broxmeyer *et al.*, 1993). Além disso, PF4/CXCL4 tem demonstrado forte inibição da proliferação de células T, bem como IFN- γ e IL-2 liberados pelas células T isoladas (Fleischer *et al.*, 2002). Liu e colaboradores (2005) publicaram um estudo sobre o papel do PF4/CXCL4 nas células T CD4+ e CD25+, evidenciando que esta proteína causa uma perda da função regulatória deste tipo celular, *in vitro*. Alguns estudos demonstraram que o PF4/CXCL4 auxilia no tráfego das células T, e outros estudos *in vitro* tem sugerido uma função no desenvolvimento de Treg (Srivastava *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2005). Shi e colaboradores (2014) propuseram um novo papel para PF4/CXCL4 na manutenção da homeostase das células Th, limitando seu desenvolvimento e resposta da célula Th17, sugerindo assim que as plaquetas apresentam papel imunológico importante.

VEGF é uma potente citocina que modula angiogênese e vasculogênese devido à sua ação mitogênica para células endoteliais (Keyt *et al.*, 1996). Além disso, tem a capacidade de induzir aumento da permeabilidade microvascular e vasodilatação dependente do endotélio, bem como produção endotelial de NO (Xiong *et al.*, 1998; Detmar *et al.*, 1995; de Vriese *et al.*, 2001). Ele pode ser produzido por vários tipos celulares incluindo macrófagos, monócitos, neutrófilos e células endoteliais (Xiong *et al.*, 1998; Ladoux *et al.*, 1993). Um forte estímulo para a produção de VEGF é a presença de citocinas pró-inflamatórias, e ao mesmo tempo o VEGF pode promover processo inflamatório pela mobilização de leucócitos (Takagi *et al.*, 1996; Grutzkau *et al.*, 1998). Os receptores de membrana para VEGF estão localizados nas células vasculares endoteliais sistêmicas e retinianas. Aumento dos níveis circulantes no soro ou plasma tem sido detectado em câncer, doenças reumáticas e inflamatórias crônicas (Folkman, 1995). Na literatura há poucos estudos relacionando VEGF e DB.

Nenhum estudo clínico avaliou o efeito imunomodulador do PRP. Contudo, algumas alterações sistêmicas podem sugerir esse papel. Um estudo em modelo animal (Lippross *et al.*, 2011) que utilizou o PRP intra articular para o tratamento de artrite reumatoide experimental, demonstrou um efeito sistêmico nas concentrações dos

marcadores inflamatórios, com a redução de IL-6, VEGF, IGF-1 e IL-1. A análise proteica do PRP revelou uma baixa concentração de IL-1 α , a qual é considerada uma citocina clássica do catabolismo pró-inflamatório, justificando o uso do PRP com propósito anti-inflamatório. A IL-6, encontrada em maior quantidade no PRP, tem múltiplos papéis na regeneração e inflamação, e é considerada um modulador imune (Lippross *et al.*, 2011).

Existem vários estudos *in vitro* avaliando a substituição do soro fetal bovino por lisado plaquetário, alguns com avaliação do potencial imunorregulador derivado do lisado de plaquetas. Menard e colaboradores (2013) analisaram subtipos de célula tronco mesenquimal (MSC) e sua suplementação comparando 2 tipos de cultivo (MSC com lisado de plaqueta ou com soro fetal bovino), e 2 fontes celulares (MSC derivada da medula óssea ou de gordura). Foi evidenciado que a cultura contendo células MSC derivadas de gordura suplementadas com lisado de plaquetas aumentou os níveis de IDO e TSG-6. O primeiro tem efeito central na função supressora de célula T e o TSG-6 diminui o recrutamento de neutrófilos. Bendinelli e colaboradores (2010) avaliaram os efeitos anti-inflamatórios do PRP numa cultura de condrócitos e demonstraram uma redução na atividade de NF-kB, um regulador crítico do processo inflamatório e consequente diminuição da expressão dos genes de COX2 e CXCR4. Os autores relatam que as moléculas chave envolvidas nos efeitos inibitórios do PRP foram o fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e TNF- α . Desta forma, existem algumas evidências que sugerem que o PRP possa ter um papel como imunomodulador e portanto estas citocinas devem ser mensuradas.

Em relação a efeitos colaterais e riscos, não há relatos na literatura de qualquer efeito prejudicial relacionado ao PRP, incluindo a sensibilização por aplicações recorrentes. Contudo, é importante ressaltar que por se tratar de terapia biológica celular deve se sempre estar atento a possibilidade de indução de tumores.

2. JUSTIFICATIVA

A DB é uma doença rara, imuno mediada potencialmente grave e crônica.

A DB gera altos custos para o sistema de saúde, que aumentam quando ocorre o envolvimento neurológico, uma manifestação clínica com incidência significativa elevada, em nossa população.

O tratamento da DB utiliza medicamentos que apresentam limitações relativas à eficácia, efeitos colaterais, e muitas vezes com custo elevado, e a busca por um novo

tratamento biológico de baixo custo torna-se de grande valia. No contexto da imunomodulação, o PRP pode representar uma opção terapêutica.

3. HIPÓTESES

- O PRP de pacientes com DB pode apresentar diferenças em relação a indivíduos saudáveis, e também entre os pacientes, sendo importante sua caracterização.
- O PRP, ao estimular as células Treg, pode contribuir para o controle das alterações imunológicas observadas em pacientes com DB.

4. OBJETIVOS:

4.1. Geral

Caracterizar o PRP de pacientes com DB e úlceras em atividade, e avaliar seus efeitos como imunomodulador através de aplicação subcutânea.

4.2. Específicos

- Verificar o HLA *locus* B dos pacientes com DB;
- Caracterizar o PRP dos pacientes com DB e úlceras em atividade através da avaliação de fatores de crescimento (PDGF, VEGF, EGF, TGF- β), citocinas e interleucinas;
- Analisar os efeitos da aplicação subcutânea de PRP autólogo em pacientes com DB, através de questionários de atividade da doença e qualidade de vida;
- Analisar o perfil sistêmico de citocinas, interleucinas e frequência celular de subtipos T e NK, antes e sequencialmente até o período de um ano de seguimento pós-aplicação do PRP.

5. METODOLOGIA

5.1. Seleção dos pacientes e aspectos éticos da pesquisa

Este foi um estudo piloto prospectivo com follow-up de 1 ano. Foram revisados todos os prontuários médicos dos pacientes com diagnóstico de DB atendidos no Ambulatório de Vasculites do Hospital das Clínicas/Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (HC/FCM-UNICAMP), no período de fevereiro de 2014 a agosto de 2015. O diagnóstico de cada paciente foi revisado de acordo com os critérios para DB estabelecidos pelo ISGBD.

Os prontuários dos pacientes foram analisados, retrospectivamente, em relação ao gênero, critérios diagnósticos, idade de início dos sintomas, idade do diagnóstico da DB,

frequência das manifestações clínicas apresentadas no início e/ou no decorrer da DB e exames laboratoriais.

Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (anexo I) aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa humana (anexo II), os pacientes foram submetidos à rotina de exame reumatológico. O protocolo clínico laboratorial incluiu dados de identificação, história da doença, uso de medicamentos, antecedentes pessoais e familiares, exame físico referente aos vários órgãos e sistemas e a realização dos exames laboratoriais de rotina: hemograma, determinação do VHS (Wintrobe), urina I, dosagem da uréia, creatinina, aminotransferases e sorologias para hepatites B, C e HIV.

5.1.1. Critérios de inclusão e exclusão

A partir da análise clínico laboratorial foram selecionados os pacientes de acordo com os seguintes critérios de inclusão: diagnóstico confirmado de DB de acordo com ISGBD; recorrência mínima de três episódios de atividade da doença no último ano, presença de úlceras orais/genitais, sem uso de corticóide ou no máximo com 10 mg diários (prednisona).

Os critérios de exclusão foram: acometimento do sistema nervoso central e/ou quadro ocular em atividade, alterações hematológicas ou renais, antecedente de neoplasia nos últimos 5 anos, uso de corticóides em doses diárias acima de 10 mg e uso de anticoagulantes.

5.2. Tipagem de HLA-B

A tipagem de HLA *locus* B foi realizada utilizando-se o kit de DNA SSP Classe I *locus* específico B (*One Lambda, Thermo Fisher, California*). Para isto uma amostra de sangue periférico foi colhida em tubo EDTA e foi feita a extração de DNA por meio do *Illustra Blood genomicPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare, Reino Unido). Após a extração, foi feita a quantificação do DNA por meio do Nanodrop, onde a relação 260/280 acima de 1,8 foi definida para todas as amostras. Posteriormente, as amostras foram adicionadas ao kit e foi feita a identificação de positividade das amostras, de acordo com as instruções do fabricante.

5.3. Preparo do PRP

O PRP preparado foi o P-PRP, isto é, PRP pobre em leucócitos. O sangue dos pacientes foi coletado através de punção venosa em 6 tubos de 8,5 mL com anticoagulante ácido citrato dextrose (ACD), um tubo de 4,0 mL para o hemograma, contendo o anticoagulante EDTA e um tubo seco de 8,0 ml. Esta quantidade de 63 ml foi coletada a cada aplicação de PRP.

O PRP foi preparado por dupla centrifugação (Amable *et al.*, 2013). Após a primeira centrifugação, a 300 x g por 5 minutos, o plasma foi coletado sem a camada leucocitária (*buffy coat*), deixando aproximadamente 1 cm acima das hemácias. O plasma foi distribuído em tubos falcon estéreis de 15 ml, e centrifugado novamente, a 700 x g por 17 minutos, para concentrar as plaquetas. Foram retirados 80% da parte superior do volume do plasma, correspondente ao plasma pobre em plaquetas (PPP) e os 20% de plasma restante no tubo na parte inferior, juntamente com o pellet de células, foi homogeneizado com *abocath* 14G e transferidos para uma seringa de 5 ml. A figura 1 demonstra as etapas de preparo do P-PRP. Ao final, após a obtenção do PRP, uma alíquota foi retirada para verificar a concentração de plaquetas e leucócitos, comparando com o valor basal obtido no tubo de hemograma. O sangue coletado no tubo seco (sem anticoagulante) foi centrifugado a 1560 x g por 15 minutos para obtenção do soro. Após a centrifugação, 1 ml foi adicionado à seringa de 3 ml e utilizado como ativador do P-PRP, sendo misturado com o P-PRP na proporção de 1:6 (0,5 ml de soro para 2,5 ml de P-PRP) no momento da aplicação.

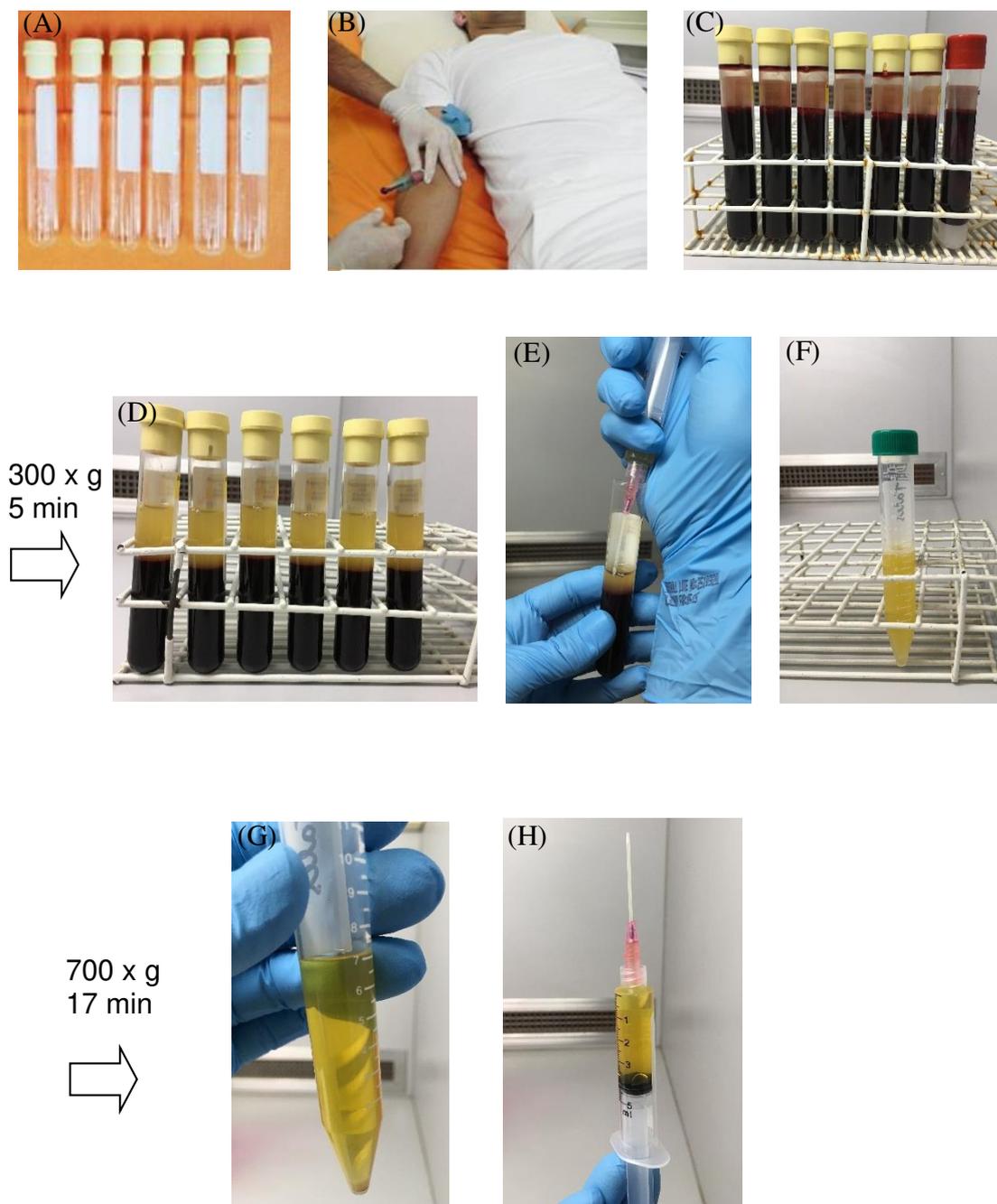


Figura 1: Esquema do preparo de P-PRP, produzido *in house*. A) Tubos contendo anticoagulante ACD separados para coleta; B) Punção venosa para coleta de sangue; C) Tubos após a coleta de sangue periférico; D) Tubos após a primeira centrifugação a 300 x g por 5 minutos, evidenciando a separação do plasma (porção superior), hemácias (porção inferior) e uma camada intermediária constituída de células brancas (buffy-coat); E) Retirada do plasma com seringa e abbocath, evitando a retirada da camada de buffy-coat; F) Tubo falcon estéril com todo o plasma dos tubos ACD; G) Plasma após a segunda centrifugação a 700 x g por 17 minutos, evidenciando o pellet de células na porção inferior do tubo; H) Ressuspensão do pellet de células com 20% do volume do plasma total, constituindo assim o P-PRP, adicionado a seringa.

5.4. Caracterização do P-PRP

A caracterização do P-PRP incluiu a contagem de plaquetas e leucócitos (em todas as coletas), concentração de citocinas no P-PRP basal, e no preparado após 3 meses e 6 meses do início do tratamento.

Os fatores de crescimento PDGF-AA, VEGF, EGF, TGF- β 1 foram mensurados através da tecnologia de Luminex (Millipore). Para todas essas dosagens foi seguido o protocolo do fabricante. O TGF- β 1 necessita de um preparo das amostras que inclui a acidificação com HCl previamente a sua quantificação, identificando assim a forma ativa.

As interleucinas IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-21, as citocinas TNF- α , IFN- γ e o CD40L foram quantificados pela plataforma CBA (*Cytometric Bead Array*) de sensibilidade alta (fg/mL) e normal (pg/mL). Os métodos foram empregados de acordo com o custo das técnicas e os kits de alta sensibilidade foram utilizados sempre que disponíveis (TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-8, IL-10, IL-12). Para a dosagem de todas estas citocinas no P-PRP, não foi realizada a ativação destas amostras com soro dos pacientes. No momento de preparo do P-PRP uma alíquota foi armazenada em biofreezer para posterior leitura.

5.5. Tratamento com P-PRP autólogo

As primeiras seis aplicações do PRP autólogo foram realizadas com intervalo de 15 dias entre cada aplicação, totalizando um período de três meses de tratamento. Posteriormente, foram realizadas mais 3 aplicações, com intervalo de 30 dias, completando um período de 6 meses de tratamento. Os pacientes foram acompanhados por 12 meses após a primeira aplicação, sendo avaliados a cada 3 meses.

A figura 2 evidencia o desenho do tratamento com P-PRP.

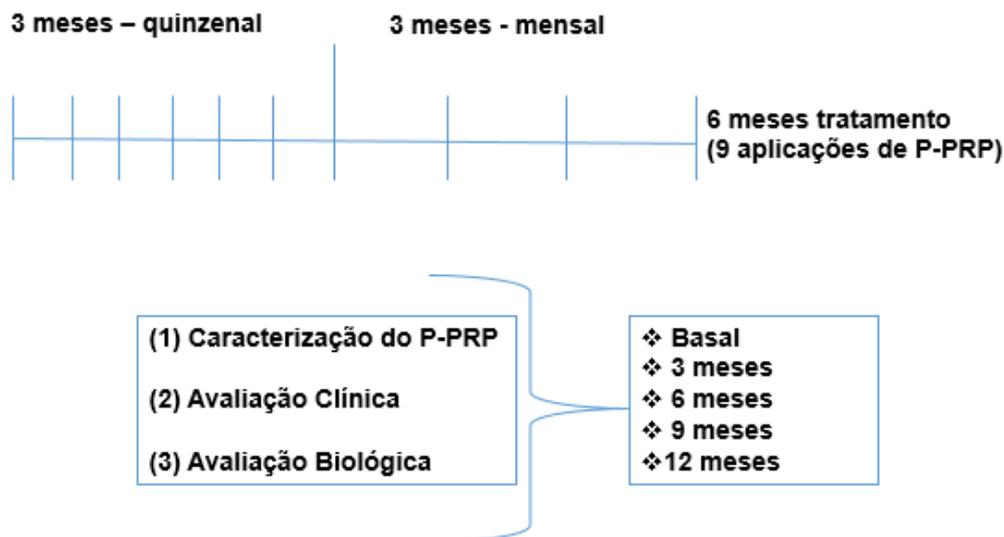


Figura 2: Desenho do estudo apresentando esquema de aplicação e avaliação clínica, biológica e a caracterização do P-PRP dos pacientes com DB.

O volume total empregado foi de 3,0 ml, sendo 2,5 ml de P-PRP e 0,5 ml de soro autólogo utilizado como ativador, injetado por via subcutânea na região periumbilical, de forma lenta (figura 3). A via subcutânea foi escolhida por já ser utilizada em outros protocolos com outros medicamentos e pela segurança, uma vez que a via endovenosa poderia ter o risco de injeção de grumos plaquetários. O paciente foi liberado imediatamente após a aplicação.



Figura 3: Aplicação periumbilical do P-PRP em pacientes de DB.

5.6. Avaliações Sistêmicas

5.6.1. Perfil Biológico

A quantificação das citocinas avaliadas no P-PRP foi realizada em amostras de plasma dos pacientes antes do uso do P-PRP e a cada 3 meses, até completar 12 meses após a primeira aplicação (basal, três meses, seis meses, nove meses e doze meses). A metodologia foi a mesma empregada no P-PRP. Para isto, foram coletados dois tubos em citrato 3,8%, seguindo as instruções do fabricante dos kits (plasma citratado ou EDTA).

5.6.2. Quantificação celular

Nos 5 tempos já definidos (basal, três meses, seis meses, nove meses e doze meses) foi coletada amostra de sangue periférico em tubo de heparina para quantificação celular através da citometria de fluxo. O protocolo foi padronizado para quantificação de populações de células TCD4, TCD8, NK, NK ativada (CD69) e Treg. A 100 µl de sangue total adicionados a cada tubo previamente identificado, foram adicionados 1:50 (2 µl) dos respectivos anticorpos, conforme descrito na tabela a seguir (tabela 5), e incubados por 30 minutos a 4 °C, protegidos da luz. Todos os anticorpos utilizados foram da BD Pharmigen (BD Biosciences, Nova Jersey, EUA).

Tabela 5: Anticorpos utilizados para identificação fenotípica celular através citometria de fluxo.

Tubos	Anticorpos e Fluorocromos
Branco	-
Branco Permeabilizado	-
TCD4/ CD8	CD45 Percp, CD3 FITC, CD4 APC, CD8 PE (1:200 ; 0,5 µl)
NK	CD45 Percp, CD3 FITC, CD16 APC (1:10; 10 µl), CD56 PE (1:10; 10 µl)
NK ativada	CD3 FITC, CD56 PE, CD69 APC (1:6; 15 µl)
Treg	CD45 FITC, CD4 Percp, CD25 PE, FoxP3 APC*

* FoxP3 foi adicionado ao tubo apenas após realização do protocolo de permeabilização

As células foram lavadas com tampão fosfato (PBS) e centrifugadas, e foi adicionado o tampão de lise de hemácias (BD FACS Lysing – BD Biosciences, Nova Jersey, EUA). As células foram incubadas por 15 minutos em banho de gelo e protegidos da luz. Após 15 minutos, as células foram lavadas com PBS e centrifugadas duas vezes e

então adicionados 200 µl de paraformaldeído 1% e mantidos em geladeira protegidos da luz, até o momento da leitura. Nos tubos branco permeabilizado e Treg, após a lavagem com PBS e centrifugação foi adicionado o tampão *Fix/Perm* (BD Biosciences, Nova Jersey, EUA) previamente diluído, e incubado por 45 minutos a 4 °C, protegido da luz, para promover a permeabilização da membrana e núcleo celular. Após a incubação, as células foram lavadas com tampão *Perm/Wash* e centrifugadas a 4 °C. Este procedimento foi repetido duas vezes. Posteriormente, foi adicionado 2 µl de FoxP3 (1:50) (BD Biosciences, Nova Jersey, EUA) no tubo de Treg e incubado por 45 minutos a 4 °C, protegido da luz. Após os 45 minutos, as células foram lavadas com tampão *Perm/Wash* e centrifugadas a 4 °C. Este procedimento foi repetido duas vezes. Foi adicionado 200 µl de paraformaldeído 1% e armazenados em geladeira, protegidos da luz até a leitura, a qual foi realizada no dia seguinte.

5.7. Critérios de Avaliação

O critério clínico foi representado pelo número e durabilidade dos episódios de atividade da doença no período de 12 meses, sendo avaliados a cada 3 meses, através dos questionários de atividade da doença (*Behçet's Disease Current Activity Form - BR-BDCAF*) já validado no Brasil em 2007 por Neves e colaboradores (Neves *et al.*, 2007), e de qualidade de vida (SF-36) (anexo III e IV).

Os pacientes registravam a quantidade de úlceras em pele e mucosa para avaliação do tempo entre o início e a cicatrização, número e sítios de acometimento das úlceras nos períodos de atividade da doença (anexo V).

5.8. Análise Estatística

Para descrever o perfil da amostra segundo as variáveis em estudo foi feita uma tabela de frequência das variáveis categóricas com valores de frequência absoluta (n) e percentual (%), e estatísticas descritivas das variáveis numéricas com valores de média, desvio padrão, valores mínimo e máximo e mediana.

Para comparar as variáveis entre os tempos foi utilizada a ANOVA para medidas repetidas. Os dados foram transformados em postos (*rankings*) devido à ausência de distribuição normal. O nível de significância adotado para este estudo foi de 5%.

6. RESULTADOS

6.1. Casuística

Neste estudo a partir dos critérios de elegibilidade foram selecionados 77 pacientes (63 em consulta e 14 por prontuários), no período de fevereiro de 2014 a agosto de 2015. A partir dos critérios de inclusão e exclusão, 65 pacientes foram excluídos por diversos motivos, como demonstrado na figura 4. Apenas 12 pacientes foram considerados elegíveis para a pesquisa. Esta alta taxa de pacientes não elegíveis deve-se aos critérios de inclusão do estudo e às características clínicas dos pacientes em nossa população e região demográfica. Dos 12 considerados elegíveis, 2 desistiram no momento da inclusão, 1 paciente foi excluído por uso de drogas ilícitas e 1 por estar gestante. Desta forma, 8 pacientes foram incluídos neste estudo. As características destes pacientes estão descritas na tabela 4.

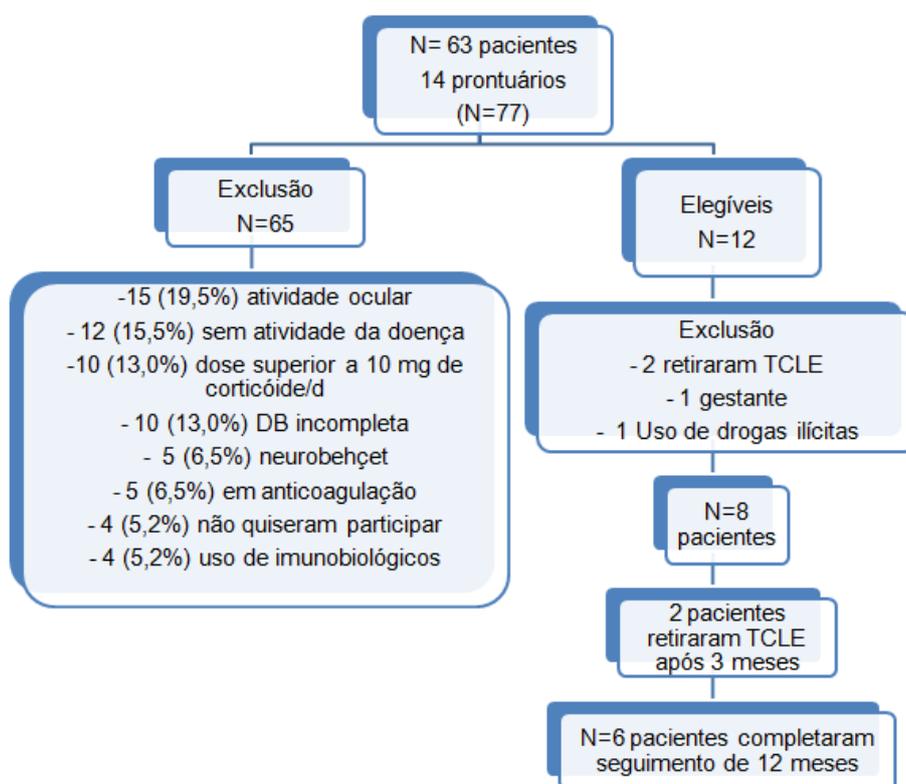


Figura 4: Fluxograma de inclusão e exclusão dos pacientes segundo os critérios de elegibilidade do estudo.

Tabela 6: Descrição dos pacientes incluídos na pesquisa considerados elegíveis.

Paciente	Idade	Início sintomas	Diagnóstico	HLA	Medicamentos
1	40	33	33	B*15 E B*35	Colchicina 0,5 mg, PDN 5 mg*, AZA, ibuprofeno
2	36	21	23	B*38 E B*53	CE, MTX, AZA PDN 10 mg, Colchicina 0,5 mg
3	31	23	23	B*51 E B*53	AZA 150 mg, **PDN 10 mg*
4	39	22	23	B*08 E B*44	CE, AZA, TALIDOMIDA, MTX, Colchicina** 0,5 mg, PDN*
5	48	23	29	B*08 E B*44	PDN 10 mg*, Colchicina 0,5 mg,
6	63	31	41	B*14 E B*48	CE - Clorambucil, MTX, Colchicina 0,5 mg , PDN 10 mg
7	61	38	43	B*15 E B*53	CE, MTX, AZA, talidomida, PDN 10 mg
8	48	23	23	B*15 E B*48	CE – deflazacort 30 mg, Colchicina 0,5, Clorambucil

** Sem medicação * Alteração na dose

PDN – prednisona, CE – corticoesteróide, MTX – metotrexato, AZA – azatioprina.

As medicações em vermelho estavam em uso pelos pacientes em todo o período de estudo. As medicações em preto fazem parte do histórico de medicamentos utilizados pelos pacientes.

Dos 8 pacientes 4 eram do sexo masculino e 4 feminino. Em relação à etnia, 50% caucasianos e 50% afrodescendentes. A média de idade dos pacientes incluídos foi de $45,8 \pm 11,5$ anos. A idade média de início dos sintomas da doença de Behçet nestes pacientes foi de $26,8 \pm 6,3$ anos. Em média, o diagnóstico destes pacientes foi feito 3 anos após o início dos sintomas ($29,8 \pm 8,4$ anos). Em relação ao histórico familiar da doença de Behçet 25% dos pacientes apresentavam irmãos com a doença. O HLA-B*51 foi verificado em apenas um paciente (12,5%), associado a histórico familiar da doença. Interessante notar que o HLA-B*15 e HLA-B*53 foi encontrado em três pacientes (37,5%).

Entre as comorbidades, 32,5% apresentavam osteoporose, 25% hipertensão arterial e 12,5% diabetes *mellitus* tipo 2. Em relação às manifestações clínicas, por ser um critério de inclusão, 100% dos pacientes apresentavam úlceras orais. Além disso, 87,5% apresentavam úlceras genitais, 100% lesões oculares sem atividade, 50% lesões cutâneas

e 25% sequelas do sistema nervoso central sem atividade. Dos 8 pacientes, 2 optaram por sair da pesquisa após 3 meses, e desta forma foram acompanhados apenas 6 pacientes até o período de 1 ano.

6.2. Caracterização do P-PRP autólogo

Os efeitos colaterais relatados pelos pacientes com o uso do P-PRP foram dor no local da aplicação com duração de 3 a 4 dias e dor generalizada no corpo na semana da aplicação em 5 dos 6 pacientes do estudo, especialmente quando o número de leucócitos do PRP foi maior.

6.2.1. Quantificação de plaquetas de leucócitos

O PRP foi caracterizado quanto ao número absoluto de plaquetas e leucócitos em sua composição e também em relação ao número de vezes (*folds*) que se concentrou, quando comparado ao valor basal. Pode-se verificar que todos os P-PRPs apresentavam número de plaquetas acima de 1.000.000 / μ l, em média 1.130.000 (5 x o valor basal), como demonstrado na figura 5. Os resultados também mostraram uma homogeneidade no número de plaquetas obtidos nos P-PRPs, não havendo variação significativa em todas as aplicações ($p=0,7440$).

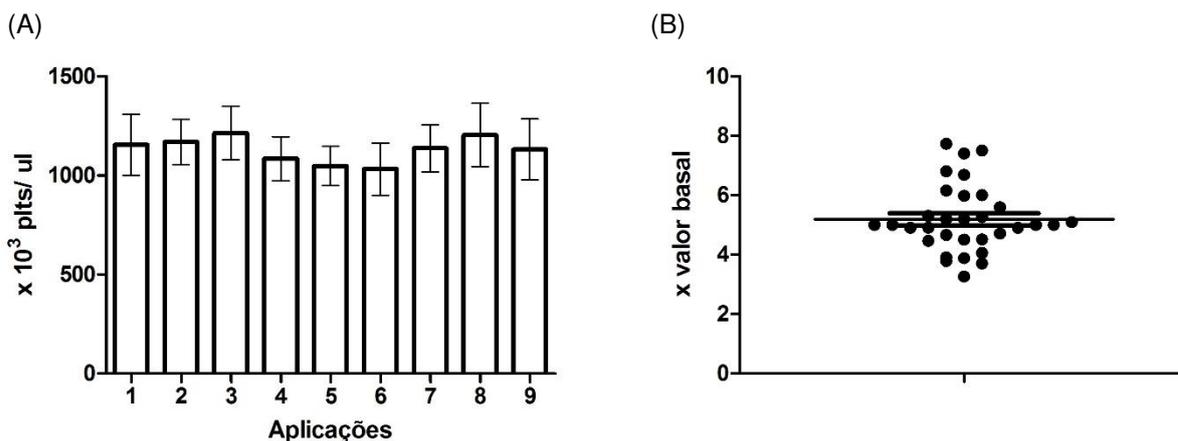


Figura 5: Recuperação de plaquetas no P-PRP. A) Número absoluto; B) Valor de plaquetas em relação à concentração basal (folds).

Em relação aos leucócitos, verificou-se uma maior dispersidade dos valores de contagem, sendo que a média de células brancas encontradas em todas os P-PRPs foi de 1500/ μ l (0,5 x valor basal), conforme evidenciado na figura 6.

Como o objetivo era a preparação de um PRP pobre em leucócitos, o que não vinha sendo obtido com sucesso, a partir da 4^a aplicação houve uma alteração no preparo

do PRP, com a retirada do uso do freio (*brake*) na primeira centrifugação. Esta mudança permitiu a manutenção do mesmo número de plaquetas, com redução do número de leucócitos. Como esperado, verificou-se que houve uma variação significativa no número de leucócitos ($p=0,0014$), sendo que o número médio de leucócitos nas 4 primeiras aplicações foi de 3525 células/ μl , e da quinta até a nona aplicação a concentração média de leucócitos foi de 808 células/ μl .

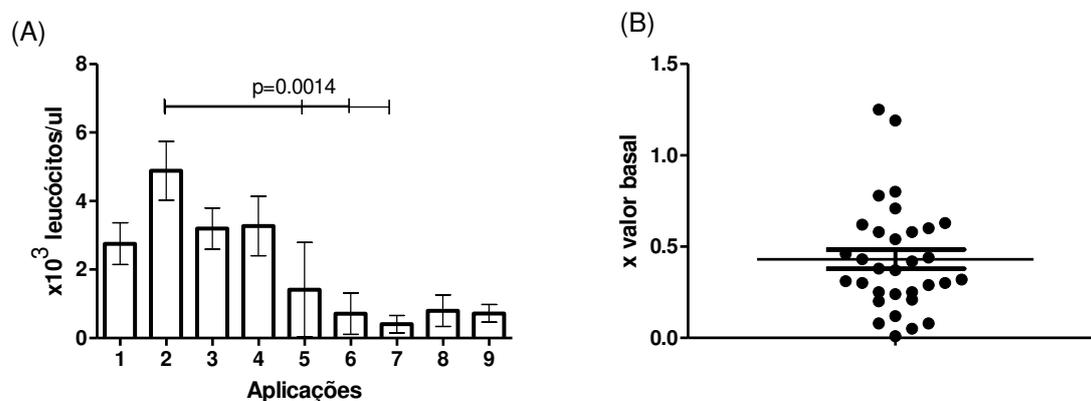


Figura 6: Recuperação de leucócitos no P-PRP. A) Número absoluto de leucócitos; B) Valor de leucócitos em relação à concentração basal (folds)

6.2.2. Quantificação de Fatores de Crescimento

A quantificação de fatores de crescimento evidenciou que não houve diferenças significativas na concentração de todos os fatores avaliados nos diversos tempos, com exceção do TGF- β 1. As dosagens tiveram pouca variação, evidenciando uma homogeneidade do P-PRP aplicado, como demonstrado na figura 7.

A mediana e valores mínimo e máximo para VEGF foram: basal 1362 (635,8 – 3764) pg/mL, 3M 1347 (452,7 – 3330) pg/mL, 6M 1376 (786 – 2465) pg/mL $p=0.6071$. Para EGF foram: basal 1001 (241,5 – 2275) pg/mL, 3M 954,7 (364,8 – 2963), 6M 1181 (448 – 2377) pg/mL, $p=0.7155$. Para PDGF-AA foram: basal 51192 (43166 – 104909) pg/mL, 3M 89041 (26436 – 288586) pg/mL, 6M 50619 (27821 – 106204) pg/mL $p=0.6774$. Para PF4/CXCL4 foram: basal 82337 (739,9 – 1007000) pg/mL, 3M 23397 (1096 - 1390000) pg/mL, 6M 83694 (56613 – 92420,5) pg/mL, $p=0,0746$.

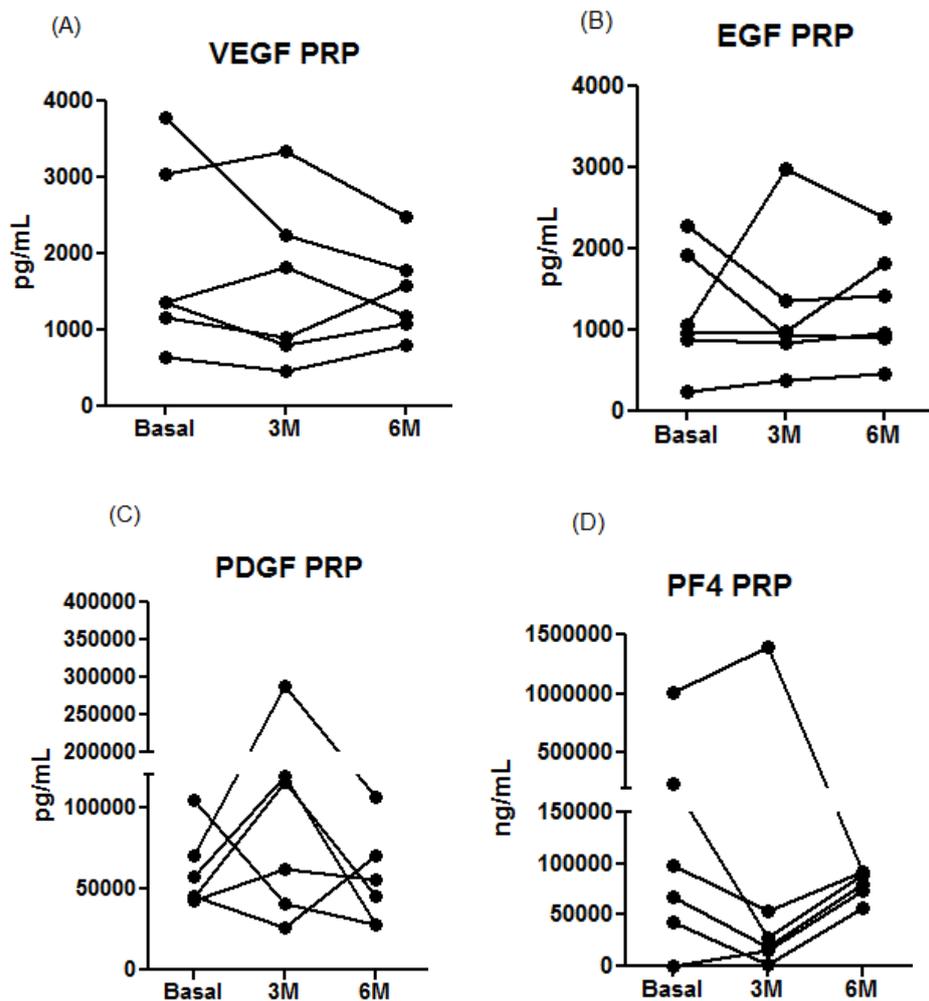


Figura 7: Concentração dos fatores de crescimento no P-PRP, quantificados através da plataforma Luminex, durante o período de aplicação nos pacientes. A) VEGF; B) EGF; C) PDGF-AA; D) PF4/CXCL4.

O TGF- β 1 mostrou um aumento significativo ($p < 0.0001$) em 6 meses quando comparado ao valor basal e 3 meses, como evidenciado na figura 8. A mediana e valores mínimo e máximo de TGF- β 1 foram: basal 120935 (76245 – 187411) pg/mL, 3M 117292 (83460 – 161593), 6M 371765 (194342 – 434320) pg/mL.

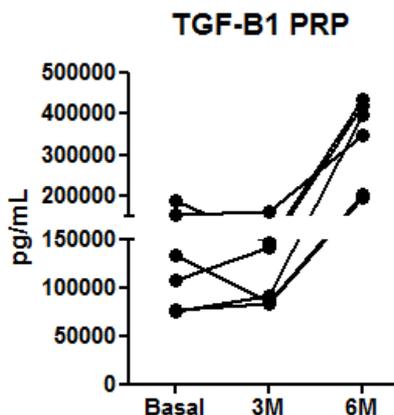


Figura 8: Concentração de TGF- β 1 ativo no P-PRP durante o período aplicação nos pacientes de Behçet, quantificado através do Luminex com tratamento de acidificação prévio.

6.2.3. Quantificação citocinas

Ao longo das aplicações (período de 6 meses de tratamento) foi realizada a dosagem de 12 proteínas no P-PRP, entre interleucinas, citocinas e sCD40L, utilizando a metodologia CBA de alta sensibilidade (fg/mL) e sensibilidade normal (pg/mL). Foi verificado que a maior parte destas proteínas apresentavam níveis muito baixos, inferiores ao limite de detecção do kit, sendo desta forma divididas em categóricas e numéricas. As variáveis categóricas classificadas como presente ou ausente foram: IFN- γ , IL-13, IL-17, IL-21, IL-2, IL-12. A frequência destas variáveis está descrita na tabela 7.

Tabela 7: Frequência das variáveis categóricas dosadas no P-PRP dos pacientes com DB.

Proteína	Tempo	Ausente (%)	Presente (%)
IFN- γ	Basal	100	-
	3M	83,3	16,7
	6M	100	-
IL-13	Basal	50	50
	3M	33,3	66,7
	6M	100	-
IL-17	Basal	50	50
	3M	66,7	33,3
	6M	83,3	16,7
IL-21	Basal	100	-
	3M	83,3	16,7
	6M	100	-
IL-2	Basal	83,3	16,7
	3M	83,3	16,7
	6M	100	-
IL-12	Basal	83,3	16,7

	3M	100	-
	6M	83,3	16,7

As variáveis consideradas numéricas foram: sCD40L, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α e IL-1 β . A quantificação mostrou que houve pequenas variações dentre as proteínas, demonstrando um P-PRP relativamente homogêneo nos períodos avaliados, como demonstrado nas figuras 9 e 10. Para as amostras de sensibilidade normal os valores de p foram: sCD40L p=0.2910, IL-6 p=0.9177. A mediana e valores mínimo e máximo para sCD40L foram: basal 7764 (4377 – 12094) pg/mL, 3M 5645 (3293 – 14408) pg/mL, 6M 4073 (3035 – 9136) pg/mL. Para IL-6 foram: basal 1.3 (0 – 4,6) pg/mL, 3M 0,7 (0 – 7,1) pg/mL, 6M 1,0 (0 – 2,7) pg/mL, conforme evidenciado na figura 9.

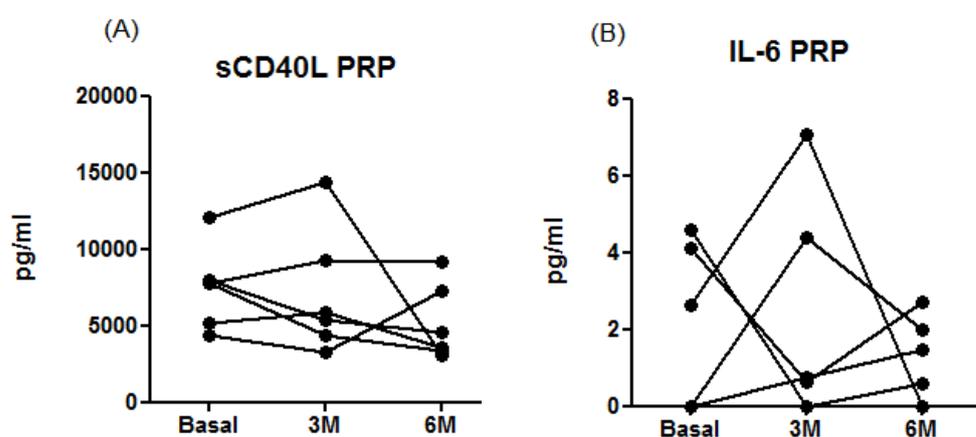


Figura 9: Concentração de sCD40L e IL-6 quantificados por meio do CBA de sensibilidade normal no P-PRP dos pacientes ao longo do período das aplicações. A) sCD40L; B) IL-6.

Em relação às proteínas dosadas por alta sensibilidade, apenas a IL-10 variou significativamente, atingindo o menor valor em 6 meses, e significativo quando comparado ao valor basal (p=0.0088), conforme verificado na figura 10. A mediana e valores mínimo e máximo para para IL-10 foram: basal 271,3 (113,5 – 909,9) fg/mL, 3M 276,5 (64,51 – 615,2) fg/mL, 6M 21,1 (0 – 236,3) fg/mL. Para TNF- α foram: basal 0 (0 – 829,3) fg/mL, 3M 0,98 (0 – 631) fg/mL, 6M 9,1 (0 – 548,8) fg/mL, p=0.9463. Para IL-1 β foram: basal 78,68 (0 – 578,4) fg/mL, 3M 15,6 (0 – 1528) fg/mL, 6M 166,4 (0 – 513,1) fg/mL, p=0.7022. Para IL-8 foram: basal 11208 (8549 – 20789) fg/mL, 3M 11830 (7020 – 222793), 6M 9322 (779,1 – 14880) fg/mL, p= 0.1572, como descrito na figura 10.

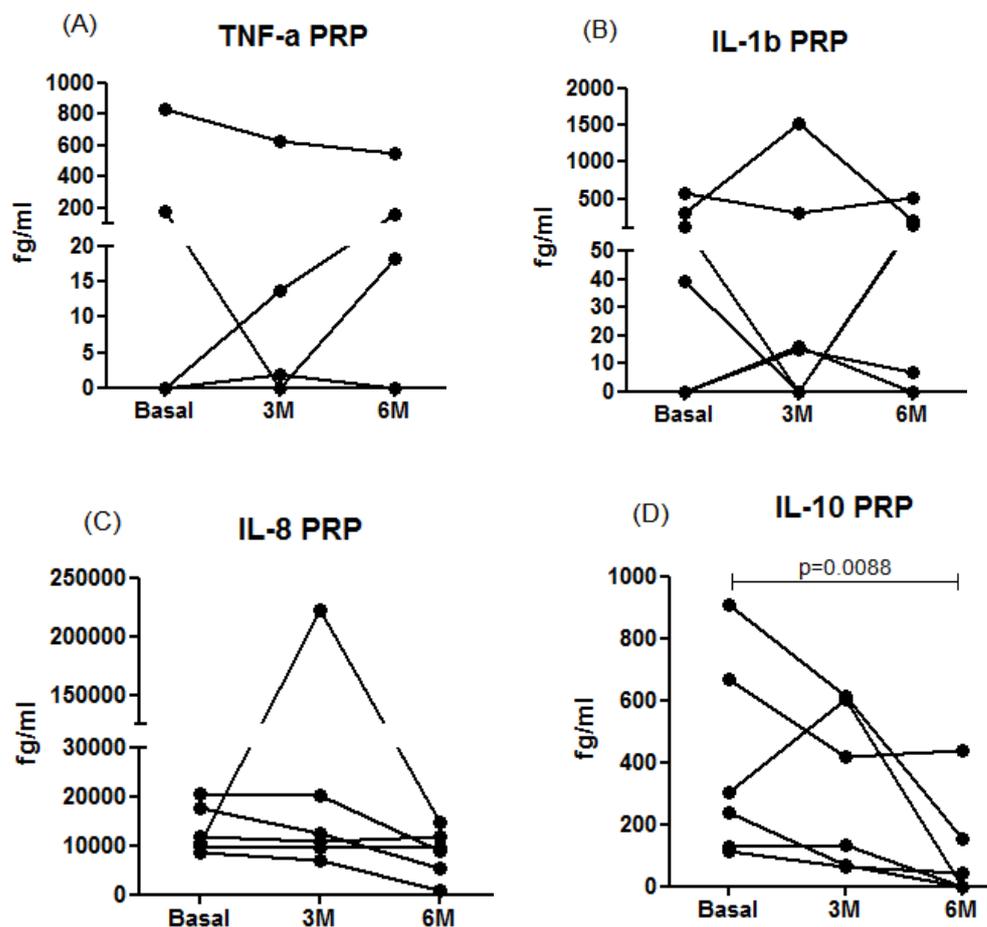


Figura 10: Concentração de fatores de crescimento quantificados através de CBA de alta sensibilidade no P-PRP dos pacientes ao longo do período das aplicações. A) TNF- α ; B) IL-1 β ; C) IL-8; D) IL-10.

6.3. Avaliação biológica dos pacientes de Behçet

6.3.1. Escore Clínico

Ao avaliar o escore clínico dos pacientes pelo BR-BDCAF ao longo dos 12 meses de seguimento verificou-se que não houve modificações significativas em relação à atividade da doença, como verificado na figura a seguir (figura 11). A mediana e valor mínimo e máximo foram: basal 7,0 (2,0 – 16,0), 3M 5,0 (2,0-18,0), 6M 7,0 (1,0 – 18,0), 9M 6,5 (1,0-17,0) e 12M 8,5 (4,0-14,0), $p=0,5056$.

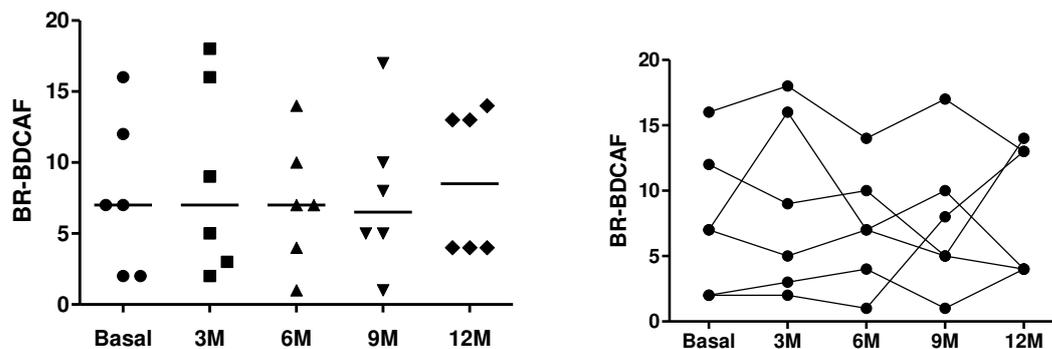


Figura 11: Escore clínico mensurado por meio do BR-BDCAF dos pacientes ao longo do período de seguimento. A) Mediana dos resultados; B) Resultados do escore clínico por paciente.

6.3.2. Tempo de cicatrização e número de úlceras orais

Foram avaliados 2 parâmetros: número e tempo de fechamento das úlceras orais. Em relação ao número de úlceras orais foi verificado que houve variação ao longo do período de seguimento, sendo que na segunda aplicação a quantidade de úlceras foi significativamente menor em relação aos períodos basal e 4ª aplicação. Aos 9 meses observou-se uma maior quantidade de úlceras orais nos pacientes, sendo significativa quando comparada à sexta aplicação. A mediana do número de úlceras em cada aplicação está representada na figura 12. Na figura 13 estão descritos os mesmos dados com acompanhamento de cada paciente.

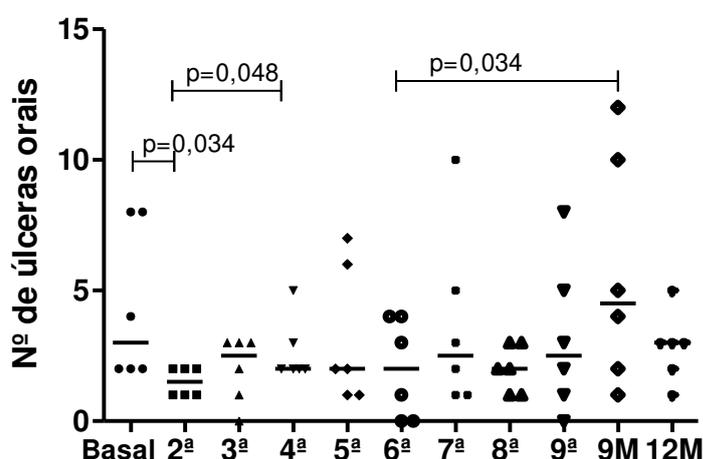


Figura 12: Gráfico evidenciando a mediana do número de úlceras orais dos pacientes com DB ao longo do período de seguimento.

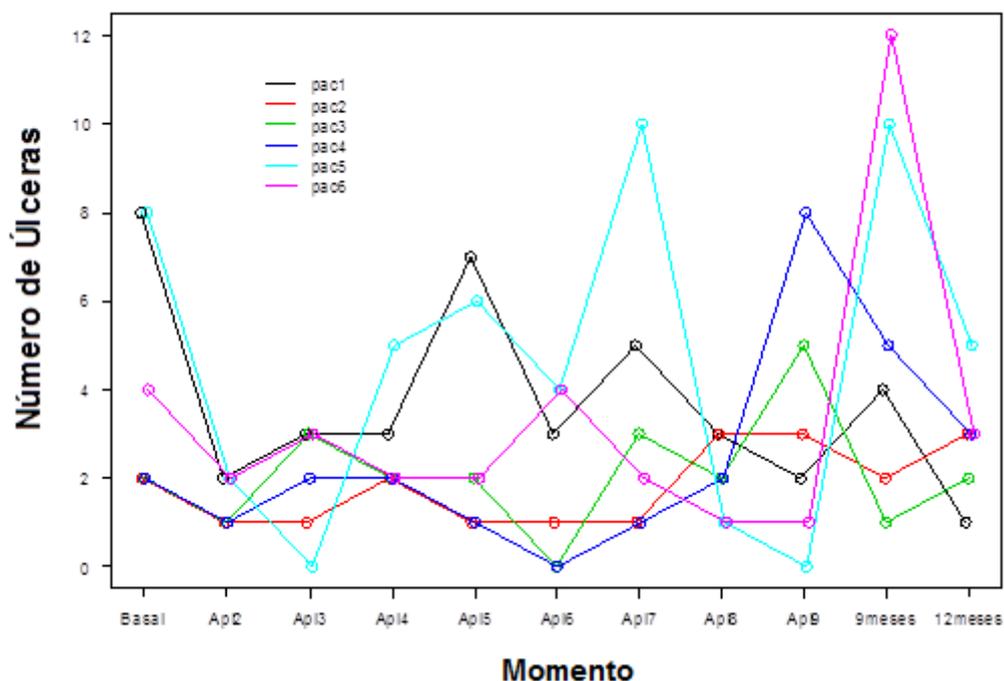


Figura 13: Gráfico representando o número de úlceras de cada paciente ao longo do período de seguimento do estudo.

O número de dias para fechamento das úlceras foi significativamente maior no tempo basal quando comparado a quase todo o período de aplicação do P-PRP, com exceção da quinta, sétima e oitava aplicação. Após o término das aplicações (6 meses), verificou-se um aumento no número de dias para fechamento das úlceras. A mediana do tempo em dias para o fechamento das úlceras orais está evidenciada na figura 14. A variação individual do tempo para fechamento no período de seguimento está demonstrada na figura 15.

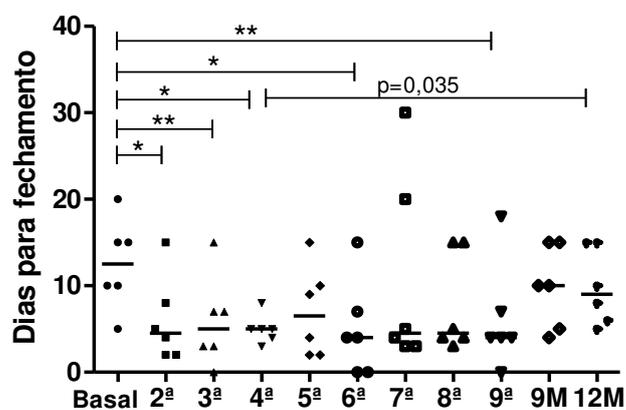


Figura 14: Gráfico evidenciando a mediana do tempo (em dias) para o fechamento das úlceras orais no período de seguimento dos pacientes. * $p=0,036$; ** $p=0,031$.

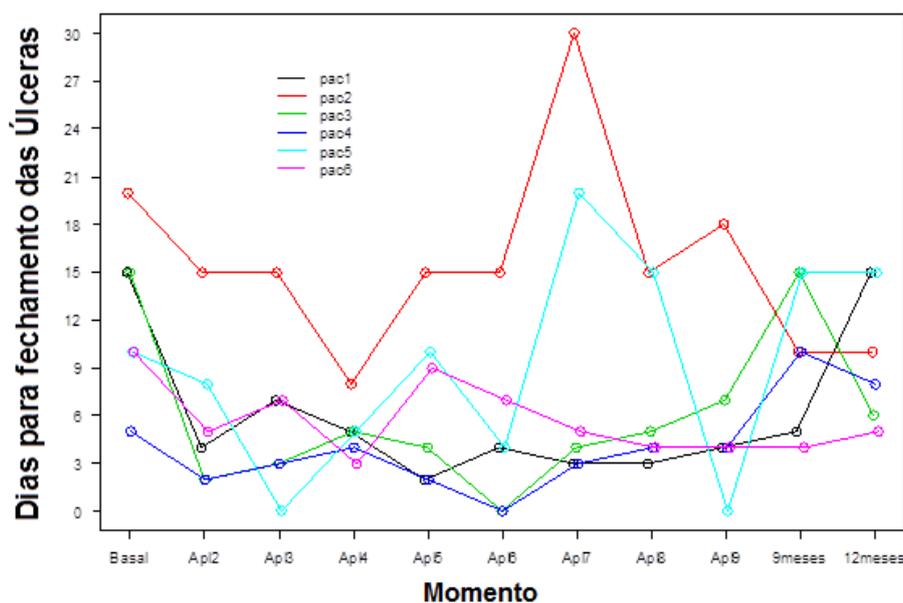


Figura 15: Gráfico evidenciando o tempo (em dias) para o fechamento das úlceras orais de cada paciente no período de seguimento do estudo.

6.3.3. Avaliação da qualidade de vida (SF-36)

O questionário de qualidade de vida *Short Term* (SF-36) avalia 8 domínios: funcional, físico, dor, geral, vitalidade, social, emocional e mental. Ao longo do período de seguimento não foram observadas variações significativas em nenhum dos domínios. A descrição destes dados com mediana, valores de mínimo e máximo e valor de p esta representada na tabela 8.

Tabela 8: Descrição dos dados relacionados ao questionário de qualidade de vida (SF-36), com os valores de mediana mínimo e máximo e valor de p de cada domínio durante o período de seguimento dos pacientes.

Domínio	Tempo	Mediana	Valor Mínimo	Valor Máximo	Valor de p
Funcional	Basal	75,0	45,0	100,0	0,3942
	3M	70,0	50,0	95,0	
	6M	72,5	5,0	100,0	
	9M	65,0	45,0	80,0	
	12M	65,0	35,0	95,0	
Físico	Basal	87,5	0,0	100,0	0,8670
	3M	50,0	0,0	100,0	
	6M	62,5	0	100,0	
	9M	75,0	50,0	100,0	
	12M	62,5	0,0	100,0	
	12M	62,5	0,0	100,0	
Dor	Basal	51,5	32,0	72,0	0,6650
	3M	41,0	10,0	100,0	
	6M	57,0	0,0	84,0	
	9M	51,0	0,0	62,0	
	12M	46,5	0,0	61,0	
Geral	Basal	56,0	32,0	70,0	0,4898
	3M	39,5	5,0	65,0	
	6M	61,0	27,0	92,0	
	9M	39,5	17,0	77,0	
	12M	42,0	15,0	72,0	
Vitalidade	Basal	40,0	5,0	100,0	0,5478
	3M	50,0	5,0	95,0	
	6M	55,0	5,0	95,0	
	9M	55,0	30,0	60,0	
	12M	35,0	5,0	70,0	
Social	Basal	56,25	0,0	100,0	0,2894
	3M	50,0	0,0	87,5	
	6M	68,75	37,5	100,0	
	9M	68,75	50,0	100,0	
	12M	75,0	0,0	100,0	
Emocional	Basal	100,0	0,0	100,0	0,0936
	3M	16,7	0,0	100,0	
	6M	100,0	0,0	100,0	
	9M	83,3	33,0	100,0	
	12M	83,3	0,0	100,0	
Mental	Basal	66,0	24,0	80,0	0,9199
	3M	66,0	0,0	80,0	
	6M	70,0	4,0	92,0	
	9M	62,0	12,0	92,0	
	12M	60,0	4,0	96,0	

6.3.4. Frequência celular

As células NK foram identificadas como dupla positividade para CD56+ e CD16+, e negatividade para CD3-, conforme observado na figura 16.

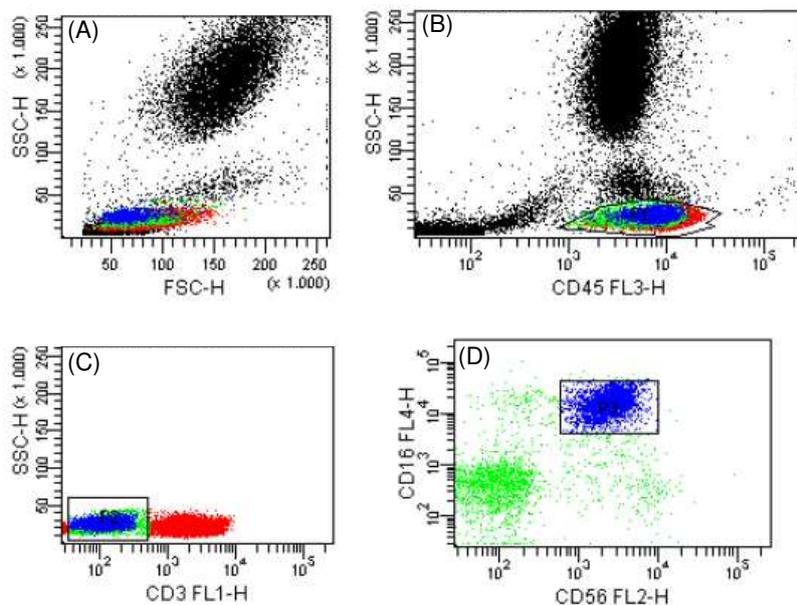


Figura 16: Caracterização fenotípica da população de células NK dos pacientes com DB. *Dots plots* representativos da análise de citometria de fluxo. A) População de linfócitos identificados com base nas características de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC); B) Leucócitos identificados como CD45+; C) *Dot plot* representativo da população de células CD3-; D) *Dot plot* da população de células NK, identificadas por meio da dupla positividade para CD56+ e CD16+.

As células TCD4 foram identificadas como dupla positividade para CD3+ e CD4+, conforme observado na figura 17.

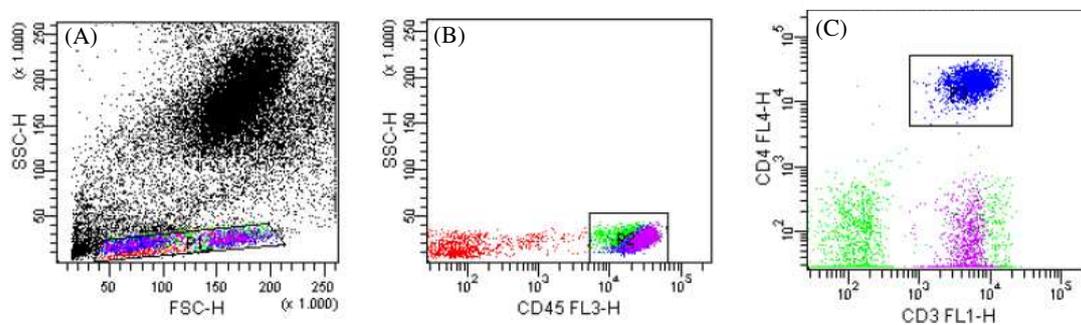


Figura 17: Caracterização fenotípica da população de células TCD4+ dos pacientes com DB. *Dots plots* representativos da análise de citometria de fluxo. A) População de linfócitos identificados com base nas características de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC); B) Leucócitos identificados como CD45+; C) *Dot plot* da população de células TCD4+, identificadas por meio da dupla positividade para CD3+ e CD4+.

As células NK e TCD4+ não mostraram variações significativas em sua frequência quando avaliadas durante o período de seguimento, como observado na figura

18. A mediana e valores mínimo e máximo da frequência celular para a célula TCD4+ foram: basal 37,6 (31,7 – 52,9)%, 3M 38,8 (31,3 – 52,0)%, 6M 39,5 (34,2 – 49,9)%, 9M 35,85 (30,6 – 42,0)%, 12M 39,9 (11,7 – 53,7)% (p=1,000). Para as células NK (CD 3- CD16+ CD56+) foram: basal 38,0 (25,8 – 54,9)%, 3M 33,75 (21,6 – 64,5)%, 6M 37,6 (19,2 – 47,7)%, 9M 41,1 (20,3 – 48,0)% e 12M 29,1 (0,03 – 49,8) (p=0,7432).

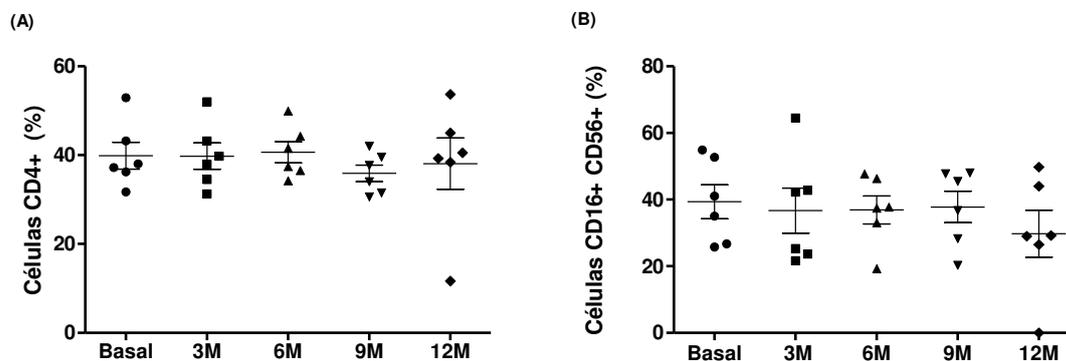


Figura 18: Frequência (%) dos diferentes tipos celulares durante o período de seguimento dos pacientes; A) TCD4+; B) NK (CD16+ CD56+).

As células CD8 foram quantificadas através da dupla positividade CD3+ e CD8+, conforme observado na figura 19.

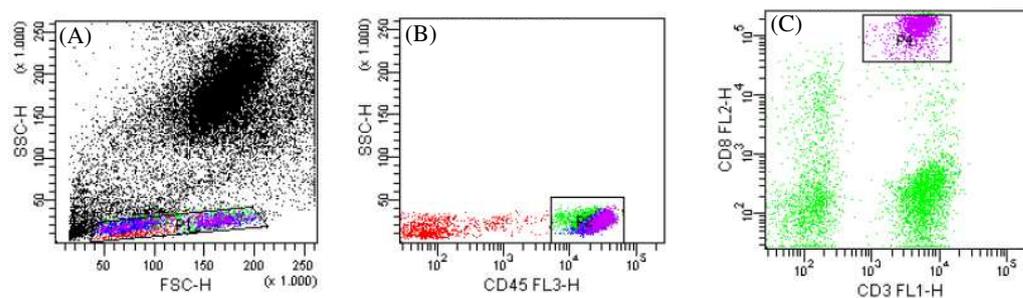


Figura 19: Caracterização fenotípica da população de células TCD8+ dos pacientes com DB. *Dots plots* representativos da análise de citometria de fluxo. A) População de linfócitos identificados com base nas características de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC); B) Leucócitos identificados como CD45+; C) *Dot plot* da população de células TCD8+, identificadas por meio da dupla positividade para CD3+ e CD8+.

As células NK ativadas foram identificadas como previamente descrito por Yamaguchi *et al.*, (2010) como CD3- e dupla positividade para CD56+ E CD69+, como descrito na figura 20.

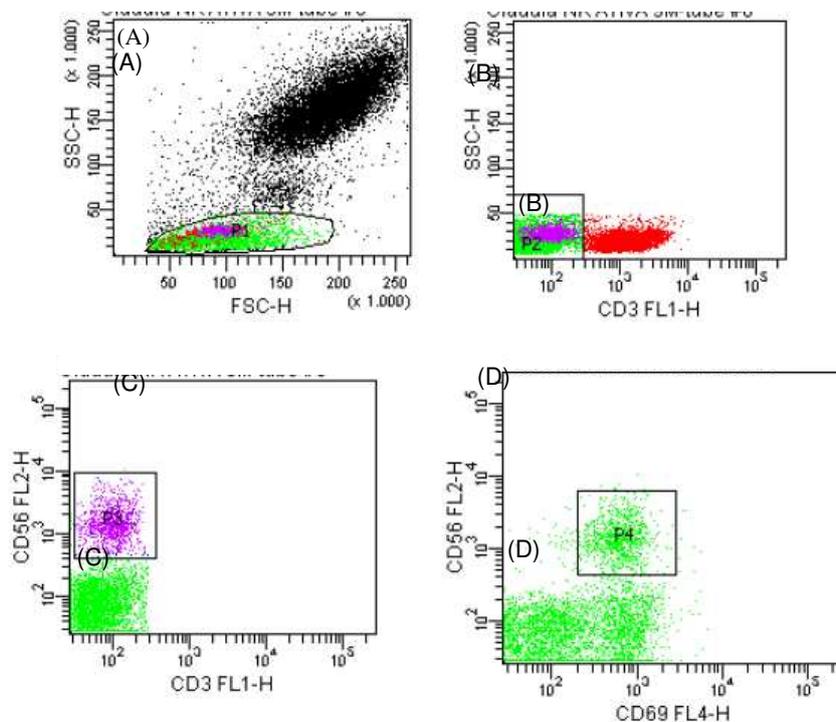


Figura 20: Caracterização fenotípica da população de células NK ativadas dos pacientes com DB. *Dots plots* representativos da análise de citometria de fluxo. A) População de linfócitos identificados com base nas características de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC); B) *Dot plot* da população de células identificadas como CD3+; C) Identificação da população de células NK; D) *Dot plot* da população de células NK ativadas, identificadas por meio da dupla positividade para CD16+ e CD69+.

As células T reguladoras foram quantificadas através da marcação CD4+ CD25+ FoxP3+, como observado na figura 21.

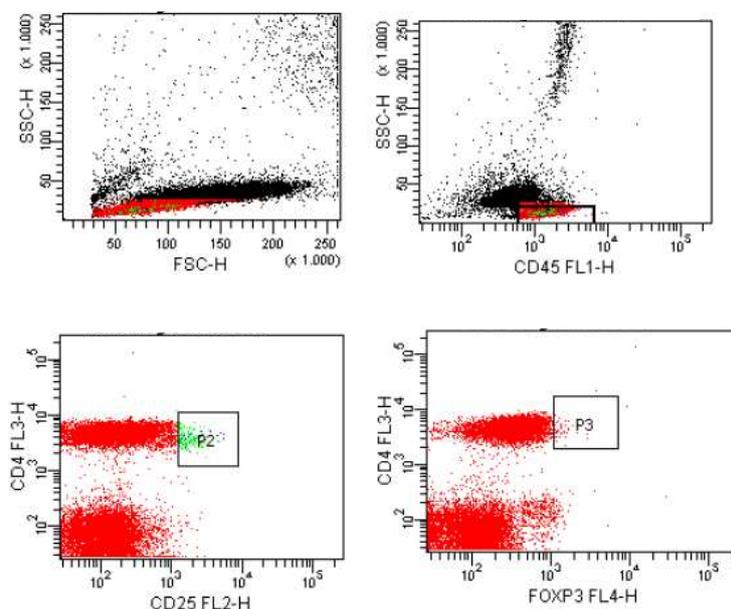


Figura 21: Caracterização fenotípica da população de células Treg dos pacientes com DB. *Dots plots* representativos da análise de citometria de fluxo. A) População de linfócitos identificados com base nas características de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC); B) *Dot plot* da população de células identificadas como leucócitos pela presença de CD45+; C) Identificação da população de células T com dupla positividade CD25+ CD4+; D) *Dot plot* da população de células Treg, identificadas por meio da dupla positividade para FoxP3 e CD4+.

Ao avaliar a frequência das populações, as células CD8+ apresentaram um aumento significativo aos 9 meses ($p=0.0329$) em relação ao valor basal, conforme evidenciado na figura 22. A mediana e valores mínimo e máximo da frequência e valor de p, foram: basal 28,25 (22,9 – 36,2)%, 3M 26,0 (16,3 – 34,9)%, 6M 28,4 (21,6 – 34,5)%, 9M 31,4 (19,9 – 35,8)%, 12M 27,1 (24 – 58,2)%, $p=0.0328$.

Como verificado na figura 22, a frequência de NK ativada basal mostrou-se significativamente elevada quando comparada aos valores obtidos aos 3 e 12 meses. Aos 9 meses foram observados valores significativamente elevados da frequência de NK ativada quando comparado a todos os outros tempos de avaliação. A mediana, valores mínimo e máximo e o valor de p para NK ativada foram: basal 3,1 (0,6 – 8,8)%, 3M 1,2 (0,2 – 4,6)%, 6M 1,3 (0,01 – 4,2)%, 9M 25,0 (3,1 – 52,4)%, 12M 1,1 (0,01 – 5,5)%, $p<0.0010$.

Verificou-se uma frequência significativamente maior de células Treg no tempo de 3 meses quando comparado a 12 meses, e de 6 meses quando comparado a 9 meses, conforme evidenciado na figura 22C. A mediana, valores mínimo e máximo e o valor de p encontrados foram: basal 5,7 (0 – 8,3)%, 3M 12,2 (0 – 17,4)%, 6M 1,2 (0,9 – 6,2)%, 9M 0,5 (0,02 – 1,5)% e 12M 1,1 (0,4 – 1,6)%, $p=0.0416$.

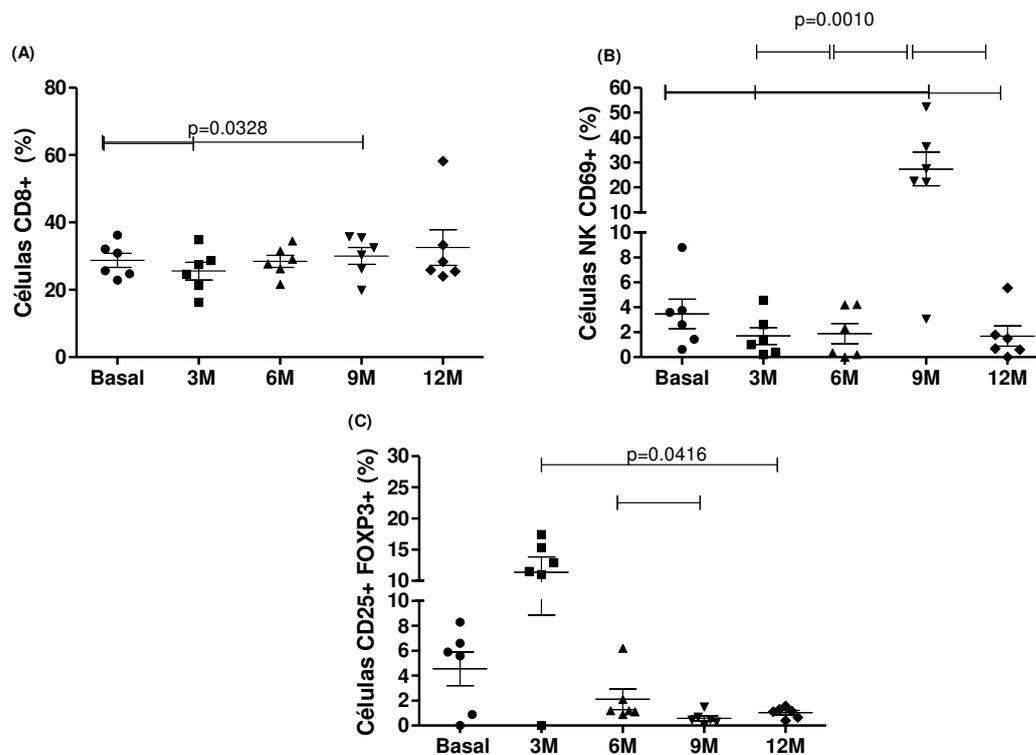


Figura 22: Frequência de diferentes populações celulares ao longo do período de seguimento. A) TCD8+; B) NK CD69+ (atividade da doença); C) Células T reguladoras (CD4+ CD25+ FoxP3+).

6.3.5. Avaliação sistêmica

6.3.5.1. Fatores de crescimento

A quantificação de TGF- β 1, EGF e PDGF-AA e no grupo de pacientes tratados não mostrou diferenças significativas ao longo do período de seguimento, como demonstrado na figura 23. A mediana e valores mínimo e máximo, e valor de p para TGF- β 1 foram: basal 5489 (2041 – 10072) pg/mL, 3M 4040 (961,5 – 41101), 6M 6906 (2415 – 48474) pg/mL, 9M 10869 (6624 – 278552) pg/mL, 12M 6774 (2976 – 17293) pg/mL, $p=0.1034$. Para PDGF-AA foram: basal 324,6 (59,7 – 2199) pg/mL, 3M 378,5 (22,1-42603), 6M 216,8 (0 – 326.1) pg/mL, 9M 208,5 (0 – 1285) pg/mL, 12M 119,0 (0 – 256,6) pg/mL, $p=0,2099$. Para EGF foram: basal 18,3 (9,3 – 25,0) pg/mL, 3M 17,3 (0 – 2936) pg/mL, 6M 12,1 (0 – 102,2) pg/mL, 9M 3,3 (0- 55,0) pg/mL, 12M 4,3 (0 – 85,0) pg/mL, $p=0.2661$.

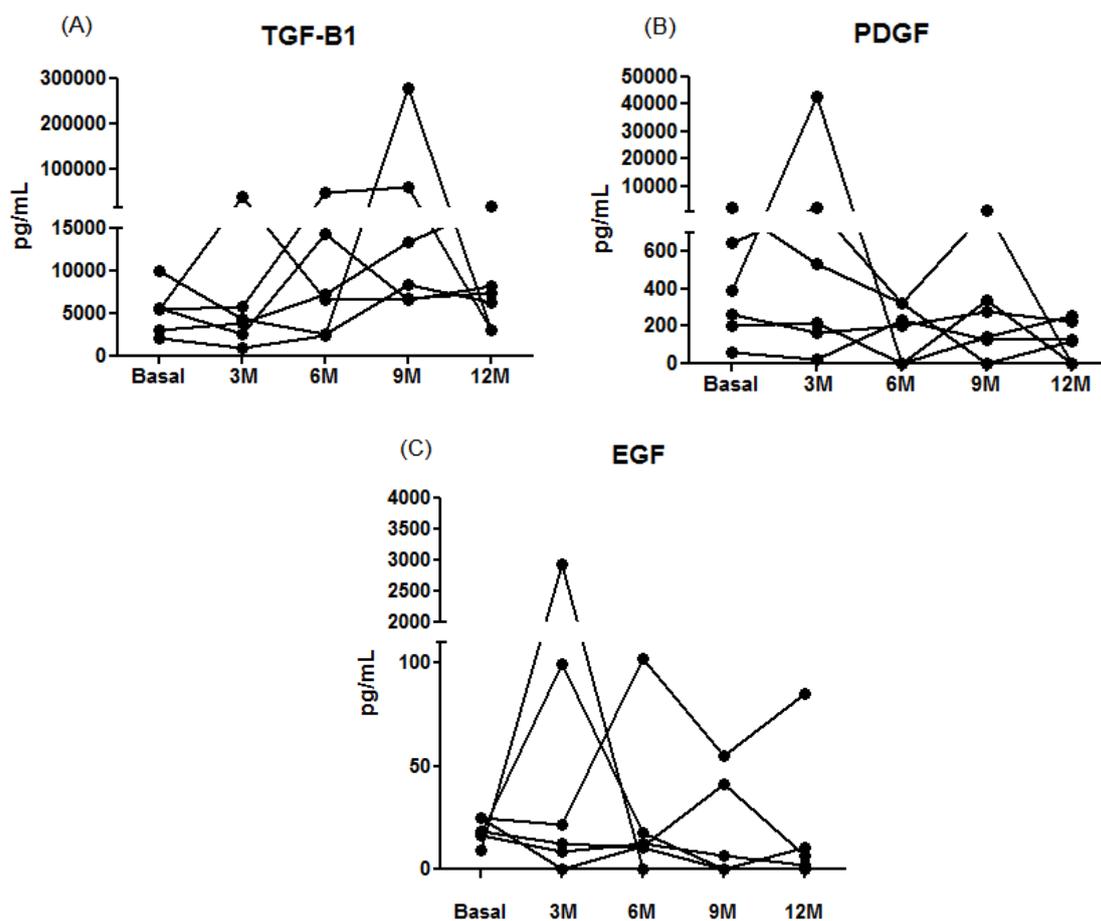


Figura 23: Concentração de citocinas no plasma dos pacientes ao longo do período de seguimento, quantificados por meio da plataforma Luminex, não apresentando alterações significativas. A) EGF; B) PDGF-AA; C) TGF- β 1.

O VEGF apresentou um decréscimo ao longo do seguimento, atingindo o menor valor em 12 meses, sendo significativamente menor quando comparado ao valor basal, 3 meses e 6 meses ($p=0.0050$), como evidenciado na figura 24A. Além disso, o valor basal foi significativamente maior do que aos 9 meses de seguimento. A mediana e valores mínimo e máximo encontrados foram: basal 736,5 (452,7 – 1648) pg/mL, 3M 542,7 (81,0 – 1491) pg/mL, 6M 521,2 (244,5 – 874,0) pg/mL, 9M 144,6 (21,1 – 995,3) pg/mL, 12M 142,8 (100,9 – 870,2) pg/mL.

A concentração sistêmica de PF4/CXCL4 mostrou alterações, atingindo o menor valor em 6 meses, sendo significativamente menor do que aos 12 meses ($p=0.0128$), conforme verificado na figura 24B. A mediana e valores de mínimo e máximo encontrados foram: basal 1536 (829,9 – 17044) pg/mL, 3M 3106 (1007 – 18694), 6M 1157 (628 – 2670) pg/mL, 9M 2035 (815,3 – 3608) pg/mL, 12M 3968 (2027 – 5124) pg/mL.

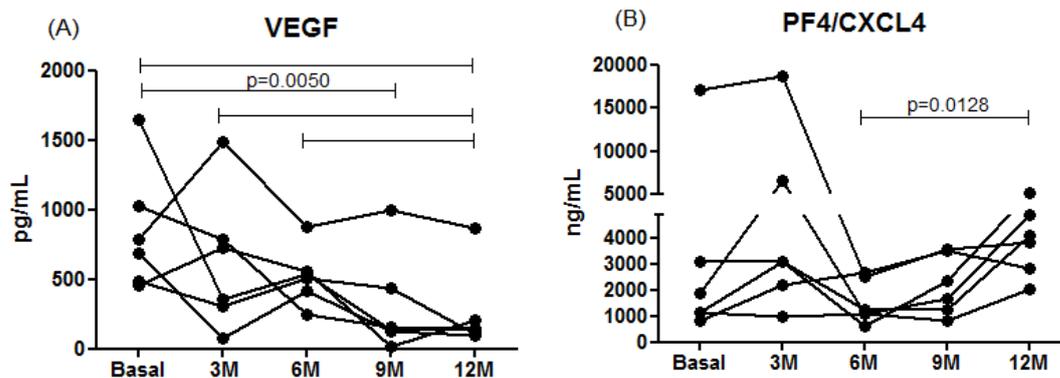


Figura 24: Concentração das citocinas no plasma dos pacientes ao longo do período de seguimento, quantificadas por meio da plataforma Luminex. A) VEGF; B) PF4/CXCL4.

6.3.5.2. Concentração das citocinas

Assim como no P-PRP, muitas das interleucinas e citocinas quantificadas no plasma dos pacientes de DB apresentaram valores indetectáveis pela metodologia de CBA, mesmo utilizando kits de alta sensibilidade, sendo que estas proteínas foram classificadas como variáveis categóricas e numéricas. As variáveis categóricas foram classificadas apenas como presente ou ausente. A descrição da frequência destas variáveis está descrita na tabela 9.

Tabela 9: Frequência das variáveis categóricas dosadas no plasma dos pacientes com DB.

Proteína	Tempo	Ausente (%)	Presente (%)
IFN- γ	Basal	66,7	33,3
	3M	66,7	33,3
	6M	100	-
	9M	83,3	16,7
	12M	66,7	33,3
IL-13	Basal	83,3	16,7
	3M	100	-
	6M	100	-
	9M	50	50
	12M	33,3	66,7
IL-17	Basal	66,7	33,3
	3M	83,3	16,7
	6M	83,3	16,7
	9M	83,3	16,7
	12M	66,7	33,3

IL-21	Basal	100	-
	3M	100	-
	6M	100	-
	9M	83,3	16,7
	12M	66,7	33,3
TNF- α	Basal	100	-
	3M	83,3	16,7
	6M	83,3	16,7
	9M	83,3	16,7
	12M	66,7	33,3
IL-1 β	Basal	100	-
	3M	100	-
	6M	100	-
	9M	100	-
	12M	83,3	16,7
IL-2	Basal	83,3	16,7
	3M	83,3	16,7
	6M	100	-
	9M	100	-
	12M	100	-
IL-12	Basal	100	-
	3M	83,3	16,7
	6M	100	-
	9M	83,3	16,7
	12M	100	-

As proteínas classificadas como detectáveis foram: IL-6, sCD40L, IL-8 e IL-10. A IL-6 não mostrou variação significativa ao longo do período de seguimento dos pacientes, como verificado na figura 25. A mediana e valores mínimo e máximo e valor de p encontrados foram: basal 2,2 (0 – 3,3) pg/mL, 3M 1,5 (0- 5,6) pg/mL, 6M 0,4 (0 – 4,0) pg/mL, 9M 3,4 (0 – 8,7) pg/mL, 12M 3,8 (0,3 – 5,4) pg/mL, $p=0.3915$.

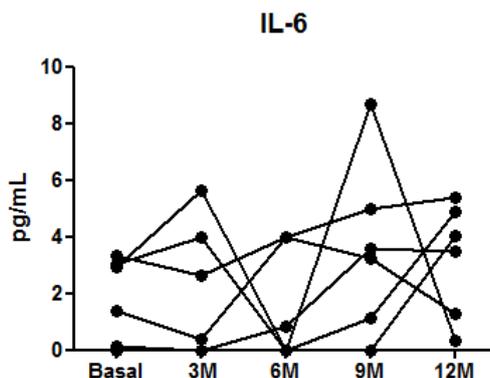


Figura 25: Concentração de IL-6 plasmática quantificada por meio de CBA de sensibilidade normal, não apresentando alterações significativas ao longo do período de seguimento dos pacientes com DB.

A concentração de IL-10 mostrou um decréscimo ao longo do período de seguimento, ocorrendo uma diminuição significativa ($p < 0.0001$) em 12 meses quando comparados aos tempos basal, 3M e 6M, conforme verificado na figura 26A. A mediana e valores mínimo e máximo encontrados foram: basal 170,0 (95,1 – 487,4) fg/mL, 3M 160,1 (56,9 – 288,2) fg/mL, 6M 143,0 (58,5 – 357,2) fg/mL, 9M 5,6 (0 – 154,3) fg/mL, 12M 9,1 (4,4 – 67,6) fg/mL.

A concentração de IL-8 apresentou uma variação e aos 9 meses mostrou uma diminuição significativa em comparação ao valor basal e 3 meses ($p = 0.0459$), como descrito na figura 26B. A mediana e valores mínimo e máximo encontrados foram: basal 1517 (508,6 – 4395) fg/mL, 3M 1943 (749,5 – 4736) fg/mL, 6M 1471 (534,9 – 3103) fg/mL, 9M 344,8 (52,4 – 2596) fg/mL, 12M 904,8 (409,0 – 6224) fg/mL.

A concentração de sCD40L mostrou alterações ao longo do período de seguimento, com diminuição significativa aos 6 meses, em comparação ao valor basal, 9 meses e 12 meses, conforme observado na figura 26C. A mediana e valores mínimo e máximo encontrados foram: basal 22,0 (1,8 – 171,2) pg/mL, 3M 9,9 (0,5 – 38,8) pg/mL, 6M 2,2 (0 – 4,6) pg/mL, 9M 16,2 (1,7 – 22,3) pg/mL, 12M 24,1 (17,3 – 50,9) pg/mL.

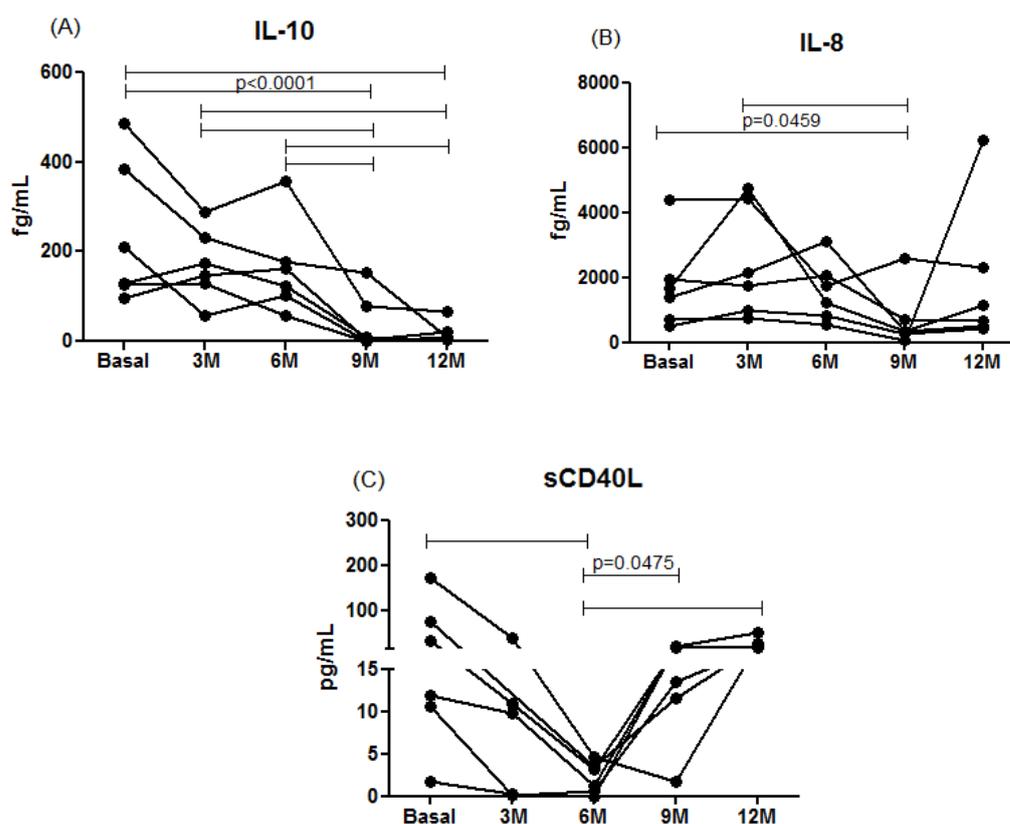


Figura 26: Concentração de citocinas no plasma dos pacientes de DB ao longo do período de seguimento, quantificadas por através do CBA de alta sensibilidade e baixa (sCD40L). A) IL-10; B) IL-8; C) sCD40L.

7. DISCUSSÃO

A DB é uma doença em que se observam importantes alterações biológicas relacionadas ao sistema imunológico, que uma vez ativado promove a liberação de citocinas e interleucinas de perfil inflamatório, gerando o quadro clínico caracterizado por períodos de remissão e exacerbação (Gul, 2001). Devido à sua gravidade, o fato de ser crônica e apresentar resposta heterogênea ao tratamento convencional ou biológico, impulsiona a busca por outras alternativas terapêuticas. Nesse sentido, um produto biológico de baixo custo com potencial imunomodulador torna-se uma possibilidade de grande valia.

Neste estudo, os principais resultados encontrados foram divididos de acordo com a função de cada proteína, desta forma, o perfil anti-inflamatório foi representado por: PF4/CXCL4, IL-10 e células Treg. Em contrapartida, o pró-inflamatório foi representado por sCD40L, VEGF, IL-8 e células NK CD69+.

No período das aplicações, houve uma tendência do perfil anti-inflamatório, devido ao aumento de PF4/CXCL4 e da frequência de Treg e diminuição de NK ativada, especialmente nos primeiros 3 meses, onde a frequência da aplicação foi quinzenal. Embora não encontrada correlação clínica houve alterações biológicas de relevância.

Recentemente, estudos têm evidenciado que além de sua participação na homeostasia, as plaquetas também têm papel importante em outros processos biológicos, como na inflamação e imunidade. A interação com células brancas e células endoteliais, tanto de maneira indireta quanto por mecanismos contato dependentes, fazem das plaquetas uma célula circulante com função relevante (Smyth *et al.*, 2009; Srivastava *et al.*, 2008; Morrel *et al.*, 2014). Além disso, uma gama de biomoléculas pró e anti-inflamatórias também são secretadas a partir dos grânulos plaquetários. Entre estas moléculas as que estão relacionadas com função anti-inflamatória são o PF4/CXCL4 e TGF- β 1.

O PF4/CXCL4 atua inibindo a proliferação de células T efetoras e estimula a diferenciação da célula de função reguladora (Treg). O TGF é uma molécula com impacto na diferenciação das células Treg (Zhou *et al.*, 2008). Gerdes e colaboradores (2011) verificaram que células TCD4+ co-cultivadas com plaquetas se diferenciaram em células Th1, Th17 e Treg. O fenótipo Th1/Th17 foi observado nos primeiros 2 dias, seguidos por um fenótipo regulador. Parece que a orquestração destas moléculas, em conjunto com o ambiente ao qual estão expostas irá determinar uma resposta pró ou anti-inflamatória.

Assim, os estudos *in vitro* em cultura de células e o papel imunológico das plaquetas foram a base de nossa hipótese para o desenvolvimento desta pesquisa, um estudo piloto clínico exploratório do PRP como imunomodulador.

A eleição dos pacientes com DB foi decorrente do fato da doença apresentar alterações imunológicas, com um perfil inflamatório importante, no qual o PRP poderia exercer uma imunomodulação, com correlação clínica.

Neste estudo optou-se pelo uso de P-PRP devido à fisiopatologia da DB. Como os pacientes apresentam células T em atividade e muito reativas, houve a preocupação de se utilizar um PRP com menor número de leucócitos, a fim de evitar uma reação inflamatória de maior gravidade. O uso do PRP contendo ou não leucócitos é motivo de controvérsias na literatura. Existem autores que defendem a presença de leucócitos para o tratamento de lesões traumáticas devido ao estímulo da resposta imune contra infecções, promovendo quimiotaxia, proliferação e diferenciação de células, e indução da produção da matriz extracelular e angiogênese (Cieski-Bielecka *et al.*, 2007; Moojen *et al.*, 2008; Wrotniak *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2012). Por outro lado, outros autores pontuam que o uso de leucócitos promove também a liberação de citocinas inflamatórias, como IL-1 β , TNF- α , EROS e metaloproteinases, que podem apresentar um efeito deletério na presença de lesões teciduais (McCarrel *et al.*, 2012).

Uma das primeiras medidas foi caracterizar o PRP, uma vez que isso tem sido enfatizado na literatura: a necessidade de avaliação de parâmetros que possam ser correlacionados com os resultados clínicos e que permitam uma comparação entre os estudos. Assim, foi feita a contagem de plaquetas e leucócitos, e a dosagem de fatores de crescimento, citocinas, interleucinas, PF4/CXCL4 e sCD40L no P-PRP dos pacientes com DB. A quantificação desses fatores é muito relevante, uma vez que é creditado aos mesmos a função do PRP, apesar de poucos estudos na literatura realizarem essa análise. Além disso, não tínhamos conhecimento se a heterogeneidade da doença, também se refletiria no PRP, com grande variação individual. Isso por sua vez poderia interferir no tipo de resposta imunomoduladora de cada paciente, uma vez que se trata de uma terapêutica biológica autóloga.

Outra questão foi investigar se o uso do P-PRP poderia interferir com os processos inflamatórios e imunomoduladores dos pacientes, levando a mudanças nos componentes presentes P-PRP preparado ao longo do tempo de tratamento. Assim, foi incluída a avaliação desses parâmetros do P-PRP ao longo do período de aplicação,

A padronização do P-PRP foi realizada conforme o descrito por Amable e colaboradores (2013), e nossos resultados mostraram que o produto atingiu a qualidade esperada quanto ao número de plaquetas e leucócitos em relação ao número observado no sangue periférico, após a alteração da técnica sem o uso do *brake*. Todos os P-PRPs tiveram um aumento de 3 a 5 vezes o valor basal de plaquetas.

Em relação à concentração de interleucinas e citocinas no PRP, nos poucos estudos clínicos com pacientes com outras doenças, as dosagens foram realizadas uma única vez, de forma transversal. Além disso, a diversidade de protocolos de preparo do PRP dificulta a comparação dos resultados obtidos.

No estudo de Amable e colaboradores (2013) foram incluídos indivíduos saudáveis, e o PRP foi ativado com cloreto de cálcio ou trombina antes da dosagem, o que pode contribuir para o aumento da secreção dos fatores pelas plaquetas.

Em relação ao PRP, verificamos que a concentração de PDGF-AA estava mais alta em nosso estudo, obtendo-se um valor de 100 ng/mL vs. 9,0 ng/mL no estudo de Amable. O EGF também obtivemos um valor mais alto de 550 pg/mL no estudo de Amable vs. 1000 pg/mL. O TGF- β 1 e IL-8 apresentaram uma concentração inferior em nosso estudo. Para TGF- β 1 o valor foi de 120 ng/mL vs 210,0 ng/mL no estudo de Amable. A dosagem de IL-8 foi 10 vezes inferior em nosso estudo com valores de 11,2 pg/ml comparados a 120 pg/mL no estudo de Amable. Estas variações podem ser decorrentes de características populacionais.

A avaliação plasmática de parâmetros associados a inflamação e imunidade na DB tem sido descrita, e muito se discute sobre sua correlação quanto a atividade da doença. Estudos demonstraram uma superexpressão de IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α na DB, indicando o curso inflamatório da doença (Evereklioglu *et al.*, 2002; Sayinalp *et al.*, 1996), mas outros referem uma discordância quanto ao perfil Th1 *versus* Th2 (Frassanito *et al.* 1999, Mantas *et al.*, 1999; Raziuddin *et al.*, 1998).

Como nossa proposta foi avaliar se o P-PRP teria um efeito imunomodulador na DB, definimos que a análise dos parâmetros plasmáticos deveria ser realizada antes, durante, e após 3 e 6 meses do final das aplicações, uma vez que poderiam ser observados efeitos tardios. Também consideramos alguns dados e escores clínicos que pudessem refletir a atividade da doença, e para avaliar o efeito clínico do P-PRP, além de avaliar a correlação com os parâmetros plasmáticos.

A IL-8, conhecida como fator ativador e quimiotático para neutrófilos, é produzida predominantemente por macrófagos, células T, granulócitos e células

endoteliais. Esta interleucina está envolvida na conversão da infiltração mononuclear para granulocítica e causa um aumento da adesão dos leucócitos do sangue periférico às células endoteliais, fazendo uma ligação entre a ativação do sistema imune e alterações endoteliais na DB (Pineton *et al.*, 2012; Duzmarlar *et al.*, 2009; Gur-Toy *et al.*, 2005). A IL-8 tem sido associada a diferentes manifestações clínicas envolvendo lesões orais, acometimento dermatológico e manifestações oculares (Gur-Toy *et al.*, 2005). Por outro lado, Duzmarlar e colaboradores (2009) verificaram níveis elevados de IL-8 em pacientes com DB que apresentavam comprometimento vascular, sugerindo um alerta à possibilidade de desenvolvimento dessas lesões, mas isto não foi confirmado em outros estudos (Akkurt *et al.*, 2014).

Apesar de em geral a IL-8 estar aumentada na DB, tem-se discutido sua relação com a atividade da doença. Estudos evidenciaram uma elevação significativa de IL-8 em pacientes com doença ativa quando comparados a pacientes em inatividade ou controles saudáveis (Duzmarlar *et al.*, 2009; Mege *et al.*, 1993; Everkioglu *et al.*, 2002; Bardak e Aridogan, 2004); ou elevação nos pacientes independente da atividade da doença em relação aos controles (Sahin *et al.*, 1996).

Evereklioglu e colaboradores (2002) verificaram que pacientes em atividade da doença apresentaram valores de IL-8 significativamente elevados quando comparados a pacientes em inatividade. Os pacientes foram classificados em ativos ou inativos devido aos sintomas que apresentavam próximo ao período da coleta de sangue, sendo que a atividade foi caracterizada por ao menos três sinais clínicos comuns da DB segundo o ISGBD. Os inativos foram classificados devido à ausência de sintomas 3 meses anteriores à admissão. Os valores médios de IL-8 encontrados foram: 7,2 pg/mL (atividade DB), 5,3 pg/mL (inatividade) e 5,4 pg/mL (controles).

Em nosso estudo observamos valores inferiores aos descritos em outras publicações que avaliaram pacientes com DB, e mesmo em relação aos controles saudáveis. Este foi um achado constante durante todo o período de seguimento, com uma média de 1,5 pg/mL, diminuindo para 0,7 pg/mL aos 9 meses, mesmo na presença de úlceras orais e outros sinais clínicos de atividade da doença. Uma hipótese seria que o uso de medicamentos como corticóides e imunossupressores, mesmo em baixa dose pudessem contribuir para essa diminuição. Aos 9 meses, houve uma piora clínica da maioria dos pacientes, o que levou ao aumento da dose de corticoides ou introdução de outros imunossupressores, o que pode ter contribuído para uma diminuição ainda maior dos níveis de IL-8 no plasma. Contudo, nos outros estudos os pacientes também estavam

sob uso de medicamentos. Também é importante ressaltar que um dos critérios de exclusão deste estudo foi a presença de manifestações graves da doença e em atividade (alterações neurológicas e oculares), o que também pode explicar em parte os níveis séricos menores. Além do mais, o momento da coleta possa explicar essas diferenças, visto que a meia vida das interleucinas é muito curta, e a maior parte destes estudos utilizaram como critério de atividade a presença de manifestações clínicas no momento da coleta, as vezes até necessitando uma maior dose dos medicamentos utilizados.

A IL-10 é uma citocina do tipo Th2 que desempenha um papel na inibição de citocinas derivadas da célula Th1, diminuindo assim as respostas mediadas por Th1 (Ben Ahmed *et al.*, 2004). Ela também acarreta uma inibição da atividade das células NK e macrófagos, e conseqüentemente de suas citocinas liberadas e estímulo à diferenciação e proliferação de células B (Willians *et al.*, 2004). A IL-10 é uma potente citocina anti-inflamatória com efeitos tanto na resposta imune inata quanto adaptativa e está envolvida no controle de doenças autoimunes (Kuhn *et al.*, 1993; Rubtsov *et al.*, 2008; Saraiva e O'Garra, 2010). As células dendríticas, monócitos, macrófagos, células TCD4+, células B e T regulatórias são as principais fontes secretoras de IL-10.

No contexto da DB, ocorre uma disparidade de resultados em relação a IL-10. Raziuddin e colaboradores (1998) reportaram um aumento nos níveis de IL-10 e outras citocinas derivadas da resposta Th2 em pacientes com DB e baixos níveis de IFN- γ . Em contraste, Lehner (1999) sugeriu um perfil de células Th1 em pacientes com DB ativa, devido ao aumento significativo de IFN- γ sem aumento de IL-4. Por outro lado, Mantas e colaboradores (1999) não encontraram diferenças significativas entre a média dos valores séricos de IL-4 e IL-10 nos pacientes com DB.

No estudo de Aridogan e colaboradores (2003) foram incluídos 40 pacientes com DB sendo que 27 foram classificados como ativos, pois apresentavam sintomas clássicos segundo o ISGBD e iniciaram a terapia com colchicina. Os 13 pacientes inativos não faziam uso de nenhuma terapia. A IL-10, quantificada por ELISA, apresentou níveis significativamente aumentados em pacientes com a doença ativa, quando comparados àqueles em inatividade e controles. Os valores médios encontrados foram: 69,12 pg/mL (pacientes em atividade), 7,37 pg/mL (pacientes em inatividade), e 10,74 pg/mL (controles). Estes valores são muito superiores aos níveis encontrados em nosso estudo. Os níveis médios de IL-10 mostraram diminuição no período de seguimento, alcançando níveis significativamente menores aos 9 e 12 meses em relação ao basal. Os níveis médios da IL-10 em nosso estudo foram de 1,7 pg/mL caindo para 0,7 pg/mL em 9 meses.

Novamente nossa hipótese é que esta alteração possa ser atribuída à não atividade da doença em nossos pacientes, com apenas a presença de úlceras orais, sendo que na literatura os pacientes apresentam 2-3 sintomas clínicos, e ao uso de medicamentos, especialmente devido ao aumento da dose a partir de 9 meses. Contudo, a metodologia também deve ser considerada uma vez que os controles no estudo de Aridogan e colaboradores (2003) apresentavam níveis superiores ao observado em qualquer dosagem dos nossos pacientes.

Çekmen e colaboradores (2003) avaliaram os níveis plasmáticos de VEGF em 39 pacientes com DB, sendo 22 em atividade e 17 em inatividade, e controles. A classificação de atividade / inatividade foi definida por critérios laboratoriais como hemossedimentação e quantificação de neutrófilos, e critérios clínicos. Dentre os critérios clínicos, os pacientes em atividade tinham que apresentar no momento da admissão 3 dos 5 maiores achados clínicos da DB (lesão de pele, uveíte, patergia positiva, aftas orais ou genitais). Neste estudo, nenhum dos pacientes ou controles recebeu qualquer medicação tópica ou sistêmica por no mínimo 2 semanas antes da coleta de sangue. Os níveis de VEGF foram dosados por ELISA e os valores médios no plasma foram significativamente maiores em comparação ao controle: $347,6 \pm 87,1$ pg/mL (atividade), $219,9 \pm 51,6$ pg/mL (inatividade) e $103 \pm 43,6$ pg/mL (controle). Nosso estudo encontrou valores superiores de VEGF no plasma dos pacientes com DB quando comparado ao estudo de Çekmen e colaboradores (2003). O valor basal médio de $848,6$ pg/mL foi muito superior, ocorrendo uma diminuição gradual significativa ao longo do período de seguimento, com o menor valor em 12 meses atingindo um valor médio de $262,4$ pg/mL. Este foi semelhante ao valor dos pacientes em inatividade relatados no estudo de Çekmen (2003). Existem alguns fatores no contexto da DB que podem ser responsáveis pelo aumento da concentração de VEGF plasmática. Pela DB ser uma vasculite com inflamação sistêmica, as próprias características da doença já induzem a formação de novos vasos e podem ser fonte da produção de VEGF (Kaiser *et al.*, 1999). Além do mais, as citocinas pró-inflamatórias possuem a capacidade de estimular a expressão de VEGF (Neufeld *et al.*, 1999). Contudo, não podemos deixar de observar que nossos pacientes apresentavam um quadro clínico mais leve, e não conseguimos evidenciar um perfil de citocinas associado à inflamação, o que desfavorece ser essa a causa desses níveis de VEGF.

Em relação ao sCD40L, estudos prévios evidenciaram níveis aumentados da molécula em pacientes com DB tanto em sua forma ativa quanto inativa quando comparados ao controle (Fernandez *et al.*, 2012). Estes níveis elevados em pacientes com

DB podem ser responsáveis pela resposta inflamatória observada nestes pacientes, mesmo com opiniões contraditórias sobre se o sCD40L sozinho é capaz de induzir uma reação inflamatória em células endoteliais (Henn *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2008). Contudo, nenhum dos diferentes tratamentos determinou uma diminuição significativa dos níveis de sCD40L (Cantarini *et al.*, 2016). Cantarini e colaboradores (2016) avaliaram 57 pacientes com DB classificados em ativos ou inativos baseados na presença de pelo menos 2 achados clínicos, seja uveíte, úlcera oral/genital, doença cutânea, acometimento do sistema nervoso central, ou doença gastrointestinal. Foi considerado como alta dose de prednisona aquela entre 0,1 – 1,0 mg/kg/dia. Os valores médios de CD40L solúvel foram significativamente elevados em relação ao controle, tanto para pacientes ativos quanto em inatividade ($p < 0.0001$) e foram: 2016 ng/mL, 3354,8 ng/mL e 3489,9 ng/mL, respectivamente. Fernandez e colaboradores (2012) avaliaram 30 pacientes com DB e 28 controles, e demonstraram que os níveis médios de sCD40L foram significativamente elevados nos primeiros: 2228 pg/mL e 179 pg/mL, respectivamente. Não se demonstrou uma correlação entre os níveis de sCD40L e o número de plaquetas. Nossos resultados mostraram que os níveis médios de sCD40L foram menores do que os relatados na literatura. Os pacientes apresentaram um valor basal maior, com diminuição ao longo do seguimento, sendo significativamente menores aos 6 e 9 meses. Os valores médios encontrados em nosso estudo foram: 50,6 pg/mL basal, 12,0 pg/mL 3 meses, 2,2 pg/mL 6 meses, 14,9 pg/mL 9 meses e 27,3 pg/mL 12 meses.

No contexto da DB, Wilson e colaboradores (1988) avaliaram o perfil plaquetário de 9 pacientes com DB, todos com a presença de pelo menos 3 características clínicas para critério diagnóstico. Os pacientes clinicamente ativos apresentaram uma maior hemossedimentação e estavam sem tratamento. Não se observou diferença nos níveis de PF4/CXCL4 entre os pacientes em atividade ou inativos, com valores médios de 38 ng/mL e 40 ng/mL, respectivamente. Em nosso estudo demonstramos valores superiores de PF4/CXCL4 em todo o período de seguimento. Os valores médios da concentração de PF4/CXCL4 foram: 4200 ng/mL (basal), 5777 ng/mL (3 meses), 1534 (6 meses), 2214 (9 meses) e 3799 (12 meses), sendo significativamente menor aos 6 meses, ao fim da terapia com P-PRP, quando comparado a 12 meses.

Assim como em outros estudos publicados, a principal limitação deste estudo foi que todos os pacientes já haviam recebido tratamento, e medicações como corticoesteróides e imunossupressores reduzem a transcrição das citocinas pró-inflamatórias como a IL-8, TNF- α , IL-1 β . A colchicina tem demonstrado diminuição

significativa dos níveis de IL-6, IL-8 e TNF- α em pacientes com DB muco-cutânea (Sun *et al.*, 2009). A ciclosporina pode inibir significativamente a inflamação ocular de pacientes com DB e a expressão de IL-17 e IFN- γ (Chi *et al.*, 2010). O IFN- α induziu inibição da expressão de IL-17 e aumento da produção de IL-10 pelas células mononucleares e TCD4+ *in vitro* (Liu *et al.*, 2011). A terapia com anti-TNF- α suprime a diferenciação da célula T efetora em pacientes com DB e uveíte (Sugita *et al.*, 2012). Portanto, torna-se difícil avaliar o real nível de citocinas em estudos com a inclusão de pacientes já fazendo uso destas medicações (Durmazlar *et al.*, 2009). Mas por outro lado, como todos os pacientes dos estudos, incluindo o nosso, faziam uso de medicamentos, a diferença das concentrações deve ter influência de outros fatores não bem identificados, incluindo a metodologia e população estudada. Por se tratar de uma doença com extrema variação clínico-laboratorial, também fica difícil a comparação dos resultados. Nesse sentido, talvez essas dosagens sejam importantes na comparação intra-individual. Além disso, mesmo com kits de alta sensibilidade, nem sempre é possível a detecção das interleucinas e citocinas plasmáticas. Em nosso estudo das 12 selecionadas apenas 6 puderam ser quantificadas. Por esse motivo há uma tendência aos estudo *in vitro*.

O uso de questionários de autorrelato também representa uma limitação, uma vez que é uma análise subjetiva, porém não dispomos de outras formas de avaliação da doença como marcadores, sendo esta a única metodologia para avaliação. O não uso de controles neste estudo foi uma limitação importante, porém este estudo foi um estudo inicial, piloto.

Em relação à análise celular, verificou-se uma grande alteração nas células Treg e NK ativadas (CD69+).

As células regulatórias T CD4+ CD25+ constituem cerca de 3 a 7% das células T CD4+ no sangue periférico de humanos, mantendo assim a auto tolerância imunológica (Baecher-Allan *et al.*, 2001; Ciriaco *et al.*, 2004; Homan e Von Herrath, 2004). A remoção desta população de roedores normais levou ao desenvolvimento espontâneo de várias doenças auto-imunes. Estudos têm demonstrado que estas células também desempenham um papel crítico no controle de várias reações imunes contra bactérias, vírus, fungos e parasitas intracelulares (Belkaid *et al.*, 2002; Iwashiro *et al.*, 2001; Montagnoli *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2001). O marcador CD25 é diferencialmente regulado devido à ativação de células T, não permitindo uma distinção categórica entre as células T regulatórias ou recém ativadas. Devido a esse fato, a identificação de FoxP3 como fator de transcrição para o desenvolvimento e função da célula T CD4+ CD25+ em

camundongos tem surgido para oferecer uma solução a essa questão (Khattri *et al.*, 2003; Fontenot *et al.*, 2003; Hori *et al.*, 2003).

Walker e colaboradores (2003) em seu estudo demonstraram que o fenótipo regulatório das células T pode ocorrer de duas formas: seleção tímica (Treg natural) e ativação da célula T periférica (Treg induzida). A seleção tímica das células T regulatórias é diferente do processo convencional da célula T. Ao contrário da diferenciação da célula T CD4+ efetora, as Tregs são induzidas pelo reconhecimento do MHC na presença do peptídeo agonista no timo, uma situação em que normalmente resultaria na deleção das células T. A interação cognata do antígeno com o receptor de célula T parece ser essencial para a indução do gene FoxP3 e aquisição do fenótipo supressor (Apostolou *et al.*, 2002; Jordan *et al.*, 2001). A Treg induzida periférica depende de vários fatores, especialmente de condições imunogênicas e influência externa de algumas citocinas. Dentre as citocinas, destaca-se o TGF- β , com várias evidências sugerindo sua participação na geração de iTregs (Wan *et al.*, 2006). Estudos em humanos e camundongos têm mostrado que a indução de FoxP3 em células CD4- CD25- é mediada por TGF- β , porém a presença de IL-6 em conjunto bloqueia a expressão e guia a diferenciação para células Th17 (Fantini *et al.*, 2004; Tran *et al.*, 2007; La Cava, 2008; Afzali *et al.*, 2010).

O mecanismo de ação das células Treg tem sido estudado. Experimentos *in vitro* demonstraram que a supressão da produção de citocinas nas células T efetoras é dependente do contato célula-a-célula, pois quando estas células (T efetora e Treg) foram cultivadas com estímulo e separadas por uma membrana semipermeável, a supressão não ocorreu (Takakashi *et al.*, 1998; Thornton e Shevach, 1998; Askenasy *et al.*, 2008). Gondek e colaboradores (2005) sugerem que o efeito supressor das células Treg seja mediado por citotoxicidade, induzindo a morte do linfócito efetor. Pandiyan e colaboradores (2007) mostraram que o efeito nos linfócitos ocorre pelo consumo de IL-2 pelas Tregs, levando a uma falta desta citocina essencial para a sobrevivência das células efetoras e consequentemente a apoptose.

Hamazoui (2007) estudou a presença e as características das células T CD4+ CD25+ de pacientes com DB. Em seu estudo foi demonstrado que a frequência de células T CD4+ que expressam CD25^{high} é significativamente aumentada durante a atividade da doença quando comparada ao estágio de remissão. Nenhuma diferença significativa foi observada nos números de células T CD4+ CD25^{high} no sangue periférico de pacientes em remissão e controles. Fenotipicamente, as células T CD4+ CD25^{high} expressam altos níveis de RNAm de FoxP3. Estas células quando isoladas apresentaram características

funcionais de células T regulatórias, suprimindo a proliferação de células T CD4+ CD25-

Em nosso estudo, verificamos que os pacientes com DB apresentavam uma frequência basal muito baixa de Treg, praticamente nula e que após as aplicações de P-PRP observou-se um aumento significativo na frequência celular desta população. No entanto, é importante ressaltar que não foi avaliada a função celular das Treg. Estudos de pacientes com doenças autoimunes, especialmente a artrite reumatoide, evidenciaram que as células Treg CD4+ CD25+ eram capazes de suprimir a proliferação de células T efetoras, porém incapazes de suprimir a secreção de citocinas pró-inflamatórias de células T ativadas e monócitos (Ehresntein et al., 2004). Esta deficiência das células Treg de pacientes com artrite reumatoide está associada a uma expressão e função defeituosa de CTLA-4, uma molécula chave relacionada à função supressora das células Treg. Nesse sentido, como observamos um aumento de Treg ao longo das aplicações, a avaliação da função dessas células teria sido interessante, para compreender o efeito desse achado.

Outra célula em que houve variações significativas ao longo do seguimento dos pacientes com DB foi a NK ativada (CD69+). CD69 é uma glicoproteína transmembrana do tipo II amplamente expressa e relacionada com as lecitinas do tipo C em animais. Ela exibe expressão regulada em uma variedade de células da linhagem hematopoiética como: neutrófilos, monócitos, células T e B, NK e plaquetas. A ativação destes tipos celulares resulta na indução da expressão de CD69 na superfície celular (Natarajan *et al.*, 2000). Esta molécula é seletivamente expressa em infiltrados celulares crônicos que estão envolvidos na patogênese de doenças como artrite reumatoide, lúpus, esclerose e AIDS (González-Amaro *et al.*, 2013; Marzio *et al.*, 1999). A rápida indução da expressão de CD69 em células T sugere ativação e/ou diferenciação, que ocorre com a participação do sCD40L. Estudos *in vitro* demonstraram que o anticorpo monoclonal anti-CD69 estimulou a produção de IL-2, aumentando a proliferação da célula T, e também de TNF- α . Os achados de estudos *in vitro* mostraram alterações que caracterizam um papel pró-inflamatório tanto por mecanismos diretos ou indiretos (Testi *et al.*, 1989; Cebrián *et al.*, 1988; McInnes *et al.*, 1997). Contudo, estudos com animais transgênicos com a indução da expressão de CD69 não demonstraram uma maior condição inflamatória, sugerindo assim um duplo papel da molécula (Feng *et al.*, 2002; Nakayama *et al.*, 2002).

No contexto da DB, um grupo japonês publicou um estudo sobre o perfil NK1/NK2 e NK CD69+ em pacientes com doença ativa e inativa durante o curso da doença, e controles. A doença ativa foi definida como sintomatologia típica da DB que

necessitou de introdução ou aumento dos corticóides sistêmicos. Este subgrupo apresentou quantidades significativamente maiores de NK CD69+ quando comparados aos pacientes em inatividade ou controles (Yamaguchi *et al.*, 2010).

Em nosso estudo, observamos grandes variações na frequência das células NK CD69+ e menor frequência de Treg durante o curso da DB, sendo que aos 9 meses houve uma piora clínica nos pacientes.

Ao avaliarmos a evolução dos pacientes e os resultados laboratoriais, verificamos uma mudança significativa em alguns parâmetros como PF4/CXCL4, IL-10 e Treg, favorecendo alterações anti-inflamatórias durante o período de uso do P-PRP. É importante ressaltar que o P-PRP foi utilizado como adjuvante independente da terapia imunossupressora dos pacientes com alterações muco-cutâneas refratários à terapia convencional. Após o término das injeções, houve uma tendência à inversão do perfil, com aumento de marcadores pró-inflamatórios os quais mostraram uma diminuição novamente após 9 meses, provavelmente devido ao aumento da dose da medicação convencional em alguns pacientes que apresentaram piora neste período. Podemos questionar se a frequência de injeções de P-PRP e o período de ação possa ser determinante para o efeito biológico. Os melhores resultados foram obtidos ao longo de 3 meses de tratamento com um intervalo de 15 dias entre as injeções. Este estudo sugeriu um efeito benéfico do P-PRP autólogo sobre o perfil biológico dos pacientes com BD.

Contudo, ao avaliar o perfil desses marcadores e de Treg, que sugerem um efeito benéfico do P-PRP, não observamos uma associação com a melhora clínica desses pacientes (score clínico e número de úlceras orais). A única mudança favorável foi a diminuição do número de dias para o fechamento das úlceras. Apesar dos critérios de qualidade de vida e BR-BDCAF não terem mostrado uma resposta favorável, ficou evidente que houve diminuição no tempo de cicatrização de úlceras orais, durante todo o período de aplicação do P-PRP. Apesar de parecerem antagônicos, esses resultados ressaltam que por se tratar de uma doença muito heterogênea, nem sempre uma ferramenta de avaliação consegue detectar todos os pormenores dos achados clínicos.

Não há relatos na literatura de efeitos deletérios associados ao uso do PRP, mas 85% dos pacientes deste estudo referiram dor no local da aplicação, com duração de 3 a 4 dias e dores generalizadas na semana de aplicação, especialmente no início do estudo quando o número de leucócitos no P-PRP apresentava-se mais elevado. Um dos mecanismos envolvidos no processo inflamatório não infeccioso, e que tem sido muito discutido, é a liberação de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) como

resposta ao estresse (Schaefer, 2014). Talvez a aplicação do P-PRP possa ter induzido esse tipo de reação.

Apesar de ser um estudo piloto, com pequeno número de pacientes, o interessante foi a análise de inúmeros marcadores sistêmicos e celulares ao longo do tempo de observação, durante e após o uso do P-PRP, e que podem ser interessantes para o melhor conhecimento e caracterização da DB.

Também a caracterização do P-PRP, incluindo a avaliação dos fatores que são descritos e associados aos efeitos terapêuticos do PRP, e a demonstração da pequena variação intra e inter-individual são fatores relevantes para esse tipo de terapia, independente da DB.

A figura 27 resume os principais achados deste estudo, divididos em perfil pró e anti-inflamatório das citocinas e quantificação celular estudada.

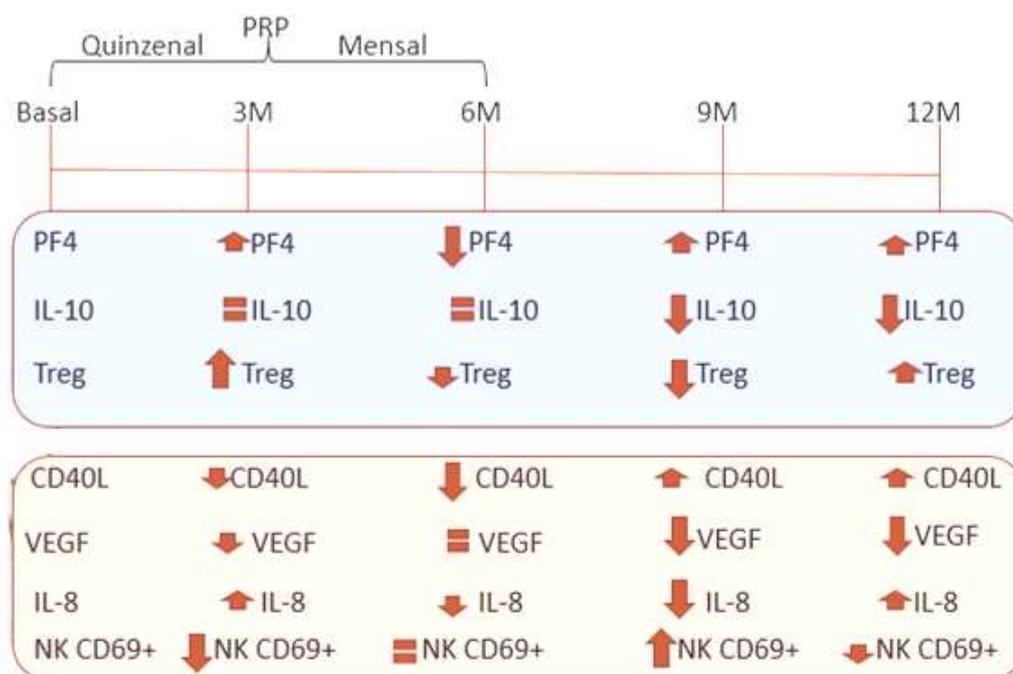


Figura 27: Principais resultados do estudo evidenciando os resultados dos perfis pró e anti-inflamatório e suas variações durante todo o período de seguimento dos pacientes com DB.

8. CONCLUSÃO

De acordo com os parâmetros analisados o P-PRP apresentou uma qualidade adequada, atingindo uma concentração média de plaquetas de 5 vezes o valor basal, e um número de leucócitos médio de 0,5. Com exceção do TGF- β 1, que mostrou uma elevação em 6 meses de aplicação, a quantificação de citocinas apresentou-se relativamente homogênea durante o período de seguimento dos pacientes.

O perfil sistêmico dos pacientes com DB durante o uso do P-PRP apresentou alterações significativas, sendo principalmente respresentando pelo aumento da frequência de células Treg em três meses, porém esta frequência não foi mantida, e diminuição de células NK ativadas, sugerindo um efeito protetor. A avaliação da função de Treg seria interessante para definir o real efeito biológico do P-PRP.

Neste estudo piloto, com um pequeno número de pacientes, mesmo não se evidenciando uma correlação clínica com as alterações sistêmicas, observamos objetivamente uma diminuição no tempo de fechamento das úlceras durante todo o período de aplicação do P-PRP. Estes achados favorecem um efeito do P-PRP em pacientes com DB e úlceras orais.

9. REFERÊNCIAS

- Afzali B, Mitchell P, Lechler RI, John S, Lombardi G. Translational mini-review series on Th17 cells: induction of interleukin-17 production by regulatory T cells. *Clin Exp Immunol.* 2010; 159:120–130.
- Akkurt, ZM, Bozkurt M, Uçmak D, Yüksel H, Uçak H, Sula B, Özkurt ZG, Yildiz M, Akdeniz D, Arica M. Serum Cytokine Levels in Behçet's Disease. *J Clin Lab Anal.* 2014; 29:317-20.
- Amable PR, Carias RBV, Teixeira MVT, Pacheco IC, Amaral RJFC, Granjeiro JM, Borojevic R. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Res Ther.* 2013; 4:1-13.
- Andia I, Abate M. Platelet-rich plasma: underlying biology and clinical correlates. *Regen Med.* 2013; 8(5):645-58.
- Andre P, Nannizzi-Alaimo L, Prasad SK, Phillips DR. Platelet-derived CD40L: the switchhitting player of cardiovascular disease. *Circulation.* 2002; 106:896–899.
- Apostolou I, Sarukhan A, Klein L, von Boehmer H. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol.* 2002; 3:756–63.
- Aridogan BC, Yildirim M, Baysal V, Inaloz HS, Baz K, Kaya S. Serum Levels of IL-4, IL-10, IL-12, IL-13 and IFN-gamma in Behçet's disease. *J Dermatol.* 2003; 30:602-7.
- Arnoczky SP, Sheibani-Rad S. The basic science of platelet-rich plasma (PRP): what clinicians need to know. *Sports Med Arthrosc.* 2013; 21:180-5.
- Askenasy N, Kaminitz A, Yarkoni S. Mechanisms of T regulatory cell function. *Autoimmun Rev.* 2008; 7:370–5.
- Azizleri G, Kose AA, Saricar R. Prevalence of Behçet's disease in Istanbul, Turkey. *Int J Dermatol.* 2003; 42:803-6.
- Baecher-allan C, Brown JA, Freeman GJ, Haefler DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood, *J Immunol.* 2001; 167:1245-53.
- Bardak Y, Aridogan BC. The demonstration of serum interleukin 6–8, tumor necrosis factor-alpha, complement, and immunoglobulin levels in Behçet's disease with ocular involvement. *Ocul Immunol Inflamm.* 2004; 12:53–8.
- Behçet H. Über rezidivierende, aphthöse, durch ein Virus verursachte Geschwüre am Munde, am Auge und an den Genitalien. *Dematologische Wochenschr.* 1937; 36:1152-1157.
- Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 2002; 420:502-7.

Ben Ahmed M, Houman H, Miled M, Dellagi K, Louzir H. Involvement of chemokines and Th1 cytokines in the pathogenesis of mucocutaneous lesions of Behçet's disease. *Arthritis Rheum.* 2004; 50:2291–5.

Bendinelli P, Matteucci E, Dogliotti G, Corsi MM, Banfi G, Maroni P, Desiderio MA. Molecular basis of anti-inflammatory action of platelet-rich plasma on human chondrocytes: mechanisms of NF- κ B inhibition via HGF. *J Cell Physiol.* 2010; 225:757-66.

Borhani HA, Sharifzad HR, Matin S, Rezaee S. The pathological presentation of neuro-Behçet disease: a case report and review of literature. *Neurologist.* 2007; 13:209-214.

Broxmeyer HE, Sherry B, Cooper S, Lu L, Maze R, Beckmann MP, Cerami A, Ralph P. Comparative analysis of the human macrophage inflammatory protein family of cytokines (chemokines) on proliferation of human myeloid progenitor cells: interacting effects involving suppression, synergistic suppression, and blocking of suppression. *J. Immunol.* 1993; 150:3448-58.

Cantarini L, Pucino V, Vitale A, Talarico R, Lucherini OM, Magnotti F, De Rosa V, Galgani M, Alviggi C, Marone G, Galeazzi M, Matarese G. Immunometabolic biomarkers of inflammation in Behçet's disease: relationship with epidemiological profile, disease activity and therapeutic regimens. *Clin Exp Immunol.* 2016; 184:197-207.

Cebrian, M. Yagüe E, Rincón M, López-Botet M, de Landázuri MO, Sánchez-Madrid F. Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1988; 168:1621–1637.

Cekmen M, Evereklioglu C, Er H, Inalöz HS, Doganay S, Türköz Y, Ozerol IH. Vascular endothelial growth factor levels are increased and associated with disease activity in patients with Behçet's syndrome. *Int J Dermatol.* 2003; 42:870-5.

Chambrun MP, Wechsler B, Geri G, Cacoub P, Saadoun D. New insights into the pathogenesis of Behçet's disease. *Autoimmun Rev.* 2012; 11:687-698.

Cieslik-Bielecka A, Gazdzik TS, Bielecki TM, Cieslik T. Why the platelet-rich gel has antimicrobial activity? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 103:303–5.

Chen C, Chai H, Wang X. Soluble CD40 ligand induces endothelial dysfunction in human and porcine coronary artery endothelial cells. *Blood.* 2008; 112:3205–3216.

Chi W, Yang P, Zhu X, Wang Y, Chen L, Huang X, Liu X. Production of interleukin-17 in Behçet's disease is inhibited by cyclosporin A. *Mol Vis.* 2010; 16:880–886.

Ciriaco A, Piccirillo CA, Thornton AM. Cornerstone of peripheral tolerance: naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *Trends in Immunol.* 2004; 25:374-80.

Cognasse F, Boussoulade F, Chavarin P, Acquart S, Fabrigli P, Lamy B, Garraud O. Release of potential immunomodulatory factors during platelet store. *Transfusion*. 2006; 46:1184-1189.

Danese S, de la Motte C, Fiocchi C. Platelets in inflammatory bowel disease: clinical, pathogenic, and therapeutic implications. *Am J Gastroenterol*. 2004; 99:938–945.

Detmar M, Yeo KT, Nagy JA, Van de Water L, Brown LF, Berse B, Elicker BM, Ledbetter S, Dvorak HF. Keratinocyte-derived vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) is a potent mitogen for dermal microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol*. 1995; 105:44–50.

Deuter CM, Zierhut M, Mohle A, Vonthein R, Stöbiger N, Kötter I. Long-term remission after cessation of interferon- α treatment in patients with severe uveitis due to Behçet's disease. *Arthritis Rheum*. 2010; 62:2796-805.

de Vriese AS, Tilton RG, Elger M, Stephan CC, Kriz W, Lameire NH. Antibodies against vascular endothelial growth factor improve early renal dysfunction in experimental diabetes. *J Am Soc Nephrol*. 2001; 12:993–1000.

Durmazlar SPK, Ulkar GB, Eskioglu F, Tatlican S, Mert A, Akgul A. Significance of serum interleukin-8 levels in patients with Behçet's disease: High levels may indicate vascular involvement. *Int J Dermatol*. 2009; 48:259–264.

Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA, Mauri C. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF α therapy. *J Exp Med*. 2004; 200:277-85.

Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev*. 2009; 229:152–72.

Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton M. Platelet-rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery. *Plast reconstr Surg*. 2006; 118:147e-159e.

Evereklioglu C, Er H, Türköz Y, Cekmen M. Serum levels of TNF- α , sIL-2R, IL-6, and IL-8 are increased and associated with elevated lipid peroxidation in patients with Behçet's disease *Mediators Inflamm*. 2002; 11:87-93.

Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF. Cutting edge: TGF- β induces a regulatory phenotype in CD4⁺CD25⁻ T cells through FoxP3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol*. 2004; 172:5149–53.

Feng C, Woodside KJ, Vance BA, El-Khoury D, Canelles M, Lee J, Gress R, Fowlkes BJ, Shores EW, Love PE. A potential role for CD69 in thymocyte emigration. *Int. Immunol*. 2002; 14:535–544.

Fernandez BI, Alvarez MT, Lopez-Longo FJ, Arias-Salgado EG, Martín M, Jiménez-Yuste V, Rodríguez de la Rúa A, Butta NV. Platelet soluble CD40L and matrix metalloproteinase 9 activity are proinflammatory mediators in Behçet disease patients. *Thromb Haemost.* 2012; 107:88–98.

Fleischer J, Grage-Griebenow E, Kasper B, Heine H, Ernst M, Brandt E, Flad HD, Petersen F. Platelet factor 4 inhibits proliferation and cytokine release of activated human T cells. *J Immunol.* 2002; 169:770–777.

Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1:27–31.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. FoxP3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003; 4:330-6.

Frassanito MA, Dammacco R, Cafforio P, Dammacco F. Th1 polarization of the immune response in Behçet's disease: a putative pathogenetic role of interleukin-12. *Arthritis Rheum.* 1999; 42:1967–74.

Fresko I, Yazici H, Bayramiçli M, Yurdakul S, Mat C. Effect of surgical cleaning of the skin on the pathergy phenomenon in Behçet's syndrome. *Ann of Rheum Dis.* 1993; 52:619-620.

Garlichs CD, Eskafi S, Raaz D, Schmidta A, Ludwiga J, Herrmannb M, Klinghammera L, Daniela WG, Schmeissera A. Patients with acute coronary syndromes express enhanced CD40 ligand/CD154 on platelets. *Heart.* 2001; 86:649–655.

Gerdes N, Zhu L, Ersay M, Hermansson A, Hjemdahl P, Hu H, Hansson GK, Li N. Platelets regulate CD4+ T cell differentiation via multiple chemokines in humans. *Thromb Haemost.* 2011; 106: 353–62.

Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol.* 2005; 174:1783-6.

Gonzalez-Amaro R, Cortes JR, Sanchez-Madrid F, Martin P. Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases? *Trends Mol. Med.* 2013; 19:625–632.

Grutzkau A, Kruger-Krasagakes S, Baumeister H, *et al.* Synthesis, storage, and release of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VGF) by human mast cells: implications for the biological significance of VEGF206. *Mol Biol Cell.* 1998; 9:875–884.

Gul A. Behçet's disease: an update on the pathogenesis. *Clin Exp Rheumatol.* 2001; 19:S6-S12.

Gur-Toy G, Lenk N, Yalcin B, Aksaray S, Alli N. Serum interleukin- 8 as a serologic marker of activity in Behçet's disease. *Int J Dermatol.* 2005; 44:657–680.

Hamuryudan V, Mat C, Saip S, Ozyazgan Y, Siva A, Yurdakul S, Zwingenberger K, Yazici H. Thalidomide in the treatment of the mucocutaneous lesions of the Behçet syndrome. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med.* 1998; 128:443-50.

Hamuryudan V, Ozyazgan Y, Fresko Y, Mat C, Yurdakul S, Yazici H. Interferon alfa combined with azathioprine for the uveitis of Behçet's disease: an open study. *Isr Med Assoc J.* 2002; 49:28-30.

Hamzaoui K. Paradoxical high regulatory T cell activity in Behçet's disease. *Clin Exp Rheumatol.* 2007; 25:S107-13.

Harman E, Sayarhoglu M, Harman M, Sayarhoglu H. The evaluation of coagulation parameters and vessel involvement in Behçet's Disease: Study of 152 cases. *Acta Med Iran.* 2013; 51:215-223.

Hayasaki N, Ito M, Ina K, Ando T, Kusugami K, Goto H. Neutrophilic phlebitis is characteristic of intestinal Behçet's disease and simple ulcer syndrome. *Histopathology.* 2004; 45:377-383.

Henn V, Steinbach S, Buchner K, Presek P, Kroczeck RA. The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. *Blood.* 2001; 98:1047-1054.

Hirohata S, Kikuchi H. Behçet disease. *Arthritis Res Ther.* 2003; 5:139-146.

Homan D, Von Herrath M. Regulatory T cells and type 1 diabetes. *Clin Immunol.* 2004; 112:2002-9.

Hori S, Nomura T, Ssakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor FoxP3. *Science.* 2003; 299:1057-61.

International Study Group for Behçet's Disease Criteria for diagnosis of Behçet's disease. *Lancet.* 1990; 335:1078-1080.

International Team for the Revision of the International Criteria for Behçet's Disease (ITR-ICBD). The International Criteria for Behçet's Disease (ICBD): a collaborative study of 27 countries on the sensitivity and specificity of the new criteria. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2014; 28:338-47.

Iwashiro M, Messer RJ, Peterson KE, Stromnes IM, Sugie T, Hasenkrug KJ. Immunosuppression by CD4+ regulatory T cells induced by chronic retroviral infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98:9226-30.

Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Holenbeck AE, Lerman MA, Reed AJ, Petrone AL, Holenbeck AE, Lerman MA, Najji A, Caton AJ. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist selfpeptide. *Nat Immunol.* 2001; 2:301-6.

Kaiser M, Younge B, Bjornsson J, Jörg J, Goronzy, and Cornelia M. Weyand. Formation of new vasa vasorum in vasculitis. Production of angiogenic cytokines by multinucleated giant cells. *Am J Pathol.* 1999; 155:765–774.

Kato K, Santana-Sahagún E, Rassenti LZ, Michael H. Weisman, Tamura N, Kobayashi S, Hashimoto H, Kipps TJ. The soluble CD40 ligand sCD154 in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 1999; 104:947–955.

Keyt B, Berleau L, Nguyen H, *et al.* The carboxyl-terminal domain (111–165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J Biol Chem.* 1996; 271:7788–7795.

Khabbazi A, Rashtchizadeh N, Ghorbanihaghjo A, Hajjaliloo M, Ghojzadeh M, Taei R, Kolahi S. The status of serum vitamin D in patients with active Behçet's disease compared with controls. *Int J Rheum Dis.* 2013; 17:430-4.

Khattari R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol.* 2003; 4:337-42.

Kim J, Chae J, Kim S, Ha J. Subpopulations of regulatory T cells in rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, and Behçet's disease. *J Korean Med Sci.* 2012; 27:1009-1013.

Koç Y, Güllü I, Akpek G, Akpolat T, Kansu E, Kiraz S, Batman F, Kansu T, Balkanci F, Akkaya S, Telatar H, Zileli T. Vascular involvement in Behçet's disease. *J Rheumatol.* 1992; 19:402-410.

Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell.* 1993; 75:263-74.

Kural-Seyahi E, Fresko I, Seyahi N, Ozyazgan Y, Mat C, Hamuryudan V, Yurdakul S.; Yazici, H. The long-term mortality and morbidity of Behçet syndrome: a 2-decade outcome survey of 387 patients followed at a dedicated center. *Medicine (Baltimore).* 2003; 82:60-76.

La Cava A. Tregs are regulated by cytokines: implications for autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2008; 8:83–7.

Ladoux A, Frelin C. Expression of vascular endothelial growth factor by cultured endothelial cells from brain microvessels. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 194: 799–803.

Lehner T. Immunopathogenesis of Behçet's disease. *Ann Med Interne.* 1999; 150:483-487.

Li M, Zhang C, Ai Z, Yuan T, Feng Y, Jia W. Therapeutic effectiveness of intra-knee-articular injection of platelet-rich plasma on knee articular cartilage degeneration. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* 2011; 25:1192-1196.

- Liang Y, Xu W, Min Z, Qiu L, Ni J, Wang X, Wen P, Cen H, Leng R, Pan H, Ye D. Meta-analysis of association between cytokine gene polymorphisms and Behçet's disease risk. *Int J Rheum Dis*. 2013; 16:616-24.
- Liao HT, Marra KG, Rubin JP. Application of platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in fat grafting: basic science and literature review. *Tissue Eng Part B Rev*. 2013; 20:267-76.
- Lievens D, Eijgelaar WJ, Biessen EA, Daemen MJ, Lutgens E. The multi-functionality of CD40L and its receptor CD40 in atherosclerosis. *Thromb Haemost*. 2009; 102: 206–214.
- Lippross S, Moeller B, Haas H, Tohidnezhad M, Steubesand N, Wruck CJ, Kurz B, Seekamp A, Pufe T, Varoga D. Intraarticular injection of platelet-rich plasma reduces inflammation in a pig model of rheumatoid arthritis of the knee joint. *Arthritis Rheum*. 2011; 63:3344-3353.
- Liu CY, Battaglia M, Lee SH, Sun QH, Aster RH, Visentin GP. Platelet factor 4 differentially modulates CD4+CD25+ (regulatory) versus CD4+CD25- (nonregulatory) T cells. *J Immunol*. 2005; 174:2680-6.
- Liu X, Yang P, Wang C, Li F, Kijlstra A. IFN-alpha blocks IL- 17 production by peripheral blood mononuclear cells in Behçet's disease. *Rheumatology (Oxford)* 2011; 50:293–298.
- Luster AD. Chemokines: chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J Med*. 1998; 338:436-45.
- Mantas C, Direskeneli H, Eksioğlu-Demiralp E, Akoglu T. Serum levels of Th2 cytokines IL-4 and IL-10 in Behçet's disease. *J Rheumatol*. 1999; 26:510–2.
- Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004; 62:489-486.
- Marzio R, Mauel J, Betz-Corradin S. CD69 and regulation of the immune function. *Immunopharmacol. Immunotoxicol*. 1999; 21:565–582.
- Masuda K, Nakajima A, Urayama A, Nakae K, Kogure M, Inaba G. Double masked trial of cyclosporine versus colchicine and long-term open study of cyclosporine in Behçet's disease. *Lancet*. 1989; 20:1093-1096.
- Mat C, Yurdakul S, Sevim A, Ozyazgan Y, Tuzun Y. Behçet's syndrome: Facts and controversies. *Clin Dermatol*. 2013; 31:352-361.
- Mat C, Yurdakul S, Uysal S, Gogus F, Ozyazgan Y, Uysal O, Fresko I, Yazici H. Double-blind trial of depot corticosteroids in Behçet's syndrome. *Rheumatol*. 2006; 45:348-352.
- Matsuo T, Itami M, Nakagawa H, Nagayama M. The incidence and pathology of conjunctival ulceration in Behçet's syndrome. *Br J Dermatol*. 2002; 86:140-143.

McCarrel TM, Minas T, Fortier LA. Optimization of leukocyte concentration in platelet-rich plasma for the treatment of tendinopathy. *J Bone Joint Surg Am.* 2012; 94:e143.

McInnes IB, Leung BP, Sturrock RD, Field M, Liew FY. Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor- α production in rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* 1997; 3:189–195.

Mege JL, Dilsen N, Sanguedolce V, Gul A, Bongrand P, Roux H, Ocal L, Inanç M, Capo C. Overproduction of monocyte derived tumor necrosis factor alpha, interleukin (IL) 6, IL-8 and increased neutrophil superoxide generation in Behçet's disease. A comparative study with familial Mediterranean fever and healthy subjects. *J Rheumatol.* 1993; 20:1544–1549.

Melikoglu M, Fresko I, Mat C, Ozyazgan Y, Gogus F, Yurdakul S, Hamuryudan V, Yazici H. Short-term trial of etanercept in Behçet's disease: a double blind, placebo controlled study. *J Rheumatol.* 2005; 32:98-105.

Menard C, Pacelli L, Bassi G, Dulong J, Bifari F, Bezier I, Zanoncello J, Ricciardi M, Latour M, Bourin P, Schrezenmeier H, Sensebé L, Tarte K, Krampera M. Clinical-grade mesenchymal stromal cells produced under various good manufacturing practice processes differ in their immunomodulatory properties: standardization of immune quality controls. *Stem Cells Dev.* 2013; 22:1789-801.

Menchén L, Marín-Jiménez I, Arias-Salgado EG, Fontela T, Hernández-Sampelayo P, Rodríguez MC, Butta NV. Matrix metalloproteinase 9 is involved in Crohn's disease-associated platelet hyperactivation through the release of soluble CD40 ligand. *Gut* 2009; 58:920–928.

Montagnoli C, Bacci A, Bozza S, Gaziano R, Mosci P, Sharpe AH, Romani L. B7/CD28-dependent CD4+CD25+ regulatory cells are essential components of the memory-protective immunity to *Candida albicans*. *J Immunol.* 2002; 169:6298-308.

Moojen DJ, Everts PA, Schure RM, Overdevest EP, van Zundert A, Knape JT, Castelein RM, Creemers LB, Dhert WJ. Antimicrobial activity of platelet-leukocyte gel against *Staphylococcus aureus*. *J Orthop Res.* 2008; 26:404–10.

Morrell CN, Aggrey AA, Chapman LM, Modjeski KL. Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. *Blood.* 2014; 123:2759-67.

Nakayama T, Kasprowicz DJ, Yamashita M, Schubert LA, Gillard G, Kimura M, Didierlaurent A, Koseki H, Ziegler SF. The generation of mature, single-positive thymocytes in vivo is dysregulated by CD69 blockade or overexpression. *J. Immunol.* 2002; 168:87–94.

Natarajan K, Sawicki MW, Margulies DH, Mariuzza RA. Crystal structure of human CD69: a C-type lectin-like activation marker of hematopoietic cells. *Biochemistry.* 2000; 39:14779–14786.

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 1999; 13:9–22.

Neves FS, Carrasco S, Goldenstein-Schaimberg C, Gonçalves CR, Mello SBV. Neutrophil hyperchemotaxis in Behçet's disease: a possible role for monocytes orchestrating bacterial-induced immune responses. *Clin Rheumatol.* 2009; 28:1403-1410.

Neves FS, Moraes JC, Kowalski SC, Goldenstein-Schaimberg C, Lage LV, Gonçalves CR. Cross-cultural adaptation of the Behçet's Disease Current Activity Form (BDCAF) to Brazilian Portuguese language. *Clin Rheumatol.* 2007; 26:1263-7.

Neves FS, Spiller F. Possible mechanisms of neutrophil activation in Behçet's disease. *Int Immunopharmacol.* 2013; 17:1206-1210.

Noel N, Drier A, Wechsler B, Piette J, De Paz R, Cacoub P, Saadoun D. Manifestations neurologiques de la maladie de Behçet. *La Revue de Médecine Interne.* 2014 ; 35:112-120.

Onal S, Kazokoglu H, Koc A, Akman M, Bavbek T, Direskeneli H, Yavuz S. Long-term efficacy and safety of low-dose and dose-escalating interferon alfa-2a therapy in refractory Behçet uveitis. *Arch Ophthalmol.* 2011; 129:288-94.

O'Neil TW, Rigby AS, McHugh S, Silman AJ, Barnes C. On behalf of the International Study Group for Behçet's Disease. Regional differences in clinical manifestations of Behçet's disease. *Elsevier.* 1993;159-164.

Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Leonardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol.* 2007; 8:1353-62.

Patel S, Dhillon MS, Aggarwal S, Marwaha N, Jain A. Treatment with platelet-rich plasma is more effective than placebo for knee osteoarthritis: a prospective, double-blind, randomized trial. *Am J Sports Med.* 2013; 41:356-364.

Pineton de Chambrun M, Wechsler B, Geri G, Cacoub P, Saadoun D. New insights into the pathogenesis of Behçet's disease. *Autoimmun Rev.* 2012; 11:687–98.

Raziuddin S, Al-Dalaan A, Bahabri S, Siraj AK, Al-Sedairy S. Divergent cytokine production profile in Behçet's disease: altered Th1/Th2 cell cytokine pattern. *J Rheumatol.* 1998; 25:329–33.

Rubtsov YP, Rasmussen JP, Chi EY, Fontenot J, Castelli L, Ye X, Treuting P, Siewe L, Roers A, Henderson WR Jr, Muller W, Rudensky AY. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* 2008; 28:546–58.

Saadoun D, Wechsler B, Desseaux K, Le Thi Huong D, Amoura Z, Resche-Rigon M, Cacoub P. Mortality in Behçet's disease. *Arthritis Rheum.* 2010; 62:2806-2812.

Sachetto Z, Mahayri N, Ferraz RH, Costallat LTL, Bertolo MB. Behçet's disease in Brazilian patients: demographic and clinical features. *Rheumatol Int.* 2012; 32:2063-2067.

Sahin S, Akoglu T, Direskeneli H, Sen LS, Lawrence R. Neutrophil adhesion to endothelial cells and factors affecting adhesion in patients with Behçet's disease. *Ann Rheum Dis.* 1996; 55:128-133.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995; 155:1151-1164.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J. Immunological tolerance maintained by CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev.* 2001; 182:18-32.

Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10:170-81.

Sarvajnamurthy S, Suryanarayan S, Budamakuntala L, Suresh DH. Autologous platelet rich plasma in chronic venous ulcers: study of 17 cases. *J Cutan Aesthet Surg.* 2013; 6:97-99.

Sayinalp N, Ozcebe OI, Ozdemir O, Haznedaroglu IC, Dundar S, Kirazli S. Cytokines in Behçet's disease. *J Rheumatol.* 1996; 23:321-2.

Schaefer L. Complexity of danger: The diverse nature of damage associated molecular patterns. *J Biol Chem.* 2014; 289:35237-35245.

Semple JW, Junior JEI, Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol.* 2011; 11:264-274.

Sfikakis PP, Marcomichelakis N, Alpsoy E, Assaad-Khalil S, Bodaghi B, Gul A, Ohno S, Pipitone N, Schirmer M, Stanford M, Wechsler B, Zouboulis C, Kaklamani P, Yazici H. Anti-TNF therapy in the management of Behçet's disease-review and basis for recommendations. *Rheumatol.* 2007; 46:736-41.

Shahneh FZ, Mohammadian M, Babaloo Z, Baradaran B. New approaches in immunotherapy of Behcet disease. *Adv Pharm Bull.* 2013; 3:9-11.

Shi G, Field DJ, Ko KA, Ture S, Srivastava K, Levy S, Kowalska MA, Poncz M, Fowell DJ, Morrell CN. Platelet factor 4 limits Th17 differentiation and cardiac allograft rejection. *J Clin Invest.* 2014; 124:543-52.

Shim J, Lee E, Park S, Bang D, Sohn S. CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells ameliorate Behçet's disease-like symptoms in a mouse model. *Cytotherapy.* 2011; 13:835-847.

Singh B, Read S, Asseman C, Malmstrom V, Mottet C, Stephens LA, Stepankova R, Tlaskalova H, Powrie F. Control of intestinal inflammation by regulatory T cells, *Immunol Ver.* 2001; 182:190-200.

Smyth SS, McEver RP, Weyrich AS, Morrell CN, Hoffman MR, Arepally GM, French PA, Dauerman HL, Becker RC. Platelet Colloquium Participants. Platelet functions beyond hemostasis. *J Thromb Haemost.* 2009; 7:1759-1766.

Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, Dzuiba J, Van Damme J, Walz J, Marriott D, Chan SY, Roczniak S, Shanafelt AB The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 1995; 270:27348-57.

Srivastava K, Cockburn IA, Swaim A, Thompson LE, Tripathi A, Fletcher CA, Shirk EM, Sun H, Kowalska MA, Fox-Talbot K, Sullivan D, Zavala F, Morrell CN. Platelet factor 4 mediates inflammation in experimental cerebral malaria. *Cell Host Microbe.* 2008; 4:179-187.

Sugita S, Kawazoe Y, Imai A, Kawaguchi T, Horie S, Keino H, Takahashi M, Mochizuki M. Role of IL-22 and TNF- α producing Th22 cells in uveitis patients with Behçet disease. *J Immunol.* 2013; 190:5799-5808.

Sugita S, Kawazoe Y, Imai A, Yamada Y, Horie S, Mochizuki M. Inhibition of Th17 differentiation by anti-TNF- α therapy in uveitis patients with Behçet's disease. *Arthritis Res Ther.* 2012; 14:R99.

Sun A, Wang YP, Chia JS, Liu BY, Chiang CP. Treatment with levamisole and colchicine can result in a significant reduction of IL-6, IL-8 or TNF- α level in patients with mucocutaneous type of Behçet's disease. *J Oral Pathol Med.* 2009; 38: 401–405.

Sut N, Seyahi E, Yurdakul S, Senocak M, Yazici H. A cost analysis of Behçet's syndrome in Turkey. *Rheumatol.* 2007;46:678-82.

Takagi H, King GL, Ferrara N, Aiello LP. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor receptor KDR/Flk gene expression through adenosine A2 receptor in retinal capillary endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996; 37:1311–1321.

Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol.* 1998; 10:1969–80.

Testi R, Phillips JH, Lanier LL. T cell activation via Leu-23 (CD69). *J. Immunol.* 1989; 143:1123–1128.

Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med.* 1998; 188:287–96.

Torrero JI, Aroles F, Ferrer DJ. Treatment of knee chondropathy with platelet rich plasma. Preliminary results at 6 months of follow-up with only one injection. *Biol Regul Homeost Agents*. 2012; 26:71S-78S.

Toubi E, Shoenfeld Y. The role of CD40–CD154 interactions in autoimmunity and the benefit of disrupting this pathway. *Autoimmunity* 2004; 37:457–64.

Tran DQ, Ramsey H, Shevach EM. Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood*. 2007; 110:2983–90.

Xiong M, Elson G, Legarda D, Leibovich SJ. Production of vascular endothelial growth factor by murine macrophages: regulation by hypoxia, lactate and the inducible nitric oxide synthase pathway. *Am J Pathol*. 1998; 153:587–598.

Walker MR, Kasprovicz DJ, Gersuk VH, Bènard A, Landeghen MV, Buckner JH, Ziegler SF. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest*. 2003; 112:1437-43.

Wan YY, Flavell RA. The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells. *Immunol Rev*. 2006; 212:114–30.

Williams LM, Ricchetti G, Sarma U, Smallie T, Foxwell BM. Interleukin-10 suppression of myeloid cell activation—a continuing puzzle. *Immunology*. 2004; 113:281–292.

Wilson AP, Efthimiou J, Betteridge DJ. Decreased prostacyclin sensitivity of platelets in patients with Behçet's syndrome. *Eur J Clin Invest*. 1988; 18:410-4.

Wrotniak M, Bielecki T, Gazdzik TS. Current opinion about using the platelet-rich gel in orthopaedics and trauma surgery. *Ortop Traumatol Rehabil*. 2007; 9:227–38.

Yamaguchi Y, Takahashi H, Satoh T, Okazaki Y, Mizuki N, Takahashi K, Ikezawa Z, Kuwana M. Natural killer cells control a T-helper 1 response in patients with Behçet's disease. *Arthritis Res Ther*. 2010; 12:1-9.

Yazici Y. From the silk road to the states. *The Rheumatologist*. 2010; 7:24-26.

Yazici H, Pazarli H, Barnes CG, Tüzün Y, Özyazgan Y, Silman A, Serdaroğlu S, Oğuz V, Yurdakul S, Lovatt GE, Yazici B, Somani S, Müftüoğlu AA controlled trial of azathioprine in Behçet's syndrome. *N Eng J Med*. 1990; 322:281-285.

Yuan T, Guo SC, Han P, Zhang CQ, Zeng BF. Applications of leukocyte- and platelet-rich plasma (L-PRP) in trauma surgery. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012; 13:1173–84.

Yurdakul S, Yazici H. Behçet's syndrome. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2008; 22: 793-809.

Zhang C, Zhang J, Tian Z. The regulatory effect of natural killer cells: do 'NK-reg cells' exist? *Cell Mol Immunol*. 2006; 3:241-254.

Zeghidi H, Saadoun D, Bodaghi B. Ocular manifestations in Behçet's disease. *La Revue de Médecine Interne*. 2014; 35:97-102.

Zhou L, Lopes JE, Chong MM, Ivanov II, Min R, Victora GD, Shen Y, Du J, Rubtsov YP, Rudensky AY, Ziegler SF, Littman DR. TGF-beta-induced FoxP3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function. *Nature*. 2008; 453:236-40.

Zouboulis CC, Kötter I, Djawari D, Kirch W, Kohl PK, Ochsendorf FR, Keitel W, Stadler R, Wollina U, Proksch E, Söhnchen R, Weber H, Gollnick HP, Hölzle E, Fritz K, Licht T, Orfanos CE. Epidemiological features of Adamantiades- Behçet's disease in Germany and Europe. *Yonsei Med J*. 1997; 38:411-422.

10. ANEXOS

10.1. Anexo I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do Projeto: “AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO TRATAMENTO FEITO COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM PACIENTES COM DOENÇA DE BEHÇET”

Responsáveis pelo projeto: Orientadora: Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi

Doutoranda: Stephany Cares Huber

Convite

Você está sendo convidado a participar desta pesquisa clínica porque você tem Doença de Behçet (DB). A Doença de Behçet é uma inflamação no corpo todo, devido à pré-disposição genética, que ocasiona uma intensa resposta das células de defesa do paciente podendo comprometer os olhos, a pele, o sistema nervoso, os pulmões, o trato gastro intestinal, entre outros. Nesta pesquisa, será utilizado um tratamento novo, ainda em estudo, chamado Plasma Rico em Plaquetas (PRP). O plasma é a parte líquida do seu sangue, e as plaquetas são fragmentos de células presentes neste plasma, que apresentam a principal função de estancar sangramentos, portanto o PRP é um pequeno volume de plasma que apresenta um grande número de plaquetas. O uso de PRP neste estudo é investigacional, o que significa que ele está sendo estudado e não foi aprovado pelas autoridades regulatórias brasileiras como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA.

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária. A pesquisa incluirá somente pessoas que aceitem participar. Leia este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com cuidado e tome a sua decisão. Mesmo se você decidir participar, você é livre para sair do estudo a qualquer momento, sem dar explicação. Isso não irá afetar seus cuidados clínicos futuros de nenhuma forma. Além disso, se você decidir não participar, seus cuidados clínicos não serão prejudicados e não haverá nenhuma penalidade ou perda de benefícios que você tem direito. A pesquisadora do estudo irá conversar com você sobre este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, peça a ela para explicar alguma palavra ou informação que você não entender claramente.

Informações Gerais

Este estudo será realizado no Ambulatório de Medicina Regenerativa/Hemocentro – Unicamp. Vamos avaliar os possíveis benefícios da aplicação de PRP em pacientes com DB. As plaquetas, que estão em grande quantidade no PRP, apresentam pequenos grãos em seu interior que são substâncias necessárias e importantes, podendo auxiliar na cicatrização, regeneração de tecidos, e também podem promover a regulação do sistema de defesa do paciente (imunológico).

Este tipo celular é obtido do sangue, através de punção da veia, em seguida será processado em ambiente livre de contaminação, em laboratório, para obtenção do PRP. Os componentes presentes nas plaquetas podem regular o sistema de defesa do organismo (sistema imunológico) no processo da DB. Portanto, esse estudo pretende avaliar a ação do tratamento feito com PRP em pacientes com Behçet, como reguladoras do sistema de defesa do organismo. As aplicações dessas células ocorrerão a cada quinze dias nos primeiros três meses e depois mensalmente até completar um ano de tratamento. Vamos realizar exames para avaliar a resposta imunológica do senhor (a), além de verificar se houve melhora nas manifestações clínicas da doença em relação ao início do tratamento, para analisar se o tratamento está tendo efeito.

No início do tratamento vamos coletar amostras de sangue para realizar uma avaliação da função do fígado e rins, através do sangue, e o senhor (a) responderá a um questionário, que inclui dados relativos ao diagnóstico, tratamento, e evolução clínica (esta mesma avaliação será novamente realizada a cada 2 sessões de aplicação).

Para o tratamento, a cada aplicação, vamos coletar 55 mL de sangue do senhor (a) em tubos a vácuo livres de contaminação. Esses tubos irão passar por dois processos de centrifugação, até chegar ao produto final, que será um concentrado de plaquetas, o qual será imediatamente injetado debaixo da pele, na parte inferior do abdome. As aplicações serão realizadas com intervalo de 15 dias entre cada aplicação nos três primeiros meses de tratamento, passando para uma por mês até completar um ano de tratamento, totalizando em no máximo 15 aplicações, durante doze meses de tratamento. Para avaliar o tratamento serão feitas 5 coletas de sangue do paciente, uma antes do tratamento, e as outras quatro após 3, 6, 9 e 12 meses do início do tratamento, onde serão avaliadas substâncias que fazem parte da inflamação e do comprometimento imunológico na doença. Se houver piora tanto na resposta imunológica quanto nos sintomas, o tratamento será suspenso. O senhor (a) será liberado (a) imediatamente após a aplicação.

Dentre os possíveis riscos do paciente com a utilização do PRP autólogo, ou seja, do próprio organismo, destacamos: riscos anestésicos, infecção local, início de quadro de dor leve na área injetada, aumento da medicação analgésica. Devemos ressaltar ainda que riscos mais graves como desenvolvimento de tumores, coma ou óbito podem ocorrer, mesmo ainda não havendo relatos na literatura médica de tal ocorrência. Estes são riscos relacionados com o uso de terapia celular, ou seja, qualquer tratamento em que utilizamos células. Lembramos que o paciente continua sujeito às complicações pertinentes à sua doença de base.

O benefício esperado com a sua participação seria a regulação do sistema imunológico, verificado através da diminuição de populações celulares alteradas em sua doença e diminuição da inflamação. Além disso, espera-se aumento na quantidade de células reguladoras, e conseqüentemente a melhora das manifestações clínicas dos pacientes, sendo esperada uma menor atividade da doença avaliada através da diminuição da sintomatologia em termos de quantidade e intensidade de crises.

Outras informações:

1. O voluntário estará livre para desistir do estudo a qualquer tempo, mesmo que inicialmente tenha concordado em fazê-lo.
2. O voluntário poderá tirar todas suas dúvidas que tiver, ou que apareçam durante o estudo, sobre o mesmo, havendo o compromisso do pesquisador em respondê-las.
3. Caso seja realizado outro estudo com este material, o senhor (a) será devidamente informado e questionado se concorda com a participação de outro estudo. Este novo estudo só será realizado após nova autorização do comitê de ética em pesquisa desta instituição.
4. Todas as informações obtidas pelo estudo terão um caráter sigiloso e confidencial e serão usadas apenas com a finalidade de divulgação e publicação científica, e sua identidade será preservada.
5. A sua discordância em participar do estudo não lhe acarretará nenhum prejuízo em qualquer outro tratamento ou procedimento que possa necessitar futuramente em qualquer serviço de nosso hospital.
6. Portanto, tendo em vista as considerações explicadas acima, o senhor (a) poderá escolher em relação a este estudo uma das seguintes opções:
 - a. () Concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.

b. () Concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

c. () Concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, dispensando meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

Autorização do paciente

Leia esta seção com cuidado e, se estiver de acordo, assine e date no final na página.

- Eu recebi detalhes dos efeitos colaterais conhecidos ou previsíveis e riscos da medicação e dos procedimentos do estudo que eu possa receber.
- Eu entendi que sou livre para aceitar ou recusar a minha participação a qualquer momento sem dar explicação. A minha decisão em aceitar ou recusar minha participação não terá nenhum efeito sobre a minha continuação no tratamento. Vou manter todos os meus direitos aos tratamentos disponíveis.
- Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam utilizados somente para a finalidade do estudo, sob forma codificada, no que diz respeito a confidencialidade dos meus dados.
- Eu não vou perder nenhum direito que eu tenha, segundo as leis locais, assinando e datando este documento.
- Eu li e entendi a informação apresentada neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Foi dada a mim a oportunidade de fazer perguntas e todas as perguntas foram respondidas.
- Eu (ou meu representante legal) assinarei e datarei duas vias deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Receberei um original assinado e datado e outro original e datado será guardado nos arquivos médicos da pesquisa.

O documento será assinado simultaneamente, (isto é, mesma data), por todas as partes envolvidas:

_____	_____
Nome do Paciente (letra de forma)	RG
_____	____/____/____
Assinatura	Data
_____	____/____/____
Endereço	Data de Nascimento
_____	_____
Nome do Representante Legal (se aplicável)	RG

Relação com o paciente	
_____	____/____/____
Assinatura	Data
_____	____/____/____
Endereço	Data de Nascimento

Consentimento para armazenamento de amostra

Caso além de participar da pesquisa você concorde em manter a amostra coletada armazenada no Biorrepositório do Laboratório de Hemostasia do Hemocentro da UNICAMP, assine seu nome diante da opção “SIM, aceito que minha amostra seja armazenada”. Neste caso, você deve estar ciente que esta amostra só poderá ser utilizada após sua autorização. Caso não concorde, assine seu nome diante da opção “Não, não aceito que minha amostra seja armazenada”.

SIM, eu aceito que minha amostra seja armazenada

NÃO, eu não aceito que minha amostra seja armazenada

Qualquer tipo de queixa ou reclamação relacionada a esta pesquisa o senhor (a) poderá entrar em contato com o Comitê de ética em Pesquisa (CEP) da FCM – UNICAMP (Telefone: 19 – 3521-8936).

Campinas ___/___/___

Assinatura do Voluntário

Joyce M. Annichino-Bizzacchi

Médico - Pesquisador

Telefone: (19) 3521- 8601

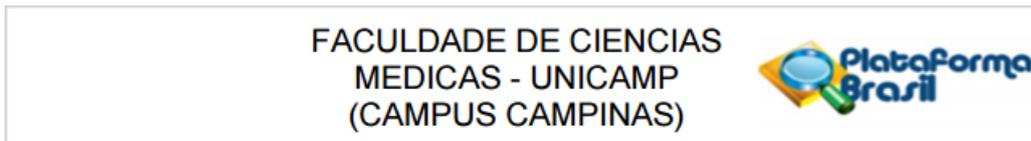
Stephany Cares Huber

Doutoranda

Telefone: (19) 3521-8755

10.2. Anexo II

Parecer circunstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO TRATAMENTO FEITO COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM PACIENTES COM DOENÇA DE BEHÇET

Pesquisador: Stephany Cares Huber

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 27542214.3.0000.5404

Instituição Proponente: Centro de Hematologia e Hemoterapia - HEMOCENTRO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 566.541

Data da Relatoria: 03/04/2014

Recomendações:

SEM

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto considerado aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Cabe ao pesquisador desenvolver o projeto conforme delineado, elaborar e apresentar os relatórios parciais e final, bem como encaminhar os resultados para publicação com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto (Resolução 466/2012 CNS/MS).

10.3. Anexo III**FORMULÁRIO DE ATIVIDADE DA DOENÇA DE BEHÇET (BR-BDCAF)**

Data da avaliação: _____

Nome: _____ Sexo: M / F

Escala de auto classificação de bem-estar nos últimos 28 dias (paciente deve escolher uma face)



Escala de auto avaliação de bem-estar de hoje (paciente deve escolher uma face)

**CARACTERÍSTICA CLÍNICAS****ATIVIDADE****OUTROS****DETALHES CLÍNICOS**

Fadiga	0 1 2 3 4
Dor de cabeça	0 1 2 3 4
Ulceração oral	0 1 2 3 4
Ulceração genital	0 1 2 3 4
Lesões de pele eritema nodoso	0 1 2 3 4
Tromboflebite	
Superficial	
Pústulas	
Articulações artralgia	0 1 2 3 4
Artrite	
Gastrointestinal náusea ou vômito	0 1 2 3 4
Dor abdominal /	
Diarréia com sangue	

Impressão do profissional sobre a atividade nos últimos 28 dias



Intenção de iniciar ou mudar o tratamento?

Medicações em uso

Alterações na medicação

10.4. Anexo IV

Versão Brasileira do Questionário de Qualidade de Vida -SF-36

1- Em geral você diria que sua saúde é:

Excelente	Muito Boa	Boa	Ruim	Muito Ruim
1	2	3	4	5

2- Comparada há um ano atrás, como você se classificaria sua idade em geral, agora?

Muito Melhor	Um Pouco Melhor	Quase a Mesma	Um Pouco Pior	Muito Pior
1	2	3	4	5

3- Os seguintes itens são sobre atividades que você poderia fazer atualmente durante um dia comum. Devido à sua saúde, você teria dificuldade para fazer estas atividades? Neste caso, quando?

Atividades	Sim, dificulta muito	Sim, dificulta um pouco	Não, não dificulta de modo algum
a) Atividades Rigorosas, que exigem muito esforço, tais como correr, levantar objetos pesados, participar em esportes árduos.	1	2	3
b) Atividades moderadas, tais como mover uma mesa, passar aspirador de pó, jogar bola, varrer a casa.	1	2	3
c) Levantar ou carregar mantimentos	1	2	3
d) Subir vários lances de escada	1	2	3
e) Subir um lance de escada	1	2	3
f) Curvar-se, ajoelhar-se ou dobrar-se	1	2	3
g) Andar mais de 1 quilômetro	1	2	3
h) Andar vários quarteirões	1	2	3
i) Andar um quarteirão	1	2	3
j) Tomar banho ou vestir-se	1	2	3

4- Durante as últimas 4 semanas, você teve algum dos seguintes problemas com seu trabalho ou com alguma atividade regular, como consequência de sua saúde física?

	Sim	Não
a) Você diminui a quantidade de tempo que se dedicava ao seu trabalho ou a outras atividades?	1	2
b) Realizou menos tarefas do que você gostaria?	1	2
c) Esteve limitado no seu tipo de trabalho ou a outras atividades.	1	2
d) Teve dificuldade de fazer seu trabalho ou outras atividades (p. ex. necessitou de um esforço extra).	1	2

5- Durante as últimas 4 semanas, você teve algum dos seguintes problemas com seu trabalho ou outra atividade regular diária, como consequência de algum problema emocional (como se sentir deprimido ou ansioso)?

	Sim	Não
a) Você diminui a quantidade de tempo que se dedicava ao seu trabalho ou a outras atividades?	1	2
b) Realizou menos tarefas do que você gostaria?	1	2
c) Não realizou ou fez qualquer das atividades com tanto cuidado como geralmente faz.	1	2

6- Durante as últimas 4 semanas, de que maneira sua saúde física ou problemas emocionais interferiram nas suas atividades sociais normais, em relação à família, amigos ou em grupo?

De forma nenhuma	Ligeiramente	Moderadamente	Bastante	Extremamente
1	2	3	4	5

7- Quanta dor no corpo você teve durante as últimas 4 semanas?

Nenhuma	Muito leve	Leve	Moderada	Grave	Muito grave
1	2	3	4	5	6

8- Durante as últimas 4 semanas, quanto a dor interferiu com seu trabalho normal (incluindo o trabalho dentro de casa)?

De maneira alguma	Um pouco	Moderadamente	Bastante	Extremamente
1	2	3	4	5

9- Estas questões são sobre como você se sente e como tudo tem acontecido com você durante as últimas 4 semanas. Para cada questão, por favor dê uma resposta que mais se aproxime de maneira como você se sente, em relação às últimas 4 semanas.

	Todo Tempo	A maior parte do tempo	Uma boa parte do tempo	Alguma parte do tempo	Uma pequena parte do tempo	Nunca
a) Quanto tempo você tem se sentindo cheio de vigor, de vontade, de força?	1	2	3	4	5	6
b) Quanto tempo você tem se sentido uma pessoa muito nervosa?	1	2	3	4	5	6
c) Quanto tempo você tem se sentido tão deprimido que nada pode anima-lo?	1	2	3	4	5	6
d) Quanto tempo você tem se sentido calmo ou tranqüilo?	1	2	3	4	5	6
e) Quanto tempo você tem se sentido com muita energia?	1	2	3	4	5	6
f) Quanto tempo você tem se sentido desanimado ou abatido?	1	2	3	4	5	6
g) Quanto tempo você tem se sentido esgotado?	1	2	3	4	5	6
h) Quanto tempo você tem se sentido uma pessoa feliz?	1	2	3	4	5	6
i) Quanto tempo você tem se sentido cansado?	1	2	3	4	5	6

10- Durante as últimas 4 semanas, quanto de seu tempo a sua saúde física ou problemas emocionais interferiram com as suas atividades sociais (como visitar amigos, parentes, etc)?

Todo Tempo	A maior parte do tempo	Alguma parte do tempo	Uma pequena parte do tempo	Nenhuma parte do tempo
1	2	3	4	5

11- O quanto verdadeiro ou falso é cada uma das afirmações para você?

	Definitivamente verdadeiro	A maioria das vezes verdadeiro	Não sei	A maioria das vezes falso	Definitivamente falso
a) Eu costumo obedecer um pouco mais facilmente que as outras pessoas	1	2	3	4	5
b) Eu sou tão saudável quanto qualquer pessoa que eu conheço	1	2	3	4	5
c) Eu acho que a minha saúde vai piorar	1	2	3	4	5
d) Minha saúde é excelente	1	2	3	4	5

Sintoma (ex.: dor de cabeça, dor nas articulações, pseudofoliculite, pele)	Duração (ex.: 1 dia, 2 dias)	Intensidade (forte, fraca, insuportável)	Medicação (aumento da dose já tomada, dipirona, etc)	Data da dor/ alteração