

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

PRISCILLA STELA SANTANA DE OLIVEIRA

**Avaliação de marcadores imunológicos envolvidos no processo
inflamatório em pacientes portadores de psoríase em placas**

Recife

2016

PRISCILLA STELA SANTANA DE OLIVEIRA

**Avaliação de marcadores imunológicos envolvidos no
processo inflamatório em pacientes portadores de psoríase em
placas**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Inovação
Terapêutica da Universidade Federal de
Pernambuco, para a obtenção do Título de
Mestre em Inovação Terapêutica**

Orientadora Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta

Co-orientadora: Profa. Dra. Michelly Cristiny Pereira

Recife

2016

Catálogo na Fonte:

Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Oliveira, Priscilla Stela Santana de

Avaliação de marcadores imunológicos envolvidos no processo inflamatório em pacientes portadores de psoríase em placas / Prsicilla Stela Santana de Oliveira. – Recife: O Autor, 2016.

70 f.: il.

Orientadora: Maira Galdino da Rocha Pitta, Michelly Cristiny Pereira
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Biotecnologias. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, 2016.
Inclui referências

1. Psoríase 2. Pele – Doenças I. Pitta, Maira Galdino da Rocha (orient.) II.
Pereira, Michelly Cristiny III. Título.

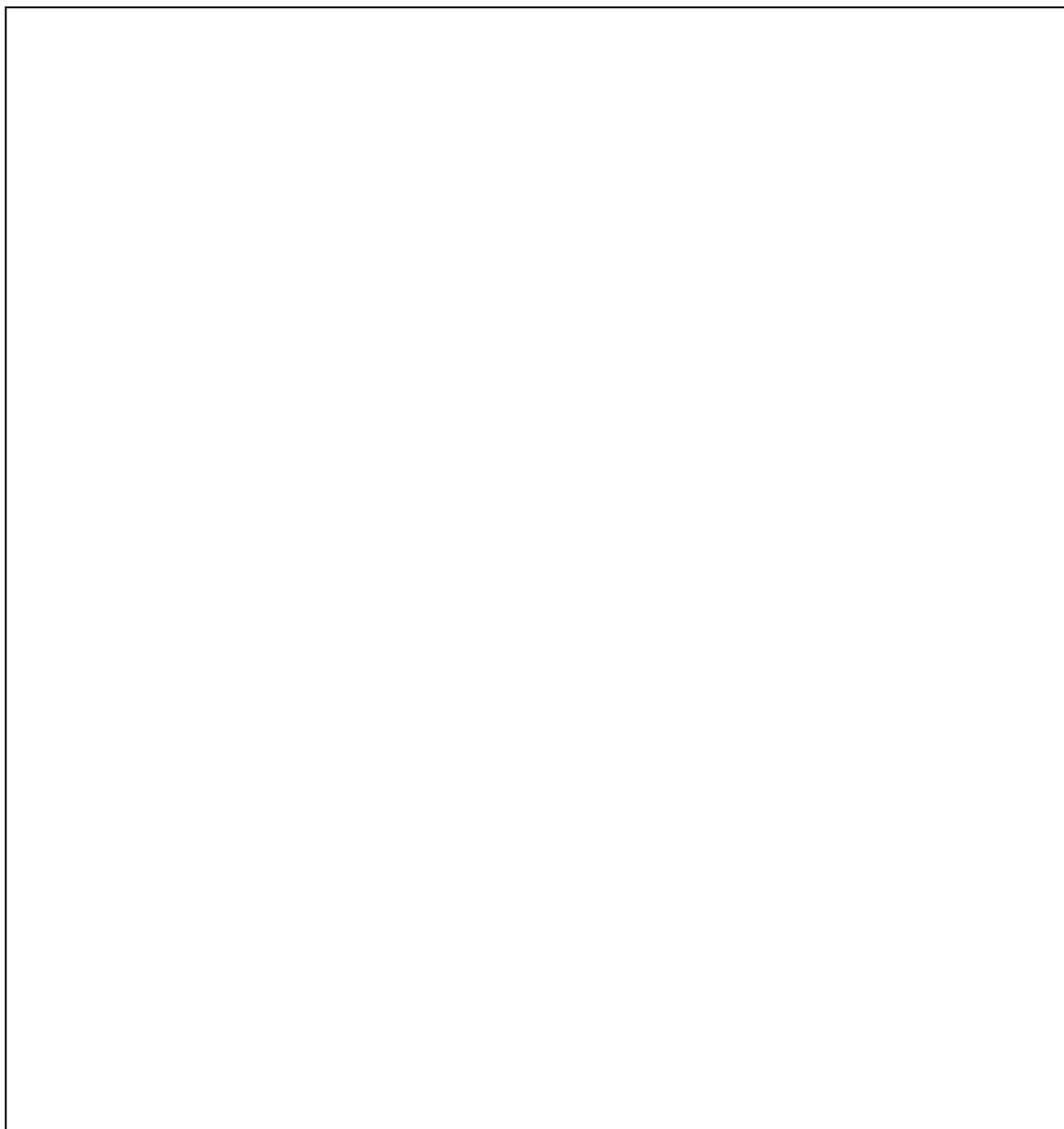
616.969

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-179

Oliveira, P.	Avaliação de marcadores imunológicos envolvidos no processo inflamatório em pacientes portadores de psoríase em placas	2,5 cm espaço reservado para etiqueta de localização	Mestrado PPGITUFPE 2016
--------------	--	--	-------------------------------

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITORA

Profa. Dra. Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETORA DO CENTRO DE BIOCÊNCIAS

Profa. Dra. Maria Eduarda Lacerda e Larrazábal da Silva

VICE- DIRETORA DO CENTRO DE BIOCÊNCIAS

Profa. Dra. Oliane Maria Correia Magalhães

COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta

VICE- COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Prof.Dr. Luiz Alberto Lira Soares

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: OLIVEIRA, Priscilla Stela Santana

Título: Avaliação de marcadores imunológicos envolvidos no processo inflamatório em pacientes portadores de psoríase em placas

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica

Aprovada em: 24 /02/2016

Banca Examinadora

Profa. Dra. Maria Danielly Lima de Oliveira

Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Profa. Dra. Rosângela Ferreira Frade de Araújo Departamento de Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos

Fundação Oswaldo Cruz - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM)

Assinatura: _____

À minha sementinha, Heloísa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** por minha vida, por todas as oportunidades que vieram e hão de vir, por meus dons e minhas fraquezas. Que isto me faça uma pessoa melhor e reflita na minha vida pessoal e profissional.

Á **Maria da Conceição Santana de Oliveira** e **Henrique Antônio de Oliveira**, meus pais, por tudo, e em especial nesta caminhada acadêmica por me conduzirem no caminho do conhecimento, pelo reconhecimento do meu potencial e a força para que me mantivesse perseverante.

Ao meu irmão **Anderson** e a minha madrinha **Fafá** pelos pequenos gestos do dia a dia que contribuíram para que a minha rotina fosse menos desgastante.

Á **Gustavo Henrique da Silva**, pelo maior presente que eu poderia receber, nossa filha, **Heloísa**. Mesmo ainda no meu ventre, ela já participa das minhas jornadas acadêmicas.

À orientadora **Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta**, primeiramente por ter aceitado uma aluna nova, inexperiente, mas com grande vontade de aprender e pesquisar. Sinto orgulho de ter sido a sua primeira aluna de iniciação científica e após esses longos anos posso ver o quanto o seu crédito em minha pessoa possibilitou o meu crescimento pessoal e profissional.

Á **Profa. Dra. Michelly Cristinny Pereira**, co-orientadora mais humana e amiga que eu poderia encontrar. Sem sombras de dúvidas, um espírito iluminado!

Aos **galegos suricates** Pablo, Sayonara, Artur, Marina, Gabriela e Wagner. Nossas afinidades ultrapassam o campo científico!

Aos **amigos do LINAT**, minha casa científica, meus sinceros agradecimentos pelas contribuições nos projetos e pelas risadas que deixam nossa rotina mais leve. De maneira especial, a Simão Kalebe, que contribuiu de maneira concreta para a realização deste trabalho.

Agradeço de coração aos amigos para a vida toda **Jannyson Braz, Caroline Louise, Adryanna Andrade e Camila Borba.**

Agradeço ao **Prof. Dr. Antônio Roberto Lucena de Araújo**, pelas importantes contribuições metodológicas que possibilitaram a execução deste trabalho

A **Paulo Germano**, melhor secretário que um programa de pós-graduação poderia ter!

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível superior, **CAPES**, e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (**INCT_if**)

A todos, Obrigada!

“Não importa quanto a vida possa ser ruim, sempre existe algo que você pode fazer e triunfar. Enquanto há vida, há esperança”

Stephen Hawking

RESUMO

OLIVEIRA, P.S.S. **Avaliação de marcadores imunológicos envolvidos no processo inflamatório em pacientes portadores de psoríase em placas.** 2016. 88p. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

A psoríase é uma doença crônica da pele cuja apresentação clínica predominante, é chamada psoríase em placas ou vulgaris. A imunopatogênese da doença compreende a interação entre queratinócitos, células imunológicas e seus mediadores inflamatórios. As principais moléculas envolvidas nesta interação são as citocinas proinflamatórias, entre as quais, destacam-se as pertencentes as vias Th1 e Th17. Recentemente, outras moléculas têm sido implicadas na doença como a família da IL-1. Dessa forma, decidiu-se avaliar moléculas inflamatórias em amostras de soro e pele de pacientes portadores de psoríase em placas. Para tanto, utilizou-se 88 amostras de soro previamente coletadas de portadores da doença e indivíduos sadios e a retirada de 21 biópsias de pele de pacientes com psoríase. Para dosagem sérica, utilizou-se kits comerciais de detecção imunoenzimáticos das citocinas, de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de pele foram submetidas a extração de RNA e síntese de cDNA. Os transcritos foram quantificados por RT-PCR quantitativa utilizando sondas Taqman®. As citocinas IL-17A, IL-22 e IL-6 encontraram-se significativamente aumentadas no soro dos pacientes do que em controles, mas não houve correlação entre esta elevação e a atividade da doença. Na pele, foram detectados níveis elevados de IL17A, IFNG e FOXP3 em pacientes mais graves. Dentre as quais, IL-17A parece ser a mais influente na severidade da doença. Ademais, foram observadas correlações positivas e significantes entre os transcritos analisados na pele. Este estudo mostrou que moléculas envolvidas na patogênese da psoríase foram detectáveis no soro e na pele e o padrão de expressão pode variar conforme o status clínico de atividade da psoríase.

Palavras-Chave: Psoríase. Inflamação. Citocinas. Gravidade da doença.

ABSTRACT

OLIVEIRA, P.S.S. Evaluation of immunological markers involved in the inflammatory process in patients with plaque psoriasis. 2016. 88p. Masters Dissertation. Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Psoriasis is an inflammatory and chronic skin disease. We named psoriasis plaque-type or vulgaris the predominant clinical presentation. The immunopathogenesis of the disease comprises the interaction of keratinocytes, immune cells and their inflammatory mediators. The key molecules involved in this interaction are the proinflammatory cytokines, among which belonging Th1 and Th17 pathways. Recently, disease implicated other molecules such as IL-1 family. In this direction, we evaluate inflammatory molecules in serum and skin of patients with plaque-type psoriasis. To realize it we used 88 serum samples previously collected from patients and healthy individuals. In addition, we carried out 21 skin punch biopsies from another group of psoriasis patients. It used ELISA commercial kits for cytokine's detection, according to the manufacturer's instructions. The skin samples were subjected to RNA extraction and cDNA synthesis. After that, qRT-PCR analysed transcripts using Taqman® probes. Results showed that sera from psoriasis patients contained increased IL-17A, IL-22 and IL-6 levels than in controls, but did not correlated with disease activity. In the skin, it was detected high levels of IL17A, FOXP3 and IFNG in patients with severe disease. It seems that IL-17A play the central influence in disease severity. Skin samples also showed positive and significant correlations between the transcripts analysed. We detected in both serum and skin samples, molecules involved in the pathogenesis of psoriasis. Notably, the skin transcripts the expression pattern could vary depending on the clinical status of psoriasis activity.

Keywords: Psoriasis. Inflammation. Cytokines. Disease severity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Pág
Figura 01- Marcha psoriática.....	25
Figura 02- Lesões clássicas de psoríase vulgaris	27
Figura 03- Cortes histológicos corados em Hematoxilina-eosina de pele lesionada E não lesionada.....	28
Figura 04- Modelo patogênico da psoríase.....	33
Figura 05- Anticorpo monoclonal específico anti-subunidade p40 comum as citocinas IL-12 e IL-23.....	34
Figura 06- O eixo IL-23/IL-17 na patogênese da psoríase.....	36
Figura 07- Potencial papel da IL-36 na psoríase e em doenças inflamatórias da pele.....	37
Figura 08- Delineamento do estudo.....	39

ILUSTRAÇÃO DO ARTIGO 02

Figure 01- Transcripts levels of IL17A, IFNG and FOXP3 according PASI.....	59
---	-----------

LISTA DE TABELAS

	Pág
Tabela 01- Comorbidades associadas à psoríase.....	25

TABELAS DO ARTIGO 01

Table 01- Clinical features of psoriasis patients and healthy controls.....	47
--	-----------

Table 02- Serum cytokines in psoriasis patients and healthy controls.....	48
--	-----------

TABELAS DO ARTIGO 02

Table 01- Clinical demography of psoriatic patients cohort.....	58
--	-----------

Table 02- Interplay among immunological molecules in human psoriasis lesions.....	60
--	-----------

Table 03- Correlation's coefficients and p values by gender.....	62
---	-----------

Table 04- Association of cytonies levels with disease severity in psoriasis patients.....	63
--	-----------

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

APso:	Artrite psoriática
BSA	Área de superfície corporal do inglês, <i>Body surface área</i>
CARD14	do inglês, <i>caspase recruitment domain-containing protein 14</i>
CB	Centro de Biociências
CCL20	Quimiocina 20 com motivo C-C ligante
CD	<i>Cluster</i> de diferenciação, do inglês, <i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	DNA complementar
CDS	Corneodesmosina
DCs	Células dendríticas, do inglês, <i>dendritic cells</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês, <i>Deoxyribonucleic acid</i>
ELISA	Ensaio imunoenzimático, do inglês, <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Et al	E outros, <i>do latim, Et alii</i>
Fc	Fração constante da imunoglobulina
HC	Hospital das Clínicas
HE	Hematoxilina/ eosina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana, do inglês, <i>human immunodeficiency virus</i>
	<i>Vírus</i>
HLA	Antígeno Leucocitário Humano, do inglês, <i>human leucocitary antigen</i>
IFNγ	Interferão gamma, do inglês, <i>interferon gamma</i>
IgG1	Imunoglobulina G subtipo G1
IL	Interleucina
iNKT	Células exterminadoras naturais invariáveis, do inglês, <i>invariant Natural Killer cells</i>
KC	Queratinócitos, do inglês, <i>keratinocytes</i>
LINAT	Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas
LL37	Peptídeo antimicrobiano relacionado a catalecidina com 37 aminoácidos
LTi	Células indutoras do tecido linfoide
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno, do inglês, <i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
MCP-1:	Proteína quimioatrativa de monócito 1, do inglês, <i>monocyte chemoattractant protein 1</i>
MHC I:	Complexo principal de histocompatibilidade tipo I, do inglês, <i>Major histocompatibility complex type I</i>
MHC II:	Complexo principal de histocompatibilidade tipo II, do inglês, <i>Major histocompatibility complex type I</i>
NF-Kb:	Fator nuclear kappa B

NK:	Células matadoras naturais, do inglês, Natural Killer
NKT:	Natural Killer tipo T
OMS:	Organização mundial da Saúde
p	Significância estatística
PASI:	Índice de severidade e atividade da psoríase, do inglês, <i>Psoriasis area severity index</i>
PBMC:	Células mononucleares do sangue periférico
PCR:	Reação em cadeia polimerase, do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>
pDC:	Células dendríticas plasmocitóides, do inglês, <i>plasmocitoid dendritic cells</i>
PPGIT:	Programa de pós-graduação em Inovação Terapêutica
Pso:	Psoríase
PSOR1:	Locus de susceptibilidade a Psoríase 1
qRT-PCR:	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
RAR:	Receptor nuclear de ácido retinóico
RNA:	Ácido ribonucleico, do inglês, <i>ribonucleic acid</i>
RORyt:	Receptor órfão relacionado aos receptores de ácido retinóico gamma isoforma t, do inglês, <i>RAR-related orphan receptor gamma</i>
RXR:	Receptor de retinóide X, do inglês, <i>retinoid X receptor</i>
STAT1:	Transdutor e ativador de transcrição de sinal 1, do inglês, <i>signal transducer and activator of transcription 1</i>
T CD4:	Linfócito T auxiliar
TCLE:	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF-β:	Fator de crescimento transformante beta, do inglês, <i>transforming growth factor beta</i>
Th:	T auxiliar, do inglês, <i>T-helper</i>
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa, do inglês, <i>tumor necrosis factor</i>
TLR:	Receptor do tipo toll, do inglês, <i>Toll like receptor</i>
UFPE:	Universidade Federal de Pernambuco
UVA:	Ultravioleta tipo A
UVB:	Ultravioleta tipo B

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	21
2.1	Geral	21
2.2	Específicos	21
3	REVISÃO DA LITERATURA	22
3.1	Epidemiologia	22
3.2	Etiologia	23
3.2.1	<i>Fatores genéticos</i>	23
3.2.2	<i>Fatores Ambientais</i>	23
3.3	Comorbidades e qualidade de vida	24
3.4	Diagnóstico e apresentação clínica	26
3.5	Instrumento de avaliação de gravidade	28
3.6	Tratamento	29
3.6.1	<i>Tópico</i>	29
3.6.2	<i>Fototerapia</i>	30
3.6.3	<i>Sistêmico</i>	30
3.6.4	<i>Medicamentos biológicos</i>	31
3.7	Fisiopatogenia	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1	Delineamento do estudo	39
4.2	Comitê de ética	39
4.3	Amostras de soro	40
4.4	Pacientes portadores de psoríase	40
4.5	Avaliação Clínica	40
4.6	Dosagem de citocinas	41
4.7	Biópsias de pele	41
4.8	Extração de RNA	41
4.9	Síntese de cDNA	41
4.10	qRT-PCR	42
4.11	Análise estatística	42
5	RESULTADOS	43

5.1	Artigo 1: <i>IL-17A, IL-22, IL-6 and IL-21 serum levels in plaque-type psoriasis Brazilian patients</i>	43
5.2	Artigo 2: <i>Increased transcripts levels of IL17A,IFNG and FOXP3 in moderate-severe psoriasis: IL17A provides major influence on disease severity</i>	53
6	DISCUSSÃO	70
7	CONCLUSÕES	73
8	PERSPECTIVAS	74
	REFERÊNCIAS	75
	APÊNDICE	83
	APÊNDICE A: Termo de consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	83
	APÊNDICE B: Ficha de avaliação clínica e diferencial da psoríase	86
	ANEXOS	87
	ANEXO A: Parecer do Comitê de ética 1	87
	ANEXO B: Parecer do Comitê de ética 2	88

1 INTRODUÇÃO

A psoríase (Pso) é uma doença inflamatória e crônica da pele, associada à desordem imune e comprometimento sistêmico. A apresentação clínica predominante das lesões psoriáticas é caracterizada pela formação de placas eritematosas descamativas e bem delimitadas devido à hiperproliferação desordenada dos queratinócitos (NESTLE, KAPLAN & BARKER, 2009). Dados epidemiológicos indicam que a prevalência entre homens e mulheres é a mesma e a manifestação inicial ocorre, em geral, por volta das duas primeiras décadas de vida (MARQUES, 2009). Além do comprometimento estético corporal, indivíduos com psoríase podem apresentar doenças como síndrome metabólica, aterosclerose, hipertensão, ansiedade, entre outras. Estes quadros associados promovem grande impacto na qualidade de vida dos portadores (NI & CHIU, 2014).

O tratamento da psoríase é amplo e direcionado conforme a gravidade da doença. As lesões mais brandas e limitadas são tratadas de maneira tópica com corticosteróides e análogos da vitamina D ou algumas modalidades de fototerapia com radiação ultravioleta. Os agentes sistêmicos Metrotrexato, Acitretina e Ciclosporina, quando bem tolerados, são recomendados para doença moderada a severa. Para os indivíduos com doença severa que não respondem ou encaixam na abordagem usual, os medicamentos biológicos bloqueadores do Fator de necrose tumoral α (TNF α) são a primeira escolha. É preconizado, contudo, o acompanhamento rigoroso dos pacientes em virtude de uma maior susceptibilidade a infecções.

De uma maneira geral, a fisiopatologia da psoríase envolve o distúrbio da proliferação exagerada dos queratinócitos epidérmicos em associação a uma resposta imunológica alterada. Nas lesões psoriáticas há um infiltrado de linfócitos T, células de Langerhans e neutrófilos e seus mediadores inflamatórios interagindo de maneira complexa com os queratinócitos hiperplasiados. As principais citocinas envolvidas são TNF α , Interferon gamma (IFN γ) e as Interleucinas 23 e 17 (IL-23 e IL-17, respectivamente) (KRUEGER & BOWCOCK, 2005; KEANEY & KIRSNER, 2010)

Embora algumas citocinas sejam alvo da terapia com medicamentos biológicos existe ainda um percentual significativo de pacientes que ou não respondem ao tratamento ou o medicamento não induz a uma remissão efetiva. Neste último caso, quando a remissão não ocorre, a recidiva da doença é muito mais agressiva (MEASE, 2009; STERRY *et al.*, 2010; AK & KALDEN, 2011).

O sistema imune é, sem sombra de dúvidas, o alvo para o tratamento da psoríase. Contudo, fica clara a necessidade de entender melhor os mecanismos fisiopatológicos da

doença que possui distribuição mundial. Para tanto, inicialmente foi feita uma busca na literatura para a seleção das moléculas associadas/recém-apontadas a patogênese da psoríase. Em seguida, um estudo experimental de biologia molecular foi desenvolvido com o intuito de avaliar a expressão das moléculas selecionadas na literatura com os parâmetros clínicos envolvidos na rotina clínica da doença.

Este trabalho está disposto em uma revisão da literatura atualizada com os principais aspectos relacionados à doença, objetivos, a metodologia desenvolvida, os resultados obtidos dispostos nos artigos publicados “*IL-17A, IL-22, IL-6 and IL-21 serum levels in plaque-type psoriasis Brazilian patients*” e “*Increased transcripts levels of IL17A, IFNG and FOXP3 in moderate- severe psoriasis: IL17A provides major influence on disease severity*”, discussão, conclusão e perspectivas. Por fim os materiais desenvolvidos pela equipe do estudo e por outros está disposta no Apêndice e anexos, respectivamente.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo geral deste estudo é avaliar a expressão de marcadores imunológicos relacionados a patogênese da psoríase em placas e correlacioná-los aos parâmetros clínicos da doença.

2.2 Específicos

- Determinar o perfil clínico dos pacientes portadores de Psoríase em placas atendidos no Ambulatório de Dermatologia/Reumatologia do Hospital das Clínicas de Pernambuco;
- Quantificar as citocinas da via Th17 (IL-17A, IL-22, IL-6 e IL-21) no soro de pacientes portadores de psoríase em placas e correlacionar o perfil de níveis séricos com as manifestações clínicas;
- Quantificar a expressão dos genes IL8, IL33, IL36A, IL17A, RORC, IL22, IFNG, IL10 e FOXP3 em biópsias de pele de pacientes portadores de Psoríase e correlacionar o perfil de expressão gênica com as manifestações clínicas;
- Inter-relacionar as expressões dos genes da via Th1 (IFNG, IL8) com a expressão de genes da via Th17 (IL17, IL22 e RORC), Treg (FOXP3 e IL10) e da família IL-1 (IL33 e IL36A) em biópsias de pele de pacientes portadores de Psoríase.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Epidemiologia

A psoríase (Pso) é uma doença inflamatória crônica da pele, associada à desordem imune e comprometimento sistêmico. A apresentação clínica predominante da lesão é caracterizada pela formação de placas eritematosas descamativas bem delimitadas devido à hiperproliferação desordenada dos queratinócitos. Essa apresentação é conhecida como psoríase vulgaris ou em placas que corresponde a 90% dos casos (GUDJONSSON & ELDER, 2007).

Dados epidemiológicos indicam que a doença é menos comum em crianças do que em adultos cujas taxas de prevalência mostram uma variação a nível geográfico. Isso é justificado por Parisi e colaboradores (2012) pelo fato de que a psoríase é uma doença complexa influenciada por fatores genéticos e ambientais. Estima-se que a prevalência da doença em indivíduos menores de 18 anos sejam 0- 0,71% na Ásia e Europa enquanto que para adultos residentes nos Estados Unidos da América e Reino Unido este valor varie entre 1-3% da população (AUGUSTIN *et al.*, 2010, YANG *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2008, SEMINARA *et al.*, 2011). É importante destacar que a prevalência em indivíduos caucasianos é maior, em torno de 2,5% do que na população de pele mais escura 1,3% (GELFAND *et al.*, 2005).

De acordo com a Sociedade brasileira de dermatologia, são poucos os estudos epidemiológicos da doença no país, mas acredita-se que 1 % da população brasileira seja acometida. Os trabalhos existentes indicam que não há diferença na incidência entre homens e mulheres e o início das primeiras manifestações ocorre, geralmente, entre a segunda e a quinta década de vida (CONSENSO, 2012).

Conforme Brezinski, Dhillon e Armstrong (2015), o gasto econômico com a psoríase é significativo nos Estados Unidos. Em uma revisão sistemática recém-publicada, os autores constataram que o custo anual da doença para o país em 2013 foi de 112 bilhões de dólares levando em consideração os gastos diretos e indiretos dos indivíduos e das operadoras de saúde.

3.2 Etiologia

3.2.1 Fatores Genéticos

As bases genéticas da psoríase vêm sendo estabelecidas através de estudos de associação genômica em diferentes populações, herança em indivíduos gêmeos e a herança familiar correlacionada com antígenos leucocitários humanos.

O primeiro locus associado à susceptibilidade a psoríase foi o PSOR1, localizado no cromossomo 6p21.3 na região do complexo maior de histocompatibilidade do tipo I. De acordo com Nair e colaboradores (2000) ele é responsável por conferir de 35-50% de risco genético para a doença. Dentro desse locus estão outros genes potenciais candidatos ao risco da doença como o antígeno leucocitário Humano (HLA) e os genes envolvidos na formação do extrato córneo da epiderme, do inglês, *A-helix-coiled-rod-homologue* (HCR) e *corneodesmosin* (CDSN). Alelos específicos desses genes como HLA-Cw*0602, HLA-B*57, DRB1*07, HCR*WWCC e CDSN*5 têm sido associados ao desenvolvimento da doença. (ALLEN *et al*, 2005; CLOP, 2013; ATASOY, 2006). A presença dessas variantes está associada especificamente com o tipo I da doença, caracterizada pelo início mais precoce, geralmente antes dos 40 anos, com pico de atividade na segunda década de vida e histórico de doença na família (Quiero, 2013). Outros loci associados a psoríase também denominados de PSOR e numerados sequencialmente de 2 a 9 também já foram identificados (DUFFIN & KRUEGER, 2009).

3.2.2 Fatores Ambientais

Existe forte associação entre o tabagismo e a incidência e prevalência da psoríase. Em uma recente meta-análise, Armstrong e colaboradores (2013) demonstraram que tanto ex-tabagistas quanto fumantes ativos estão mais propensos a desenvolver a doença do que os não-fumantes. O risco aumenta proporcionalmente considerando a quantidade de cigarros e o tempo de tabagismo.

Alguns estudos indicam que a ingestão de bebidas alcoólicas é maior em pacientes com psoríase do que em indivíduos saudáveis. De acordo com Tobin e colaboradores (2009), a prevalência da psoríase em pacientes que abusam de álcool é muito mais elevada do que a 1-3% dos indivíduos em geral, variando segundo a população. No leste europeu, em torno de 80% dos homens investigados em um estudo transversal relataram consumo de álcool antes do início do aparecimento da doença e 22-31% dos indivíduos incluídos em uma análise de coorte no Reino Unido assumiram abuso de bebidas alcoólicas de maneira

frequente somente após o diagnóstico da doença (XHAJA *et al.*, 2012; MACALLER, 2011).

Dessa forma, é difícil determinar se o abuso de álcool está relacionado ao aparecimento da psoríase ou o desencadeamento da doença que induz ao abuso excessivo de bebidas alcoólicas. O que se sabe é que assim como o tabagismo, a ingestão alcoólica induz a níveis elevados de espécies reativas de oxigênio. O fumo, é capaz de promover peroxidação lipídica, oxidar os grupos tióis das proteínas e aumentar os níveis plasmáticos dos grupos carbonila (PARK,1998). Já o álcool atua por meio da depleção de componentes do sistema antioxidante como o α -tocoferol e ácido ascórbico (BARBOSA, 2010). Em pacientes com psoríase, os níveis séricos de malondialdeído e metabólitos do óxido nítrico (ON) está aumentado enquanto que as atividades da superóxido dismutase eritrocitária e Catalase encontram-se diminuídas (KADAM,2010).

A associação de agentes infecciosos, principalmente bactérias, foi descrito por alguns autores como fator importante para desenvolvimento e/ou agravamento da psoríase. Bactérias gram positivas como *Streptococcus pyogenes* e *S. aureus* foram isolados da nasofaringe e de lesões cutâneas, respectivamente. Weisenseel e colaboradores (2002) acreditam ainda que a infecção pelo gênero *Streptococcus* está associada principalmente com o tipo I da doença. Em um caso controle recente, a presença de exotoxinas do *S.aureus* foi detectada em mais de 40% dos soros de pacientes com psoríase e apenas em 6% dos controles reforçando a relação da infecção pelo microorganismo e a doença (ATEFI, 2014). Outros trabalhos citam ainda o envolvimento de *Chlamydomydia psittaci*, *H. pylori* e o vírus do HIV na patogenia da doença (ALI *et al.*, 2008; MAMKINET *et al.*, 2007 e ONSUN *et al.*, 2012).

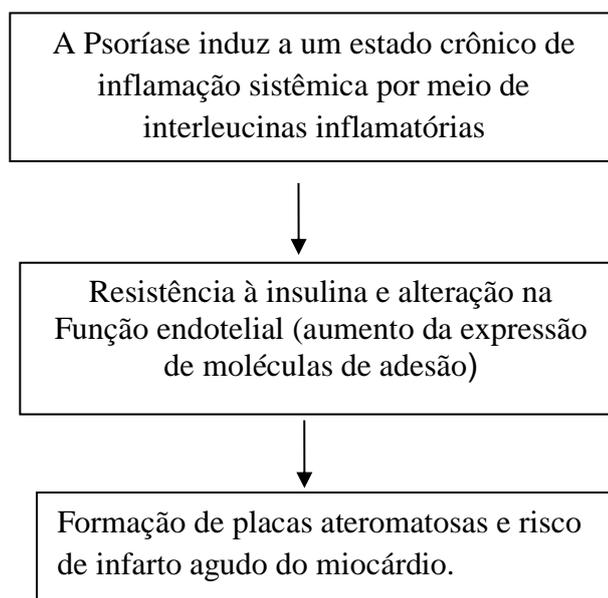
3.3 Comorbidades e qualidade de vida.

A psoríase é uma enfermidade que acomete predominantemente a pele e, em muitos casos, ocorre o aparecimento de comorbidades. Vale salientar que de acordo com Gerdes e colaboradores (2008) essas doenças psoríase-relacionadas contribuem substancialmente com a mortalidade entre os pacientes. **A tabela 1** a seguir, relaciona as doenças que mais estão associadas a psoríase.

Tabela 1: Comorbidades associadas à psoríase

Doença	Referência
Doença Cardiovascular	BAETA <i>et al.</i> ,2014 ; BOENCCKE <i>et al.</i> , 2012;
Doença hepática não gordurosa	GISONDI <i>et al.</i> , 2009
Ansiedade e depressão	KORKOLIAKOU <i>et al.</i> ,2014
Doença inflamatória intestinal	PARK <i>et al.</i> , 2014; FRIEDRICH <i>et al.</i> ,2014
Câncer	STERN & LAIRD, 1994; STERN, 2006
Disfunção sexual	MOLINA-LEYVA <i>et al.</i> ,2014; KURIZKY <i>et al.</i> ,2002
Uveítes	FRAGA <i>et al.</i> , 2012

Já é bem estabelecida a relação entre a psoríase e os fatores de risco para eventos cardiovasculares. A ocorrência de síndrome metabólica, hipertensão, dislipidemia, diabetes *mellitus* tipo 2 e aterosclerose foi associada a psoríase em trabalhos prévios e extensivamente resumida por Baeta e colaboradores (2014). Em um estudo com pacientes em manifestação grave da doença, Mehta (2011) observou que a expectativa de vida para esses indivíduos foi 5 anos mais curta quando diagnosticado algum fator de risco cardiovascular concomitante. Para explicar, então, a ligação entre a doença e os eventos cardiovasculares o conceito de “marcha psoriática” foi proposto por Boehncke e colaboradores (2014) e está descrito de maneira simplificada no fluxograma a seguir:

Figura 1: Conceito da “marcha psoriática” (adaptado de BOEHNCKE *et al.*, 2014.)

A qualidade de vida dos portadores de psoríase também é bastante explorada em diversos estudos. Alguns questionários têm sido utilizados como ferramentas para avaliar o bem-estar do paciente. Estes podem ser categorizados em questionários de medidas genéricas de qualidade de vida, específicos para doenças dermatológicas e específicos para psoríase (BOSHLE, 2006; TAN, 2012.). As ferramentas específicas para psoríase serão descritas no tópico de instrumentos de avaliação da gravidade da doença.

Os portadores apresentam dificuldade psicossocial devido às peculiaridades da doença e, por conseguinte, as atividades rotineiras, pessoais e profissionais são afetadas (MINGNORANCE, 2002). A percepção da qualidade de vida pode ser ainda mais complexa já que a adaptação e a busca por apoio psicológico demandam impactos diferentes entre os gêneros. A aceitação da doença é maior em homens enquanto que a busca por suporte social para diminuição da depressão e ansiedade é mais elevada em mulheres (JANOWSKI, 2012).

3.4 Diagnóstico e apresentação clínica

O diagnóstico da psoríase deve ser feito pelo profissional médico dermatologista através do exame clínico e o histórico médico. A inspeção visual das lesões de pele, couro cabeludo, unhas e articulações, em geral, são suficientes para o diagnóstico. Em casos mais raros, a biópsia da pele e o exame histopatológico são solicitados (RAHMAN, 2010; KIM, 2015). A dosagem do Fator Reumatóide (FR) sérico e radiografia das articulações também são solicitadas em casos de dúvida com a Artrite Psoriática (MEFFERT *et al.*, 2015). As lesões ditas clássicas são caracterizadas por placas eritematosas descamativas, bem delimitadas, bordas elevadas e de distribuição variadas pelo corpo (**figura 2**). Esse tipo de lesão é o mais comum e característico da psoríase vulgaris ou em placas que corresponde a quase totalidade dos acometimentos (GRIFFITHS e BARKER, 2007). Conforme Raychaudhuri e colaboradores (2014), as lesões podem ser classificadas levando em consideração a morfologia, o sítio anatômico e o estágio de desenvolvimento.

Figura 2: Lesões típicas da Psoríase vulgaris ou em placas. À esquerda, lesões variadas de psoríase vulgaris com caráter inflamatório. À direita, pequena lesão psoriática em aumento com descamação aparente (Adaptado de ULRICH, 2009 e BHARAT, 2014)

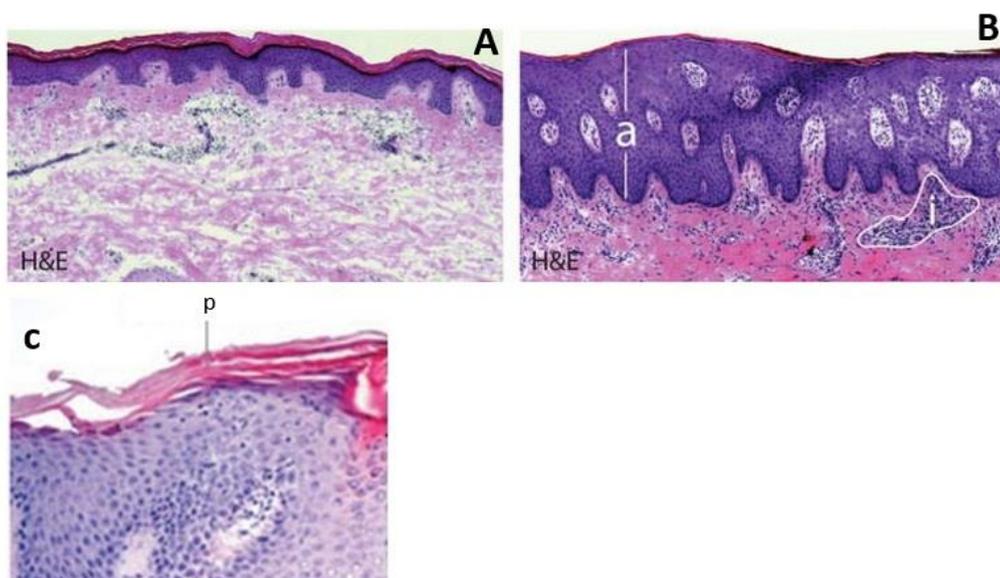


Segundo a Organização mundial da Saúde (OMS), por meio da Classificação Internacional de Doenças e Problemas relacionados à Saúde, a Psoríase é classificada em formas:

1. Vulgar: lesões de tamanhos variados, delimitadas e avermelhadas, com escamas secas, aderentes, prateadas ou acinzentadas que surgem no couro cabeludo, joelhos e cotovelos;
2. Pustulosa ou Generalizada: as lesões apresentam pus nos pés, nas mãos ou espalhadas pelo corpo;
3. Pustulosa palmar e plantar: as lesões aparecem como fissuras nas palmas das mãos e solas dos pés;
4. Gutata: lesões puntiformes, em forma de gotas, geralmente, em indivíduos mais jovens.
5. Atrofia psoriásica: Ocorre comprometimento articular. Há dor nas pontas dos dedos das mãos e dos pés ou nas grandes articulações
6. Invertida – lesões umedecidas, em áreas de dobras como couro cabeludo, joelhos e cotovelos;
7. Eritrodérmica – lesões generalizadas em quase toda a extensão do corpo;
8. Ungueal – depressões puntiformes ou manchas amareladas principalmente nas unhas das mãos;
9. Outras formas não específicas.

As lesões psoriáticas são caracterizadas por três principais aspectos histológicos (**Figura 3**): acantose que consiste no aumento da espessura da camada espinhosa (**figura 3B (a)**), a paraqueratose, queratinização anormal do epitélio escamoso (**figura 3C (p)**) e o infiltrado celular composto principalmente por células T e células dendríticas (**figura 3B (i)**).

Figura 3: Cortes histológicos corados em Hematoxilina e eosina (HE) comparando a pele não-lesional (A) e pele psoriática (B). Em (a) verifica-se acantose intensa e em (i) infiltrado celular marcante (Adaptado de NOGRALES *et al.*, 2010)



3.5 Instrumentos de avaliação de gravidade

Os instrumentos de avaliação de gravidade psoríase-específicos mensuram através de critérios objetivos a extensão da gravidade da doença na pele, mas não captam o impacto da doença na vida dos pacientes. Os métodos mais utilizados nos desfechos primários em ensaios clínicos e na rotina ambulatorial são: Índice de Gravidade de Área da Psoríase (PASI), do inglês “*Psoriasis Area and Severity Index*” e a avaliação da superfície corporal (BSA), do inglês “*body surface area*” (TAN *et al.*, 2012).

O PASI foi um método desenvolvido em 1978, por Fredricksson e Pettersson que procuravam quantificar a gravidade da doença enquanto realizavam os primeiros estudos clínicos com o ácido betulínico (FREDRICKSSON e PETTERSSON, 1978). Este índice avalia as quatro regiões do corpo: cabeça, tronco, membros superiores e membros inferiores, em relação a quatro aspectos: eritema, inflamação ou descamação das placas e superfície da área corporal acometida. Para cada um destes aspectos, existe uma pontuação de 0 a 4 que significa desde ausência do item (pontuação 0) á item presente

muito grave (pontuação 4). A soma obtida das alterações (eritema + infiltração + descamação), para cada seguimento corporal (cabeça, tronco e os membros inferior e superior) é multiplicada pela área comprometida naquele seguimento. O produto da equação é multiplicado por uma constante inerente a proporcionalidade da área de cada seguimento que ao final é somado. O PASI pode variar de 0 a 72 e de acordo com o intervalo de pontuações, estratifica a doença em leve, moderada e grave. O BSA é outro método bastante utilizado o qual leva em consideração apenas a área corporal comprometida da psoríase em placas. Nesta avaliação a palma da mão do paciente, com os dedos unidos, correspondente a 1% da superfície corporal total (COSTA DE FARIA, 2010; CONSENSO, 2012).

Nenhum dos escores de gravidade utilizados para a psoríase atende a todos os critérios de validação necessários para uma pontuação ideal. No entanto, pode-se concluir que a pontuação PASI é o escore de gravidade mais extensivamente estudado e bem validado de acordo com critérios de validação de metodologia (PUZENAT, 2010).

3.6 Tratamento

Atualmente, várias abordagens terapêuticas estão disponíveis para psoríase e serão descritas de acordo com o tipo de tratamento, se é tópico ou sistêmico, para apresentações leve, moderada e grave da doença.

3.6.1 Tópico

Corticosteróides e análogos da vitamina D, de forma combinada ou isolada, têm sido utilizados em lesões de joelhos, cotovelos, região lombar e de couro cabeludo nas formas mais leves da Psoríase (MASON *et al.*, 2012). Os corticosteróides apresentam propriedades antiinflamatória e imunossupressora e os análogos da vitamina D promovem estímulo à diferenciação dos queratinócitos, inibição da proliferação epidérmica e a modificação da resposta imune pela ligação aos receptores da vitamina D. A combinação de calcipotriol e o dipropionato de betametasona é a opção de primeira escolha para o tratamento tópico da psoríase (GURGEL *et al.*, 2005; LAMBA *et al.*, 2001 e DAUDÉN *et al.*, 2014). Também tem sido relatada a intervenção terapêutica com agentes queratolíticos (uréia, alfa e poli hidróxiácido, ácido salicílico e lactado de amônia) pois apresentam efeitos queratolítico, hidratante e higroscópico bem como agentes emolientes por permitirem que o estrato córneo possa re-hidratarse a partir da formação de um filme

na epiderme que impede a evaporação de água das camadas mais profundas da pele (JACOBI *et al.*,2015).

3.6.2 Fototerapia

A fototerapia com irradiação ultravioleta B (UVB) ou A (UVA) é uma alternativa para o tratamento de lesões leves a moderadas. A radiação age inibindo a interação entre as células de Langerhans e os linfócitos T CD4⁺, indução a apoptose dos linfócitos T e promove danos ao DNA e ao ciclo celular. Dessa forma, inibe a hiperqueratose epidérmica e a inflamação cutânea (Stan *et al.*,2005).As modalidades de Fototerapia utilizadas na psoríase incluem Fototerapia com UVB de banda estreita 311-312 nm, fotoquimioterapia com psoralênicos (compostos químicos furocumarínicos cromóforos) e radiação UVA, fotoquimioterapia com psoralênicos e radiação UVA de imersão ou sistêmica e radiação UVB 308 nm. (GERBER *et al.*, 2003; HE *et al.*, 2007 e CONSENSO, 2012).

3.6.3 Sistêmico

A abordagem terapêutica de primeira linha para lesões moderadas-grave é feita com drogas sistêmicas. De preferência o Metotrexato, o Acitretin e a Ciclosporina.

O metotrexato (Metrexato®, Biometrox®, Metrotex®) é estruturalmente análogo ao ácido fólico e, portanto, inibe de maneira competitiva a atividade da diidrofolato-reductase. Foi inicialmente utilizado na psoríase por ter ação marcante em células que estão em constante proliferação, conseqüentemente nos queratinócitos. Possui efeito imunomodulador e antiinflamatório em outras células como as polimorfonucleares e as células de langerhans diminuindo a quimiotaxia e a produção de citocinas. Pode ser administrado por via parenteral ou oral e é indicado principalmente para as formas eritrodérmica, pustular, palmoplantar, psoríase em placas grave ou incapacitante e em casos com má resposta à fototerapia e/ou tratamento com retinóides (GLADYS, AIRES & MARTINS, 2004).

A acitretina (Neotigason®) é um retinóide monoaromático de segunda geração sendo metabólito ativo do seu precursor o etretinato. Não é considerada uma droga citotóxica ou imunossupressora, mas age inibindo a proliferação dos queratinócitos. A acitretina se liga ao receptor nuclear de ácido retinóico (RAR) e ao receptor de retinóide X (RXR) e promove ativação dos três subtipos (α , β e γ) os quais modulam a transcrição

de genes que codificam várias proteínas envolvidas na patogênese da psoríase. É administrado por via oral (CARRETERO, 2013).

A ciclosporina (Ciclosporin®) é um polipeptídeo neutro cíclico e lipofílico, composto por 11 aminoácidos e 1203 kDa (KURILIĆ *et al.*, 2010). Isolado inicialmente do fungo *Tolyocladium inflatum Gams* possui efeito inibitório em linfócitos T, suprimindo a resposta a apresentação de antígenos. Uma vez dentro da célula, a ciclosporina se liga a um receptor citoplasmático, a ciclofilina, e o complexo formado pela ciclosporina-ciclofilina se liga a outra enzima citoplasmática, a calcineurina fosfatase. Um dos substratos da calcineurina fosfatase é o fator nuclear de ativação de linfócitos, responsável pela transcrição gênica de citocinas como IL-2, IFN γ , TNF α e outras. Dessa forma, a ciclosporina age de maneira competitiva. (BERTH-JONES, 2004).

Alternativas aos tratamentos descritos anteriormente são os medicamentos Micofenolato mofetilo, 6-Tioguanina, hidroxiuréia, Sulfazalazina e a Leflunomida. Recentemente, alguns novos medicamentos orais têm demonstrado eficácia em ensaios clínicos e serão usados mais incisivamente na rotina ambulatorial para pacientes com lesões moderadas a grave como é o caso Apremilast (aprovado nos EUA tanto para psoríase quanto artrite psoriática) e o tofacitinibe (aprovado nos EUA para a artrite reumatóide) (KELLY *et al.*, 2015).

Apesar da comprovada eficácia dos medicamentos sistêmicos, a elevada toxicidade a curto e longo prazo é fator determinante para a limitação dessa abordagem terapêutica. O Metrotrexato, em curto prazo, pode induzir a uma pancitopenia grave por ser anti-metabólico e apresentar perfil mielotóxico. Já os efeitos adversos em longo prazo são os mais preocupantes, pois induzem a fibrose e a cirrose hepática. O acompanhamento do paciente deve ser feito rigorosamente através de exames periódicos principalmente para avaliação da função hepática (AITHAL, 2004; YÉLAMOS, 2014 e WEIDMANN, 2014)

Os efeitos colaterais da acitretina e da ciclosporina são menos proeminentes que o do metrotrexato e incluem desde alopecia e ressecamento dos olhos a osteoporose e mais raramente insuficiência renal e hepática (MCMULLEN, 2003; FELDMAN, 2000)

3.6.4 Medicamentos biológicos

Nas últimas décadas o desenvolvimento de agentes biológicos revolucionou o tratamento das doenças auto-imunes. A descoberta do envolvimento da citocina

proinflamatória, Fator de necrose tumoral alfa (TNF α), na artrite reumatóide, artrite psoriática, psoríase, espondilite anquilosante, doença de Chron, uveíte e colite ulcerativa contribuiu para o fortalecimento da terapia alvo-direcionada. (VALESINI, 2007; SARACENO, MANNHEIMER & CHIMENTI, 2008). Vários estudos sobre a expressão do TNF α revelaram níveis elevados dessa citocina em placas de pacientes portadores de psoríase (GOMI, 1991; MUSSI, 1997 E COELHO, 2012) e a terapia com os anticorpos monoclonais bloqueadores do TNF α foi introduzida para lesões moderadas a grave e de grande extensão sem contraindicação. O Infliximabe (Remicade®) e o adalimumabe (Humira®) são anticorpos monoclonais anti-TNF do tipo quimérico e humanizado, respectivamente. Outro biológico anti-TNF é o Etanercept (Enbrel®), uma proteína de fusão humanizada, que consiste em uma porção extracelular do receptor do TNF- α , ligada à porção Fc de uma IgG1 (KOLLIAS, 2010).

Outro inibidor de citocina, o Ustekinumabe (Stelara®) foi aprovado para o uso na psoríase em placas mais recentemente. Ele se liga a subunidade p40, comum a IL-12 e IL-23, citocinas que têm importante papel na ligação da resposta imunológica inata com a adaptativa e na ativação de subtipos celulares de linfócitos auxiliares (Th1 e Th17) envolvidos na patogênese da doença (CROXTALL, 2011)

Novos agentes bloqueadores da citocina IL-17, Secukinumabe, Ixekimumabe e Brodalimumabe estão sendo avaliados em estudos clínicos randomizados de fase I, II e III com resultados promissores para Artrite psoriática e Artrite Reumatóide. Esta citocina está presente na fisiopatologia de várias doenças autoimunes e dentre elas, a psoríase (ZAHAVA, 2014).

Apesar da comprovada eficácia, a terapia com os bloqueadores de TNF possui muitos efeitos adversos além de ser uma abordagem de custo elevado. É relatado o aumento a susceptibilidade a infecções agudas e crônicas, reativação de tuberculose latente, linfomas e indivíduos não respondedores a terapia (MEASE, 2009; KAVANAUGH *ET AL.*, 2001 E ANTONI & BRAUN, 2002).

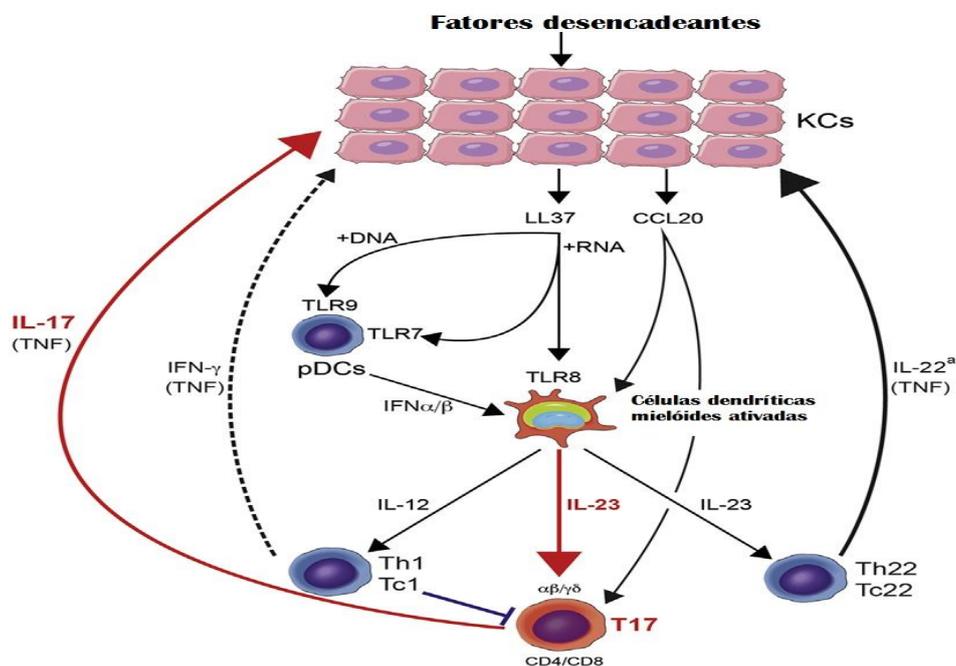
3.7 Fisiopatogenia

Do ponto de vista imunopatológico, a literatura descreve a psoríase como resultado da interação entre os queratinócitos, vários tipos celulares e seus mediadores inflamatórios. Dentre os subtipos celulares destacam-se as células de Langerhans (subtipo de células dendríticas imaturas da epiderme), células dendríticas mielóides, *Natural*

killers (NK), Natural killers Tipo T (NKT), macrófagos, neutrófilos, Linfócitos T CD4⁺ (Th1 e Th17) e os queratinócitos (KIM & KRUEGER, 2012).

Ainda de acordo como descrito pelos autores supracitados, quando fatores desencadeantes causar injúria na pele, os queratinócitos (KCs) ativam as células dendríticas mielóides (DCs) com receptores Toll-like (TLRs), o peptídeo antimicrobiano LL37, e as células dendríticas plasmocitóides (pDCs). Os KCs também produzem CCL20, que atrai células dendríticas mielóides e linfócitos T17. As células dendríticas mielóides estimulam as células T a produzir IL-17 (T17), IFN- γ (Th1, Tc1), e IL-22 (Th22, TC22). As citocinas liberadas por essas células estimulam ainda mais os KCs e o circuito imunitário é amplificado pelo feedback produzido pelos KC.

Figura 4: Modelo patogênico da psoríase (Adaptado de Kim e Krueger,2012).

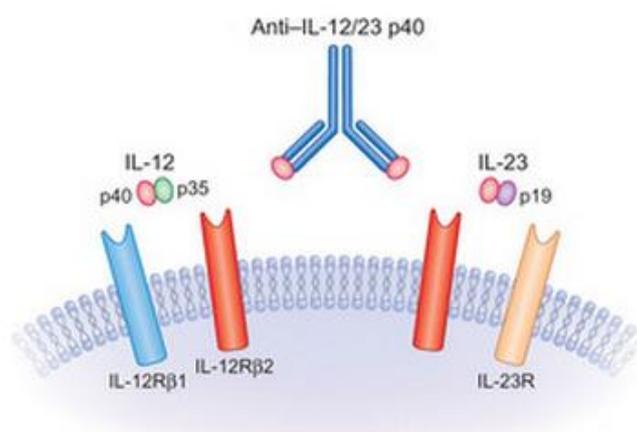


Por muito tempo, o modelo patogênico dominante na psoríase foi protagonizado pelas células e citocinas da via Th1. Nesta abordagem os linfócitos T, por meio da citocina IFN γ promoveriam a mediação central da inflamação. Segundo este modelo as células de Langerhans ou dendríticas maduras, atuariam por meio de uma apresentação de antígenos e secreção das citocinas IL-12 e IL-23. A secreção dessas citocinas, ativaria os linfócitos TCD4⁺ tipo 1 (Th1) os quais seriam os responsáveis por produzir IFN γ e o TNF α . Na epiderme, muitas células são sensíveis ao IFN γ , inclusive os queratinócitos, que ao serem sensibilizados promoveriam uma cascata de eventos genômicos por meio do transdutor

de sinal e ativação de transcrição tipo 1 (STAT1). Como consequência primária e secundária da ativação, produtos transcritos relacionados a processos de inflamação são produzidos como adesão e tráfico de células (integrinas, moléculas de adesão e quimiocinas), ativação de células T (CD25, CD4, MHC I e II), ativação e diferenciação de células dendríticas (síntese de receptores de citocinas, subunidades ativadoras de proteassoma) e vasodilatação (síntese de Óxido Nítrico induzido iNOS) (LEW, BOWCOCK E KRUEGER, 2004).

A citocina IL-23, secretada pelas células dendríticas, é um heterodímero formado pela junção das subunidades p19 e p40, esta última compartilhada com a IL-12 (Figura 5). Estudos de biologia molecular identificaram que as subunidades p19 e p40 estão muito mais expressas na pele de lesões psoriáticas e na cultura *in vitro* de queratinócitos do que a subunidade p35 que é exclusiva da citocina IL-12. Esse indício apontou para o fato de que a IL-23 teria um papel mais importante na patogênese da doença que a IL-12 (LEE *et al.*, 2004; PISKIN *et al.*, 2006). Estudos posteriores então começaram a investigar a implicação de outras citocinas e vias na patogênese da doença já que a IL-23 é capaz de induzir os queratinócitos e os linfócitos T a produzirem outros tipos celulares e citocinas (PARHAM *et al.*, 2002; CHAN *et al.*, 2006).

Figura 5: Anticorpo monoclonal específico para a subunidade p40 comum as citocinas IL-12 e IL-23. A subunidade $\beta 2$ do receptor de IL-12R é compartilhado pelas duas citocinas (adaptado de STEINMAN,2010)



A IL-23 está associada a diferenciação e manutenção das células Th17, uma subpopulação linfócitos T CD4+ associada à resposta contra patógenos e principalmente a distúrbios inflamatórios autoimunes. Este subtipo celular tem como fator de transcrição

o receptor órfão relacionado a retinóide *gamma* isoforma t (ROR γ t) cujo gene codificador é o RORC, do inglês, *RAR-related orphan receptor C*. Estas células são induzidas a partir de células T indiferenciadas por IL-6 e TGF- β . As principais citocinas produzidas por elas são IL-17A e suas isoformas e IL-22 (ANNUZIATO *et al.*, 2007 e CROME *et al.*, 2010). Além do sistema imune adaptativo, células da resposta imunológica inata também podem produzir IL-17. São elas: natural killers (NK), natural killers invariáveis (iNKT), células indutoras de tecido linfóide (LTi), células mielóides e principalmente células *gamma-delta* ($\gamma\delta$) (CUA *et al.*, 2010).

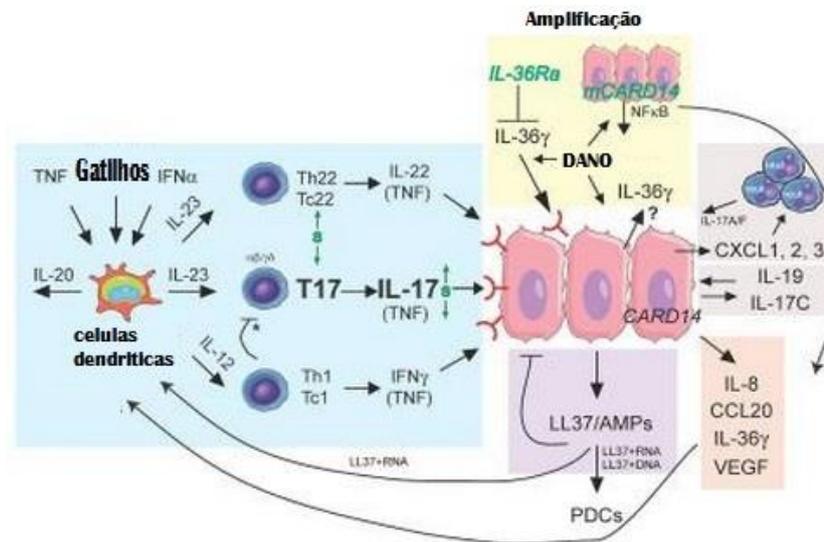
As expressões protéicas de IL-17A, IL-17C, e IL-17F estão aumentadas nas lesões psoriáticas quando comparadas a tecidos não lesionais (HARPER *et al.*, 2009; JOHANSEN *et al.*, 2009; RUSSELL *et al.*, 2011). Uma revisão robusta feita por Martin e colaboradores (2013) deixa claro que por meio de estudos genômicos de larga escala, técnicas de biologia molecular em biópsias de pacientes, culturas *in vitro* e modelos animais existem evidências mais que suficientes da participação da IL-17 na patogênese da doença.

Para manter o balanço entre a resposta a patógenos e a tolerância a antígenos do próprio organismo, o sistema imunológico lança mão de alguns mecanismos. Entre eles, destaca-se o controle periférico exercido por um subtipo de células chamadas de linfócitos T regulatórios (T regs). Estas células têm como principais funções: a secreção de citocinas inibitórias da resposta imune, IL-10 e TGF β , a liberação de fatores citotóxicos que induzem a apoptose de linfócitos auto-reativos e a modulação da apresentação de antígenos por parte das células dendríticas. Dessa forma, as células T regs são capazes de inibir células do sistema inato e adaptativo exercendo controle sobre a resposta imunológica. Seus principais marcadores são CD4⁺CD25⁺ e o fator de transcrição FOXP3. (CRUVINEL *et al.*, 2008 e SAKAGUCHI *et al.*, 2010). De acordo com ensaios de imunofenotipagem, pacientes com psoríase possuem deficiência na quantidade de células Treg funcionais (SOLER *et al.*, 2013)

De forma resumida, o modelo atual da psoríase está representado na figura 6. Nele, células dendríticas mielóides residentes da pele são ativadas por “gatilhos” imunológicos e dentre eles estão o IFN γ e o TNF α . Isto induz a produção de IL-23 e IL-12 pelas células dendríticas. A IL-12 induz a diferenciação das células da via Th1 a produzirem IFN γ assim como a IL-23 induz células da via Th17 e células Alfa-beta ($\alpha\beta$), *gamma-delta* ($\gamma\delta$) a produzirem IL-17 e a via Th22 a produzir IL-22. O IFN γ , IL-17 e IL-22 promovem uma resposta na epiderme que inclui hiperplasia e a produção de outras quimiocinas e citocinas. Dentre elas destacam-se IL-8, IL-36, CXCL1, 2 e 3 que promovem a

quimiotaxia de neutrófilos, CCL20 que atrai novas Células dendríticas e células Th17, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) promovendo angiogênese e o peptídeo antimicrobiano, LL37 reativa as células dendríticas.

Figura 6: O eixo IL-23/IL-17 na patogênese da psoríase (Adaptado de LOWES et al., 2013)



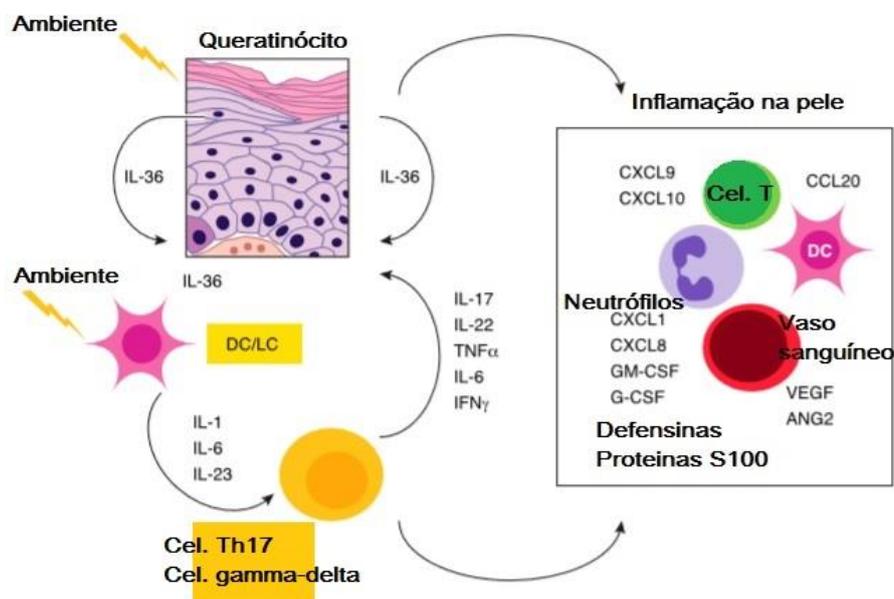
Estudos mais recentes vêm incorporando outras citocinas ao modelo patogênico da doença. Dentre elas, destaca-se alguns membros da família de citocinas da IL-1, composta até o momento, por 11 elementos. Inicialmente, acreditava-se que por serem sintetizadas por células da imunidade inata, suas funções biológicas se restringiriam a esse grupo. Contudo, atualmente, a família IL-1 é descrita como um amplificador geral das respostas dos linfócitos T (SIMS & SMITH, 2010).

A IL-36 é membro da família da IL-1 e possui três isoformas distintas IL-36 α , IL-36 β e IL-36 γ , previamente descritos como IL-1F6, IL-1F8 e IL-1F9. Além destas, existe uma outra molécula, a IL-36Ra (IL-1F5), que se liga ao mesmo receptor das demais (IL-36R ou IL-1RL2), porém com função antagonista (TOWNE & GABAY, 2015). O receptor IL-36R é expresso principalmente na pele em queratinócitos, células epiteliais e dendríticas. Nesta última, a IL-36 possui potentes efeitos imunomoduladores, indicando um potencial papel entre as desordens imunidade inata e adaptativa (VIGNE, 2011).

Linhas de estudo têm evidenciado a participação da IL-36 na psoríase. Em modelos animais a expressão da IL-36 α e não de outros membros da família IL-1, induziu lesões histológicas similares a lesões de placas em humanos (GOTTLIEB *et al.*, 2005). Adicionalmente, foi descrito que o modelo murino de dermatite psoriasiforme é dependente da interação entre células dendríticas e queratinócitos por meio da produção

de IL-36 (TORTOLA *et al.*, 2012). Em humanos, análises proteicas revelaram níveis elevados das isoformas de IL-36, R e Ra em lesões psoriáticas (BLUMBERG *et al.*, 2007;2013). Mutações no gene IL-36RN, que codifica a molécula antagonista IL-36Ra, tem sido associada a casos de psoríase pustular severa, GPP, do inglês, *Generate pustular psoriasis*. Esta condição é caracterizada por episódios de pustulação nas lesões, eritema, febres resptinas, acompanhadas ou não de distúrbios circulatórios/respiratórios e reações sistêmicas de inflamação como neutrofilia (MARRAKECHI *et al.*,2011 e ONOUFRIADIS *et al.*, 2011).

Figura 7: Potencial papel de IL-36 na psoríase e em doenças inflamatórias da pele. Os fatores ambientais podem estimular a liberação de IL-36 por queratinócitos e/ou células dendríticas (DCs) ou Langerhans (CL). Nestas células, a IL-36 as estimula de forma autócrina e parácrina. Células Dendríticas e Langerhans produzem IL-1, IL-6, e IL-23 as quais estimulam respostas Th17 e produção de IL-17 por células T gamma-delta dérmica, levando a um circuito inflamatório com os queratinócitos. A produção de quimiocinas e citocinas inflamatórias conduz a manifestações patológicas típicas da psoríase, incluindo o recrutamento de neutrófilos, mais células dendríticas e linfócitos T e a proliferação dos queratinócitos. Os fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF) e angiopoietina 2 (ANG2) promovem a vasodilatação e neovascularização que permite o fluxo de células para o local.



Outra citocina da família da IL-1 que é pertinentemente abordada nos estudos mais recentes é a IL-33. Também conhecida como IL-1F11, é produzida em sua forma precursora e clivada pela caspase-1. Se liga ao receptor órfão da IL-1 ST2 e ativa intrinsecamente a via do NF- κ B e proteínas quinases (SCHIMITZ, 2005). Identificada originalmente como potente indutor de respostas inflamatórias Th2, tem sido estudada em doenças Th1/Th17 mediadas como artrite reumatoide (AR) (PALMER *et al.*, 2009 e MATSUYAMA, 2012). Assim com a AR, a psoríase também exibe o perfil inflamatório Th1/Th17. Injeções de IL-33 em orelhas de camundongos têm sido eficientes na indução de modelos de inflamação cutânea, além do que animais transgênicos deficientes na expressão do receptor ST2 tem a inflamação reduzida (HUEBER *et al.*, 2011). Em ensaios *in vitro*, a IL-33 foi capaz de ativar queratinócitos e mastócitos após estímulo de TNF- α bem como níveis elevados da proteína foram encontrados em lesões psoriáticas quando comparadas a controles sadios (BALATO *et al.*, 2012).

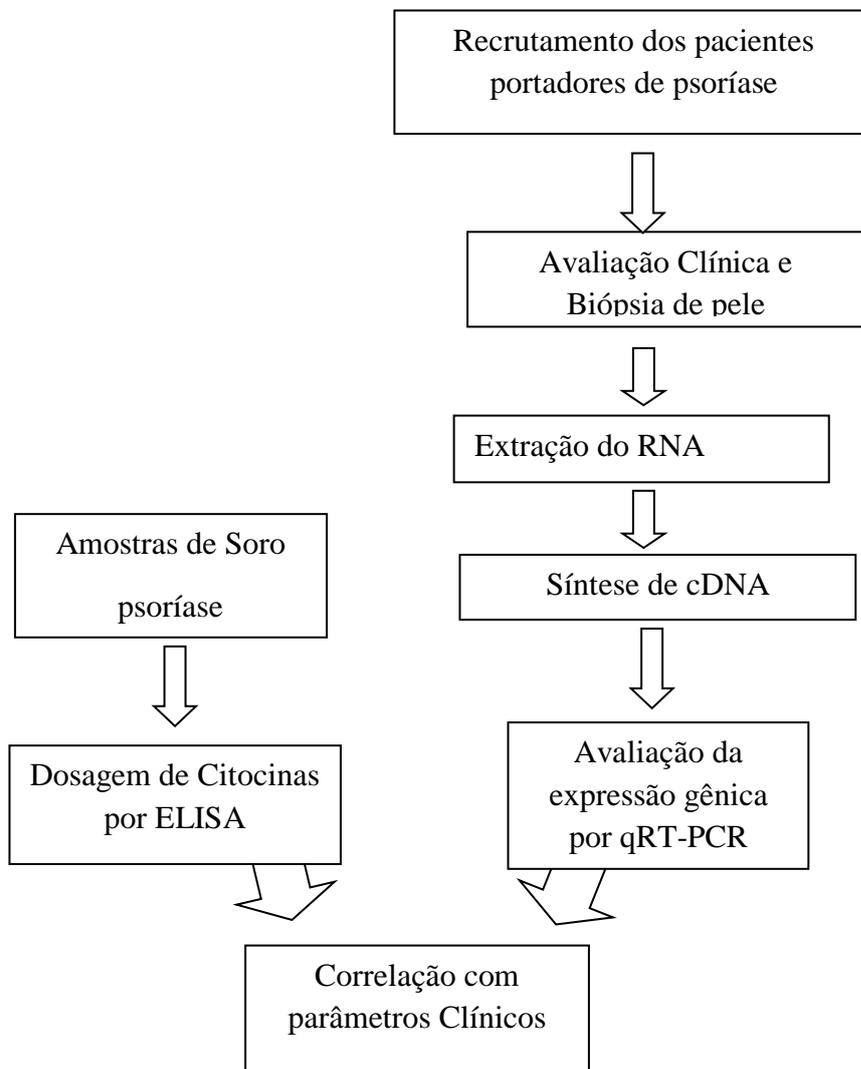
Segundo Villanova e colaboradores (2013), apesar do avanço no entendimento da fisiopatogenia da psoríase, não existem ainda marcadores específicos que podem prever com precisão a progressão da doença e a resposta as abordagens terapêuticas. Apesar de muitos esforços terem sido feitos para identificar biomarcadores na pso e Apso, nenhum deles foi direcionado para a rotina clínica. É necessário reconhecer que a terapia biológica tem demonstrado eficácia, porém a segurança a longo prazo de muitos agentes ainda está sendo estabelecida.

A academia Americana de diretrizes e cuidados em dermatologia psoriática publicou recentemente um trabalho, em seis seções, que aponta as principais incertezas sobre a doença nas últimas duas décadas. Foram identificadas diversas lacunas, mas o descompasso entre a pesquisa básica e a investigação clínica é apontada como a principal contribuição para o déficit de entendimento em algumas questões da doença. No relatório, são sugeridos alguns delineamentos de estudos a serem realizados e dentro deste espectro de ensaios, destaca-se aqueles cujo objetivo é a identificação de biomarcadores de gravidade da doença (RYAN *et al.*, 2014).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

Figura 8: Delineamento do estudo.



4.2 Comitê de ética

Os protocolos dos ensaios foram aprovados pelo COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS (CEP-CCS 528/11 e CAAE: 30748614.7.0000.5208, parecer 723.390) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, localizado no 3º andar, Sala Prof. Rui João Marques. Página da Internet: www.ufpe.br/ccs. O endereço eletrônico é cepccs@ufpe.br; fone: (81)2126-8588; Presidente: Prof. Dr. Geraldo Bosco.

4.3 Amostras de Soro

As amostras de Soro de 53 pacientes com psoríase foram obtidas no período de 2012-2014 após coleta de 10-12 mL de sangue periférico em tubo sem anticoagulante. Em laboratório, as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos para formação do coágulo. O soro foi coletado em alíquotas e estocado a -80°C. Todos os pacientes que aceitaram doar o sangue periférico para a coleta do soro assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. Todos os pacientes atendiam aos critérios de Inclusão descritos a seguir. Para realização de ensaios comparativos, amostras de soro de 35 indivíduos clinicamente saudáveis também foram coletadas.

4.4 Pacientes portadores de Psoríase

Foram recrutados para a biópsia de pele 21 pacientes do gênero feminino ou masculino, atendidos no ambulatório do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. Após esclarecimentos sobre o Projeto de Pesquisa, aqueles que concordaram quanto às propostas foram convidados a participar do estudo, com inclusão dos mesmos apenas após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (**Apêndice A**). Os critérios adotados foram:

- Inclusão:
 - Idade acima de 18 anos
 - Acompanhamento regular no Ambulatório de Psoríase do HC-UFPE
 - Diagnóstico de psoríase em placas de acordo com Nestle et al., (2009)
- Exclusão:
 - Não consentimento em participar do estudo
 - Diagnóstico de outra doença autoimune, infecção aguda ou crônica e câncer
 - Terapia em andamento com Imunobiológicos

4.5 Avaliação clínica

Após o consentimento e assinatura do TCLE, os pacientes foram submetidos a uma avaliação clínica com preenchimento de uma ficha específica que incluía a coleta de dados demográficos, a pontuação PASI e avaliação diferencial para Artrite Psoriática (**Apêndice B**). As classificações do PASI adotadas para o ensaio com o soro foram: leve (pontuação 0-10), moderado (pontuação 11-20) e grave (pontuação >20) segundo Naldi, 2010. Para os ensaios com biópsia de pele, a classificação recomendada foi a de Mental e colaboradores, 2008 para atividade leve (pontuação de 0-10) e moderada-grave (pontuação >10).

4.6 Dosagem de citocinas

A dosagem dos níveis séricos de IL-17A, IL-6, IL-22 e IL-21 provenientes dos pacientes portadores de psoríase e voluntários sadios foi realizada por meio de kits comerciais (eBioscience, USA e BD Biosciences, USA) de ensaio imunoenzimático, ELISA, do inglês, enzyme-linked immunosorbent assay. Os limites mínimos de detecção dos kits ELISA foram IL-17A (3,9 pg/ml), IL-6 (4,6 pg/ml), IL-22 (15,6 pg/ml) e IL-21 (8 pg/ml). Todos os protocolos foram seguidos de acordo com as recomendações do fabricante.

4.7 Biópsia de pele

Os pacientes foram submetidos a biópsias de pele com *punch* de 4mm com retirada de um fragmento da lesão psoriática. Em seguida, o tecido foi acondicionado no reagente RNA later (*Life Technologies*) para o transporte ao laboratório. As amostras permaneceram no reagente para estabilização do RNA por no mínimo 24 horas e máximo de 7 dias. Todos os procedimentos foram realizados por médico Dermatologista com especialidade em cirurgia.

‘

4.8 Extração de RNA

O RNA total das amostras de pele foi extraído e processado com RNeasy Mini Kit (*Qiagen sciences*). As amostras de pele foram retiradas da solução de RNA later e colocadas em 600µL de solução de lise acrescida de 60 µL de β-mercaptoetanol (*Sigma-Aldrich*). Com o auxílio do aparelho *Tissue Ruptor* (*Qiagen sciences*), as amostras foram trituradas mecanicamente e após sucessivas etapas utilizando mini-colunas de rotação o RNA foi obtido de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA foi estocado a – 80°C e alíquotas das amostras foram quantificadas por meio do Nanodrop 2000 (*Thermo Scientific*). As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose desnaturante para avaliar a qualidade do RNA extraído.

4.9. Síntese de cDNA

Alíquotas de RNA com alto níveis de pureza, 260/230nm >1,8, foram reversos transcritos utilizando o kit *High-capacity cDNA archive Kit 2X* (*AppliedBiosystems*). Uma mistura contendo dNTPs, iniciadores randômicos (random primers), transcriptase reversa e inibidor de RNase (1 U/µL de RNaseOUT Ribonuclease Inhibitor - *Invitrogen Life Technologies*, Califórnia, EUA) foi preparada e adicionada a um mesmo volume de RNA. A ciclagem foi realizada no aparelho *Mastercycler Nexus®* (*Eppendorf*) e consistiu em 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C, 5 minutos a 5°C e parada de reação a 4°C.

A concentração ótima de RNA utilizada para síntese foi de 500 ng definida experimentalmente.

4.10 qRT-PCR

A quantificação dos transcritos expressos nas amostras realizou-se por meio de PCR quantitativa em tempo real. Foi utilizado o método das sondas TaqMan (AppliedBiosystems) no aparelho ABIPrism 7900 HT sequence detection PCR machine (AppliedBiosystems). O gene 18S (TaqMan Hs03928990) foi utilizado como o controle endógeno ou gene de referência. A expressão relativa do RNA mensageiro foi calculada assim como descrito por Romano, 2016. A condição de ciclagem usada foi a padrão e consistiu em 2 minutos a 50°C seguido de 10 minutos a 95°C. Após essas etapas, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minutos a 60°C. Foram avaliados os genes da família da IL-1 (IL33 [TaqMan Hs00369211_m1] e IL36A [TaqMan Hs00205367]); da via imunológica Th1 (IFN γ [TaqMan Hs00989291] e IL8 [TaqMan Hs00174103_m1]); da via Th17 (IL17A [TaqMan Hs00174383], IL22 [TaqMan Hs01574154] e RORC [TaqMan Hs01076122_m1]) e da via T reg (IL10 [TaqMan Hs00961622] e FOXP3 [TaqMan Hs01085834_m1]).

4.11 Análise estatística

O software estatístico utilizado nas análises foi o GraphPad PRISM® 6.01. Para averiguar a normalidade das variáveis utilizou-se o teste de *D'Agostino-Pearson omnibus normality test*. Para comparação dos dados que possuíam distribuição normal, foi utilizado o teste t não pareado e a representação por média \pm Desvio padrão. O teste não-paramétrico *Man-whitney* e de correlação Spearman *rank correlation* foi adotado para quando as variáveis não seguíam a distribuição gaussiana e a representação por mediana, máximo e mínimo. Foi utilizado também um modelo de regressão logística para investigar as associações das expressões dos transcritos e a variável PASI. A significância estatística aceita quando o valor $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Artigo 01: Aceito para publicação em 22 de julho de 2015, Periódico *Mediators of Inflammation* - Fator de Impacto: 3.236, disponível online: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/819149>

IL-17A, IL-22, IL-6 and IL-21 serum levels in plaque-type psoriasis in Brazilian patients

Priscilla Stela Santana de Oliveira¹, Pablo Ramon Gualberto Cardoso¹, Emerson Vasconcelos Andrade Lima², Michelly Cristiny Pereira¹, Angela Luzia Branco Pinto Duarte², Ivan da Rocha Pitta¹, Moacyr Jesus Melo Barreto Rêgo¹, Maira Galdino da Rocha Pitta^{1*}

1 - Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT-SG), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brasil.

2 - Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brasil.

* Author's contact e-mail: mgrpitta@gmail.com

Phone: +55 81 96717788

Fax: +55 81 21267524

Address: Av. Prof. Moraes Rêgo, 1235, Cidade Universitária, UFPE, Centro de Ciências Biológicas, Recife, PE- Brazil. 50670-901.

Abstract:

Psoriasis is a chronic inflammatory skin disease characterized by alterations in cytokines produced by both Th1 and Th17 pathways. The aim of this study was to evaluate serum levels of pivotal cytokines and correlate them with clinical parameters. Serum samples from 53 psoriasis patients and 35 healthy volunteers, matched by the proportion of sex and age ratios, were collected for ELISA cytokine detection. Psoriasis Area and Severity Index (PASI) was assessed at the time of sampling in psoriasis patients.. Our findings demonstrate that IL-17A, IL-22, and IL-6 serum concentrations were significantly higher in psoriasis patients than in the control group. No statistical correlation could be found between cytokines concentrations, PASI score and age in this study. Although our results do not show any correlation between serum levels of IL-17A, IL-22 and IL-6 and disease activity, the present study confirms that they were increased in Brazilian psoriasis patients in comparison to healthy volunteers.

Key words: psoriasis, inflammation, interleukins, disease activity

Abbreviations:

C/EBP β , CCAAT-enhancer-binding proteins- β ; CCL, chemokine (C-C motif) ligand; CK, cytokeratin; CXCL, chemokine (C-X-C motif) ligand; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; ESR: erythrocyte sedimentation rate; INF- γ , interferon- γ ; MMP, matrix metalloproteinases; NF κ B, factor nuclear kappa B; PASI, psoriasis Area and Severity Index; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; VEGF, vascular endothelial growth factor.

1 – Introduction

Psoriasis is a chronic inflammatory skin disease that can be associated with other systemic disorders like cardiovascular disease, metabolic syndrome and inflammatory bowel disease [1,2]. The financial and psychological impacts lead to anxiety and depression especially in individuals with active professional and social lives [3-5]. The predominant clinical presentation of psoriatic lesions is characterized by the formation of scaly, well-demarcated erythematous plaques due to hyperproliferation of keratinocytes [6,7].

In vitro models studies have revealed a complex interaction of dendritic cells, epidermal keratinocytes, infiltrated immune cells and their pro-inflammatory cytokines [8, 9]. In the past decade, Th1 cytokines such as interferon gamma (IFN γ) and tumor necrosis factor alpha (TNF α) were considered to play a major role in this disease [10], but recent evidence points toward a central role of IL-23 and IL-17A in the physiopathogenesis of psoriasis. [11-13]

IL-17A enhances the expression of S100 proteins, chemokines CCL20, CXCL1, CXCL3, CXCL5, CXCL6 and CXCL8, and VEGF in keratinocytes leading to aberrant cell differentiation, proliferation and immune activation [14-16]. IL-22 decreases the expression of CK10, filagrin and involucrin and induces the production of matrix metalloproteinases 1 and 3 (MMP1 and MMP3), which facilitate the infiltration of immune cells and the restructuring of the epidermis [17, 18]. In mouse models of psoriasis elevated levels of IL-21 are associated with CK6 and CK16 overexpression, consistent with an abnormal keratinocyte proliferation [19]. Finally, IL-6 can induce IL-1 α expression, which promotes keratinocyte proliferation and the activation of NF κ B and C/EBP β transcription factors [20]. Besides, *in vitro* combination of IL-6 and TGF- β drives the differentiation of CD4⁺ T naïve cells into a Th17 phenotype [21].

This study was designed to evaluate the expression of IL-17A, IL-22, IL-21 and IL-6 in serum samples from northeastern Brazil patients with plaque-type psoriasis and its correlation with disease activity.

2 - Materials and Methods

2.1 Population under study

Serum samples from fifty three patients with plaque-type psoriasis attending the Dermatology and Rheumatology Outpatient Clinic at Universidade Federal de Pernambuco, Recife-Brazil and thirty five healthy donors were collected. The human ethics committee of the UFPE approved the study protocol (CEP-CCS 528/11). Blood samples obtained by venipuncture were centrifuged at 2000 rpm for 10 minutes. The serum was collected and stored at -80°C. Formal written consent was obtained from all the patients and healthy volunteers enrolled in the study.

2.2 Clinical assessment

Only patients with a diagnosis of plaque-type psoriasis in strict accordance with the diagnostic criteria of Nestle et al. [6] were included in the study. Psoriasis Area and Severity Index (PASI) [22] assessment was used to grade the disease activity of patients with psoriasis at the time of blood collection as mild (0-10), moderate (11-20) and severe (>20) [23]. Patients with other coexistent autoimmune disorders, acute or chronic infections, malignancies, receiving systemic treatment, immunosuppressive drugs or phototherapy were excluded from our study. Patients were off topical treatment for 4 weeks prior to the PASI score evaluation and blood sample collection.

2.3 Measurements of Cytokines

Serum levels of IL-17A, IL-6, IL-21, IL-22 were measured by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (eBiosciences USA and BD Biosciences USA) according to the manufacturers' instructions. The absorbance used was the difference between 570- 450 nm readings. The minimum limits of detection of the ELISA kits used in the experiment were 3.9 pg/mL for IL-17A , 4.69 pg/mL for IL-6, 8 pg/mL for IL-21, and 15.63 pg/mL for IL-22.

2.4 Statistical analysis

Statistical analyses were performed by GraphPad PRISM 6.01 software. The D'Agostino-Pearson and Mann-Whitney tests were used. Results were expressed as median and interquartile range, or mean \pm standard deviation (SD) for variables with normal distribution. Pearson's correlation coefficient was used in correlation analyses. The statistical significance was accepted when $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Clinical and laboratory values of psoriatic patients

Clinical and demographic characteristics of patients and controls are detailed in **Table 1**.

Table 1: Clinical features of psoriasis patients and Healthy controls

Characteristic	Mean(Range or SD)	Mean(Range or SD)
	Patients (n=53)	Controls (n=35)
Female	24	16
Male	30	19
Age (years)	50.2 \pm 13.3	46.0 \pm 11.0
PASI (n=53)	16.4 (7-41)	-
Mild (n=16)	8.3 \pm 1.1	-
Moderate (n=21)	15.2 \pm 3.0	-
Severe (n=16)	28.5 \pm 4.8	-

3.2 IL-17A, IL-22, IL-6 and IL-21 serum levels in psoriatic patients and healthy controls.

The cytokines investigated in this study were detected in serum samples from all patients whereas IL-17 and IL-6 were below the minimum detection level of the kit in healthy controls. According to the D'Agostino-Pearson test, all results obtained with the dosage of IL-17, IL-22, IL-6 and IL-21 do not follow the normal distribution and these cytokines were expressed by median with interquartile range (**Table 2**).

IL-17A, IL-22 and IL-6 serum concentrations were significantly higher in psoriatic patients than in healthy donors. In contrast, IL-21 levels were numerically higher in healthy controls than in patients, but the difference was not statistically significant.

Table2: Serum cytokines in psoriasis patients and healthy controls

Cytokine (pg/mL)	Patients				Control (n=35)	Man-whitney test
	Mild (n=16)	Moderate (n=21)	Severe (n=16)	All group (n=53)		
IL-17	3,9 (3,9-2420)	3,9 (3,9 -3530)	19,55 (3,9-3170)	3.9 (3.9-3530)	3.9 (3.9-3.9)	<0, 0001 ****
IL-6	4,6 (4,6 -203,3)	4,6 (4,6 – 469,5)	4,6 (4,6 -11,5)	4.6 (4.6-469.5)	7.8 (7.8-57.2)	<0, 0001****
IL-22	7,81 ⁺	7,8 (7,8 – 46,3)	7,8 (7,8-103,9)	7.8 (7.8-103.9)	4.6 (4.6-4.6)	0.0247*
IL-21	15,6 (15,6- 195,5)	15,6 (15,6 -230,5)	23 (7,8-335,5)	15.6 (15.63-335.5)	66.33 (7.8-1621.3)	0.2516

Values represented by median with (minimum- maximum) + Samples which has no variation

3.2 Correlations between IL-17A, IL-22, IL-6 and IL-21 serum levels of psoriatic patients and PASI Score and age.

In our study we observed that both IL-21 levels tended to correlate with Psoriasis Area Severity Index, but no statistical significance was showed (p= 0.0952). Serum levels of IL-17A and IL-6 were not correlated PASI. No correlation was found between serum levels of the cytokines analyzed in this study and severity grading or age of patients.

Discussion

Our study revealed increased IL-17A serum levels in psoriasis patients in comparison with healthy controls, but no statistical correlation between this cytokine and PASI or age was found. These results are in agreement with a randomized controlled trial that showed high blood levels of IL-17A in psoriasis patients before treatment with etanercept and acitretin [24]. More recently, a transcriptome evaluation study also demonstrated high IL-17A serum levels in moderate-severe psoriasis patients [25].

In another study, Takashi et al [26]determined serum levels of diverse cytokines and growth factors in Japanese patients with psoriasis, including some cases with psoriasis guttata, erythrodermic psoriasis and psoriatic arthritis . They observed that IL-17 levels were higher than in healthy controls and strongly correlated with PASI.

In contrast with our findings in serum samples, significantly increased mRNA expression and protein accumulation of these cytokines have been found in psoriatic skin biopsy specimens [27-29].

We did not find a statistically significant correlation between the IL-22 serum concentration and disease activity. In a recent study, Michalak-Stoma *et al* [30] found significantly higher serum concentrations of IL-22 in psoriatic patients in comparison with healthy controls and a significant positive correlation with psoriasis severity measured by PASI and BSA score. The correlation they found may be due to the greater range of PASI values in their patients (4.8 to 64.2) compared to that in our study (7 to 41). Their study population also differs from ours in the higher proportion of men (80%).

Some studies have shown increased serum levels of IL-21 in psoriasis patients with respect to healthy controls [31, 32]. However only He *et al.* [32] found a statistically significant positive correlation with PASI.

In our experiments we found elevated serum IL-6 levels in psoriatic patients with no correlation with disease severity, as has been reported before [25, 26, 29]. In a recent study Cordiali-Fei *et al.* [33] showed increased IL-6 serum levels in patients before biological therapy but no correlation with PASI was attempted. Elango and colleagues reported a positive correlation with only two components of PASI, namely infiltration and desquamation [34].

As previously discussed, cytokines well-described in psoriasis pathogenesis are also elevated in Brazilian northeastern patients' serum. IL-17 is able to induce pivotal chemokines involved in development and amplification of psoriasis plaque [14-16, 35]. IL-6 is associated with pustular variants of disease in which acts promoting keratinocyte release of neutrophil chemoattractant factors [36]. Finally, according to Sa *et al.* and Wolk *et al.*, IL-22 inhibits the final stages of keratinocyte differentiation leading to absence of a granular layer and persistence of cell nuclei in the superficial cells [37, 38].

Conclusion

Our study revealed increased IL-17A serum levels in Brazilian psoriasis patients in comparison with healthy controls, but no statistical correlation between this cytokine and PASI or age was found.

Acknowledgments

This study was supported by Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT_if).

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

References

- 1) N. Mehta , Y. Yu, and R. Pinnelas et al “Attributable risk estimate of severe psoriasis on major cardiovascular events,”*The American Journal of Medicine*, vol 124, no.8, pp e1 –e6, 2011.
- 2) W.Q. Li, J-L Han, A T Chan, and A. A. Qureshi “Psoriasis, psoriatic arthritis and increased risk of incident Crohn’s disease in US women,” *Annals of Rheumatic Disease*, vol 272, no.7, pp 1200–1205, 2013.
- 3) C. Solovan, M. Marcu, and E.Chiticariu “Life satisfaction and beliefs about self and the world in patients with psoriasis: A brief assessment,” *European Journal Dermatology*, vol 24, no. 2, pp 242-7, 2014.
- 4) T. Hawro, A. Zalewska, M. Hawro *et al.*, “Impact of psoriasis severity on family income and quality of life,” *Journal of the European Academy of Dermatology*, vol 29, pp 430-443, 2015.
- 5) K.Janowski, S. Studen, A. Pietrzak *et al.*, “Social support and adaptation to the disease in men and women with psoriasis” *Archives of Dermatological Research*, vol.304, no.6, pp 421-32, 2012.
- 6) F.O. Nestle, D. H. Kaplan, and J. Barker, “Psoriasis,” *The New England Journal of Medicine*, vol.361, pp 496-509, 2009.
- 7) J.E.Gudjonsson and J. Elder, “Psoriasis: epidemiology,” *Clinics in Dermatology*, vol. 25, pp 535-546, 2007.
- 8) G. Martin, S. Guérard, M. Fortin et al “Pathological crosstalk in vitro between T lymphocytes and lesional keratinocytes in psoriasis: necessity of direct cell-to-cell contact” *Laboratory Investigation*. vol 92, no.7, pp 1058-70, 2012
- 9) E.H. van den Bogaard, G. Tjabringa,I. Joosten et al “Crosstalk between keratinocytes and T cells in a 3D microenvironment: a model to study inflammatory skin diseases,” *Journal of Investigative Dermatology*, vol.134, no.3, pp719-27, 2014
- 10) W. Lew, A. M. Bowcock, and J.G. Krueger, “Psoriasis vulgaris: cutaneous lymphoid tissue supports T-cell activation and ‘Type 1’ inflammatory gene expression,” *Trends in Immunology*, vol. 25, pp 295–305, 2004.

- 11) E. Lee, W. L. Trepicchio, J.L. Oestreicher et al., “Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris,” *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 199, pp 125–130, 2004.
- 12) C. L. Langrish, Y. Chen, W.M. Blumenschein et al., “IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation,” *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 201, pp 233-240, 2005.
- 13) D.A. Martin, J.E. Towne, G. Kricorian et al., “The emerging role of IL-17 in the pathogenesis of psoriasis: preclinical and clinical findings,” *Journal of Investigative Dermatology*, vol.133, no.1, pp 17-26, 2013.
- 14) A. Batycka-Baran, J. Maj, R. Wolf et al., “The New Insight into the Role of Antimicrobial Proteins-Alarmins in the Immunopathogenesis of Psoriasis,” *Journal of Immunology Research*, vol. 2014, 2014.
- 15) A. Johnston, Y. Fritz, S. Dawes et al., “Keratinocyte Overexpression of IL-17C Promotes Psoriasiform Pathological crosstalk in vitro between T lymphocytes and lesional keratinocytes in psoriasis: necessity of direct cell-to-cell contact Skin Inflammation,” *Journal of Immunology*, vol. 190, pp. 2252–2262, 2013.
- 16) G. Girolomoni, U. Mrowietz, and C. Paul “Psoriasis: rationale for targeting interleukin-17,” *British Journal of Dermatology*, vol 167, no.4, pp 717-24, 2012.
- 17) K. Boniface, E. Guignouard, N. Pedretti et al., “A role for T cell-derived interleukin 22 in psoriatic skin inflammation,” *Clinical and Experimental Immunology*, vol.150, no.3, pp 407–415, 2007.
- 18) N. L. Starodubtseva, V. V. Sobolev, A.G. Soboleva et al., “Genes Expression of Metalloproteinases (MMP1, MMP2, MMP9, and MMP12) Associated with Psoriasis,” *Russian Journal of Genetics*, vol. 47, no. 9, pp. 1117–1123, 2011
- 19) M. Sarra, R. Caruso, M. L. Cupi et al., “IL-21 promotes skin recruitment of CD4+ cells and drives IFN- γ -dependent epidermal hyperplasia,” *J. Immunol*, vol 186, pp 5435-5442, 2011.
- 20) T. Sugawara, R. M. Gallucci, P.P. Simeonova et al “Regulation and role of interleukin 6 in wounded human epithelial keratinocytes,” *Cytokine*, vol.15, no.6, pp 328-36, 2001.

- 21) S. Q. Crome, A. Y. Wang, and M. K. Levings “Translational Mini-Review Series on Th17 Cells: Function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease,” *Clinical and Experimental Immunology*, vol 159, no. 2, pp 109–119, 2010.
- 22) P.C. Kerkhof, “The Psoriasis Area and Severity Index and alternative approaches for the assessment of severity: persisting areas of confusion,” *British Journal of Dermatology*, vol.137, no. 4, pp 661—2, 1997.
- 23) L. Naldi, “Scoring and monitoring the severity of psoriasis. What is the preferred method? What is the ideal method? Is PASI passe? facts and controversies,” *Clinics in dermatology*, vol. 28, no. 1, pp 67–72, 2010.
- 24) M. Caproni, E. Antiga, L. Melani et al., “Serum levels of IL-17 and IL-22 are reduced by etanercept, but not by acitretin, in patients with psoriasis: a randomized-controlled trial,” *Journal of Clinical Immunology*, vol. 29, no.2, pp 210-4, 2009.
- 25) M. Suarez-Farinas, K. Li , J. Fuentes-Duculan et al., “Expanding the psoriasis disease profile: terrogation of the skin and serum of patients with moderate-to-severe psoriasis,” *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 132, no.11, pp 2552-64, 2012.
- 26) H. Takahashi, H. Tsuji H, Y. Hashimoto et al., “Serum cytokines and growth factor levels in Japanese patients with psoriasis,” *Clinical and Experimental Dermatology*, vol. 35, no.6, pp 645-9, 2010.
- 27) O. Arican, M. Aral, S. Sasmaz et al., “Serum levels of TNF-a, IFN-c, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, nd IL-18 in patients with active psoriasis and correlation with disease severity,” *Mediators of Inflammation*, vol.5,pp 273–9, 2005.
- 28) M. A. Lowes, T. Kikuchi, J. Fuentes-Duculan et al., “Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells,” *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 128, pp 1207–11, 2008.
- 29) C. Johansen, P.A Usher, R.B. Kjellerup et al., “Characterization of the interleukin-17 isoforms and receptors in lesional psoriatic skin,” *British Journal of Dermatology* ,vol. 160, no.2, pp319-24, 2009.
- 30) A. Michalak-Stoma, J. Bartosińska, M Kowal et al., “Serum levels of selected Th17 and Th22 cytokines in psoriatic patients,” *Disease Markers*, vol35, no.6, pp 625-31, 2013.

- 31) H. Nakajima, K. Nakajima, M. Tarutani et al., "Kinetics of circulating Th17 cytokines and adipokines in psoriasis patients," *Archives of dermatological Research*, vol 303, no.6, pp 451–455, 2011.
- 32) Z. He Z, L. Jin, Z.F. Liu et al., "Elevated serum levels of interleukin 21 are associated with disease severity in patients with psoriasis," *British Journal of Dermatology*, vol 167, no.1, pp 191–193, 2012.
- 33) P. Cordiali-Fei, L. Bianchi, C. Bonifati et al., "Immunologic biomarkers for clinical and therapeutic management of psoriasis," *Mediators Inflamm*, vol 2014, 2014.
- 34) T. Elango, H. Dayalan, S. Subramanian et al., "Serum interleukin-6 levels in response to methotrexate treatment in psoriatic patients," *Clinica Chimica Acta*, vol 413, no 19-20, pp 1652-1656, 2012.
- 35) G. Girolomoni, U. Mrowietz and C. Paul. "Psoriasis: rationale for targeting interleukin-17". *Br J Dermatol*. vol 167, no 4, pp 717-24, 2012.
- 36) A. Saggini, S. Chimenti, and A. Chiricozzi. "IL-6 as a Druggable Target in Psoriasis: Focus on Pustular Variants". *Journal of Immunology Research*. vol 2014, 2014
- 37) S. M. Sa, P. A. Valdez, J. Wu et al. "The effects of IL-20 subfamily cytokines on reconstituted human epidermis suggest potential roles in cutaneous innate defense and pathogenic adaptive immunity in psoriasis". *The Journal of Immunology*. Vol 178, pp 2229–2240, 2007.

5.2 Artigo 02: Aceito para publicação em 26 de outubro de 2016, revista *Mediators of inflammation*, Fator de Impacto: 3.418

Increased IL17A, IFNG and FOXP3 transcripts in moderate- severe psoriasis: a major influence exerted by IL17A in disease severity

Priscilla Stela Santana de Oliveira^a, Michelly Cristiny Pereira^a, Simão Kalebe Silva de Paula^a, Emerson Vasconcelos Andrade Lima^b, Mariana Modesto de Andrade Lima^b, Rodrigo Gomes de Arruda^c Wagner Luís Mendes de Oliveira^a, Ângela Luzia Branco Pinto Duarte^b, Ivan da Rocha Pitta^a, Moacyr Jesus Melo Barreto Rêgo^a, Maira Galdino da Rocha Pitta^{a*}

^a*Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT-SG), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brasil.*

^b*Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brasil.*

^c*Faculdade Nova Roma, Recife, Brasil*

* **Author's contact e-mail:** mgrpitta@gmail.com

Phone: +55 81 96717788

Fax: +55 81 21267524

Address: Av. Prof. Moraes Rêgo, 1235, Cidade Universitária, UFPE, Centro de Biociências, Recife, PE - Brazil. 50670-901.

Abstract

Psoriasis is a chronic and recurrent dermatitis, mediated by keratinocytes and T cells. Several proinflammatory cytokines contribute to formation and maintenance of psoriatic plaque. The Th1/Th17 pathways and some of IL-1 family members were involved in psoriasis pathogenesis and could contribute to disease activity. Therefore, we sought to analyse skin transcript levels of IL17A, IL22, RORC, IL8, IFNG, IL33, IL36A, FOXP3 and IL10 and correlate with clinic of patients with plaque type-psoriasis. In order to conduct that, we collected punch biopsies from lesional skin and obtained tissue RNA. After reverse transcription, qRT-PCR quantified the relative mRNA expression. The main results revealed increased transcripts levels of IL17A, IFNG and FOXP3 in moderate-severe patients. Despite this, only IL17A can increase the chance to worsen disease severity. We also observed many significant positive correlations between each

transcript. In conclusion, IL17A is elevated in lesional skin from psoriasis patients and play crucial role in disease severity.

Keywords: psoriasis, cytokine, biopsy, qRT-PCR

1. Introduction

Plaque-type psoriasis is the most prevalent form of psoriasis, corresponding to approximately 90% of cases. Erythematous scaly plaques, well demarcated, raised edges and varied distribution throughout the body [1] characterizes classical lesions. In some cases, systemic diseases such as inflammatory bowel disease and cardiovascular complications are present worsening symptoms [2,3].

The Th1/Th17 pathways are the principal immune components of the disease. The precise mechanisms of how the plaque is formed remains uncertain, but when some kind of “triggers” are activated in skin, a cascade of molecules acts in the interaction between keratinocytes and immune cells. At the beginning of the process, interferon gamma (IFN γ) and tumor necrosis factor alpha (TNF α) induce Langerhans cells to produce IL-12 and IL-23 [4]. IL-12 contributes to the strengthening of Th1 profile while IL-23 leads to Th17 differentiation that produces, mainly, IL-17 and IL-22 [5,6]. In the epidermis, IL-8 operates as a potent chemotactic factor for neutrophils and contributes to the development of the erythema observed in skin lesions [7].

Recent studies have pointed out the active participation of others cytokines from IL-1 family. Between them are IL-33, also named IL-1F11, that mediates biological functions through IL-1 orphan receptor ST2 [8]. In psoriasis, TNF α regulates IL-33, which promotes inflammation through mast and keratinocyte activation [9,10]. In addition, IL-36 α is one of the three homology proteins, IL-36 α (IL-1F6), β (IL-1F8) and γ (IL-1F9) that also belongs to the IL-1 family. They are expressed in both dendritic and keratinocytes cells [11]. Evidence of the involvement of IL-36 cytokines in the pathophysiology of psoriasis includes the fact that a non-functional receptor antagonist (IL-36Ra) was associated with generalized pustular psoriasis [12]. Furthermore, IL-36 ligands deficient mice were protected from psoriasis form dermatitis model while the absence of IL-36Ra exacerbated the pathology [13].

On the other hand, regulatory T cells seem to fail in their peripheral anti-inflammatory control. Several researchers found decreased CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T circulating cells

both numerically and functionally in psoriasis patients [14,15]. In order to balance the deficient anti-inflammatory response, clinical trials have been done using IL-10 recombinant human (rh) therapy protocols [16].

The aim of this study was to evaluate the pro and anti-inflammatory psoriasis panel of molecules. Here, we sought to quantify Th17-related (IL17A, IL22 and RORC), Th1-related (IFNG and IL8), Treg-related (FOXP3 and IL10) and IL-1 family (IL33 and IL36A) skin transcripts and correlate with disease activity, systemic comorbidities and methotrexate use in samples of Brazilian patients affected by psoriasis.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics Committee

The human ethics committee of the Health Sciences Center of the Federal University of Pernambuco, located in Recife, Brazil, approved the study protocol (process number: 723.390).

2.2. Population study

The study included twenty-one patients (11 male and 10 female) with plaque-type psoriasis attended and randomly selected in the Dermatology and Rheumatology Outpatient Clinic at Universidade Federal de Pernambuco. Only patients diagnosed with plaque-type psoriasis in strict accordance with the diagnostic criteria of Nestle et al. [17], with no prior immunobiologic therapy and no coexistent autoimmune disorders were considered. Psoriasis Area and Severity Index (PASI) was measured and classified as mild (0-10) and moderate-severe (>10) according to Mental et al [18]. Other clinical parameters as comorbidities, disease duration and previous systemic treatment were also questioned.

2.3. Skin samples and RNA extraction

Four millimeters (4 mm) punch biopsies were taken from lesional skin of psoriatic patients. They were stored up to 24 hours at 4°C RNA later stabilization solution (Invitrogen Life Technologies, CA, EUA) until extraction. RNA was isolated using QIAGEN RNeasy Kit (Qiagen, Valencia, CA) and the amount was measured by nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EUA). The maximum of 500 ng of total tissue RNA were reverse transcribed using High-capacity cDNA archive Kit 2X (Applied Biosystems Warrington, UK) according to manufacturer's instruction.

2.4. Quantitative Real-time Polymerase chain reaction Analysis

qRt-pcr was carried out using predesigned Taqman probes gene expression assay (Applied Biosystems, Warrington, UK), using ABI Prism 7900 HT sequence detection

PCR machine (Applied Biosystems, Warrington, UK). We evaluated IL8 (Hs00174103_m1), IFNG (Hs00989291), IL-33 (Hs00369211_m1), IL36A (Hs00205367), IL17A (Hs00174383), IL22 (Hs01574154), IL10 (Hs00961622), RORC (Hs01076122_m1), FOXP3 (Hs01085834_m1) and 18S (Hs03928990) as a housekeeping gene. The cycling condition consisted of 2 minutes at 50°C followed by 10 minutes at 95°C. After these steps, 40 cycles of 15 seconds at 95°C and 1 min at 60°C.

2.5. Statistical Analysis

We used GraphPad PRISM 6.01 software (Graphpad Software Inc., San Diego, CA,) and STATA 12 (StataCorp LP., Texas, USA) for data plotting and analysis. To ascertain the sample's normality, we performed D'Agostino & Pearson omnibus normality test. The Mann-Whitney test and Spearman rank correlation were used when the variables did not follow Gaussian distribution. For variables that passed normality test, we applied unpaired t test. We considered correlation (R^2) strength as follows: $0 < R^2 \leq 0.35$ = weak correlation; $0.35 < R^2 \leq 0.67$ = moderate correlation; $0.67 < R^2 \leq 1$ = strong correlation. To evaluate the association between transcripts levels and PASI, we performed multiple logistic regression for the clinical variables with dichotomous scores. The statistical significance was accepted when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Patients Cohort

A group of 21 patients, 11 men and 10 women, was included in this study. The mean age was 52 years with men showing a lower mean age than women (46.9 and 57.7, respectively). We stratified the PASI in accordance with the classification postulated by Mental and colleagues (2008), in the Journal of American Academy of Dermatology. PASI showed 8 as the lower punctuation and 28 as the highest score. General mean of PASI was 18 ± 7.2 . According to that, men showed more severe disease (mean 21.3 ± 5.8) than women (14.4 ± 7.2) and it was statistically significant, $p=0.026$. Thus, we wanted to know if the other clinical parameters interfered in disease activity. The findings showed that neither prior use of methotrexate nor presence or absence of comorbidities interfered in disease activity, $p=0.4823$ and $p=0.1182$, respectively (Data not shown). **Table 1** details the clinical features of patients.

Table 1: Clinical features of psoriatic patients from Brazil northeast^a

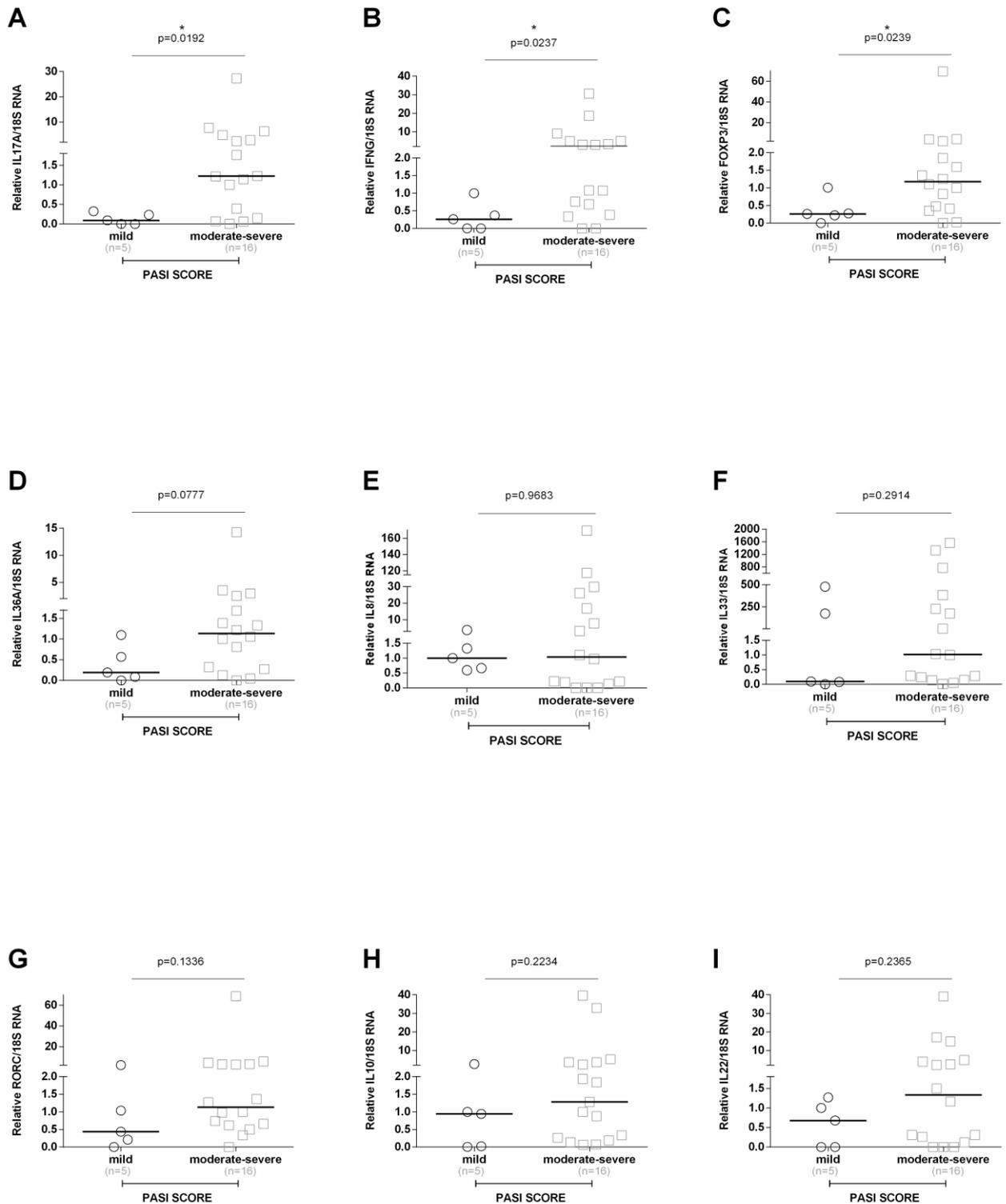
Characteristics	All individuals (n=21)
Age (yrs.)	
Mean ± SD/range	52.05±13.48/23-74
Gender N (%)	
Male	11 (52.3)
Female	10 (47.7)
Disease duration (years)	
Mean ± SD (range) All	8.1±6.5(0.5-22)
0-5 years N (%) – mean ± SD	9 (42.8) – 2.1±1.2
6-10 years N (%) - mean ± SD	6 (28.6)- 9.1±1.3
>10 years N (%) - mean ± SD	6 (28.6)- 16.3±4.2
PASI Clinical subgroups N (%)	
Mild (PASI< 10) - mean ± SD	5(23.8) – 8.8±1
Moderate-Severe (PASI ≥10)- mean ± SD	16(76.2) – 20.8±5.7
Clinical Comorbidities N (%)	
Diabetes	3 (14.3)
Dyslipidemia	3 (14.3)
Hipertension	3 (14.3)
Treatment N (%)	
Methotrexate	9 (42.9)

^aConsidering a Gaussian distribution, clinical values were represented by mean±SD

3.2. IL17A, IFNG and FOXP3 mRNA levels were increased in skin biopsy from moderate-severe psoriatic patients.

We observed that in our sample only five individuals showed disease activity considered mild and the others had more severe clinical presentation. As we can see in **Figure 1 A, B and C**, only three of the nine transcripts analysed showed statistical significance in moderate-severe disease compared with mild activity. IL17A, IFNG and FOXP3 showed $p=0.0192$, $p=0.0237$ and $p=0.0239$, respectively. **Figure 1D, E, F, G, H and I** provides the other analysed transcripts graphs.

Figure 1: Transcripts levels of A) IL17A B) IFNG C) FOXP3 D) IL36A E) IL8 F) IL33 G) RORC H) IL10 and I) IL22 according to PASI's severity disease.



3.3. Correlation between cytokines in skin biopsies from psoriatic patients

After analysing the PASI score and their influence in expression of a panel of both pro and anti-inflammatory transcripts, we evaluated the importance that each cytokine could play over the expression of the others. We summarized the significances and correlation's coefficients in table 2.

Table 2: Interplay among cytokines in human psoriasis lesions^a

	IL8	IL-33	IL36A	IL17A	FOXP3	RORC	IL22	IFNG	IL10
IL8		p=0.443	p = 0.006	p= 0.037*	p= 0.064	p= 0.798	p= 0.044*	p= 0.087	p= 0.039*
		r = -0.176	r= 0.574	r= 0.457	r= 0.410	r= 0.059	r= 0.442	r= 0.382	r= 0.452
IL33	p= 0.443		p= 0.106	p= 0.126	p= 0.097	p= 0.278	p= 0.857	p= 0.279	p= 0.211
	r= -0.176		r= 0.362	r= 0.344	r= 0.371	r= 0.248	r= -0.041	r= 0.247	r= 0.284
IL36A	p= 0.006**	p= 0.106		p= 0.001**	p< 0.001***	p= 0.096	p= 0.117	p=0.007**	p= 0.002**
	r= 0.574	r= 0.362		r= 0.651	r= 0.774	r= 0.372	r= 0.351	r= 0.563	r= 0.622
IL17A	p= 0.037	p= 0.126	p= 0.001		p<0.001***	p= 0.017*	p= 0.049*	p= 0.004**	p<0.001***
	r= 0.457	r=0.344	r=0.651		r= 0.697	r=0.511	r= 0.434	r= 0.598	r= 0.795
FOXP3	p= 0.064	p= 0.097	p<0.001***	p<0.001***		p<0.001***	p=0.109	p= 0.020*	p= 0.006**
	r= 0.410	r= 0.371	r= 0.774	r= 0.697		r= 0.686	r= 0.359	r= 0.500	r= 0.574
RORC	p= 0.798	p= 0.278	p= 0.096	p= 0.017*	p<0.001***		p= 0.821	p= 0.415	p=0.049*
	r= 0.059	r= 0.248	r= 0.372	r= 0.511	r= 0.686		r= 0.052	r= 0.187	r= 0.433
IL22	p= 0.044	p= 0.857	p=0.117	p=0.049*	p=0.109	p=0.821		p=0.179	p=0.024*
	r= 0.442	r= -0.041	r= 0.351	r= 0.434	r= 0.359	r= 0.052		r= 0.304	r= 0.487
IFNG	p= 0.087	p= 0.279	p= 0.007**	p=0.004**	p= 0.020*	p= 0.415	p= 0.179		p= 0.028*
	r= 0.382	r= 0.247	r= 0.563	r= 0.598	r= 0.500	r= 0.187	r= 0.304		r= 0.476
IL10	p= 0.039*	p= 0.211	p= 0.002**	p< 0.001***	p= 0.006**	p= 0.049*	p= 0.024*	p= 0.028*	
	r= 0.452	r= 0.284	r= 0.622	r= 0.795	r= 0.574	r= 0.433	r= 0.487	r= 0.476	

^aDetermination of statistical correlations was made according to Spearman's rank correlation test and represented by p value. * equals to p<0.05, ** to p<0.01 and *** to p<0.001. The correlation coefficient are represented by "r".

In our study, we identified several statistically significant positive correlations between the molecules analysed in different magnitudes. With $p < 0.05$ were observed in IL17 versus its own transcription factor, RAR-Related Orphan Receptor C (RORC) and other cytokines such as IL22 and IL8. We also correlated IFNG versus IL10 and FOXP3; IL22 versus IL8 and IL10; RORC versus IL10 and lastly IL8 versus IL10.

We observed more significant correlation ($p < 0.01$) between IL36A versus IL17A, IFNG, IL8 and IL10. Similarly, FOXP3 showed correlation with IL10 and IL17A with IFNG. Strongly significant correlation ($p < 0.001$) was observed between the two transcription factors RORC vs. FOXP3. This last one also correlated with IL36A and IL17A. Finally, IL10 showed significant correlation with IL17A.

3.4. Men and women have different profile of cytokines expressed in the skin

As previously mentioned, men and women exhibited different gravity of disease. Therefore, we investigated whether this fact influences the cytokine expression in the skin, separating the groups by gender. We observed that the male group showed significant high levels of IL17A transcripts than woman as well more severe disease (**Figure 2A and B**). However, there was no significant statistical when we correlated each other (**Figure 3A**). In contrast, it occurred in female group. IL17A and FOXP3 transcripts showed significant statistical positive correlation with PASI (**Figure 3B and C**).

Among the fifteen statistically significant correlations described above, eight correlations only remained in the male group. They were IL17A versus, IL8, IL22, IL36A and IL10, IL10 versus IL8 and IL22, IL36A with IL8 and RORC versus FOXP3. In the opposite, three correlations occurred only in female group: IL17A versus IFNG and FOXP3 and this last one with IL36A (**Table 3**).

Figure 2: Different IL17A biopsy profile expression (A) and disease severity (B) between man and woman.

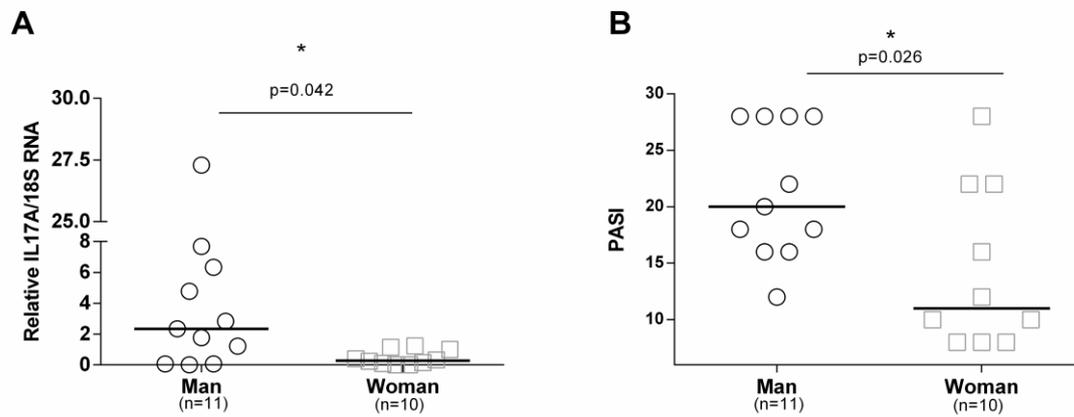


Figure 3: Correlation of IL17A (A, B) and FOXP3(C) with disease severity between man and woman.

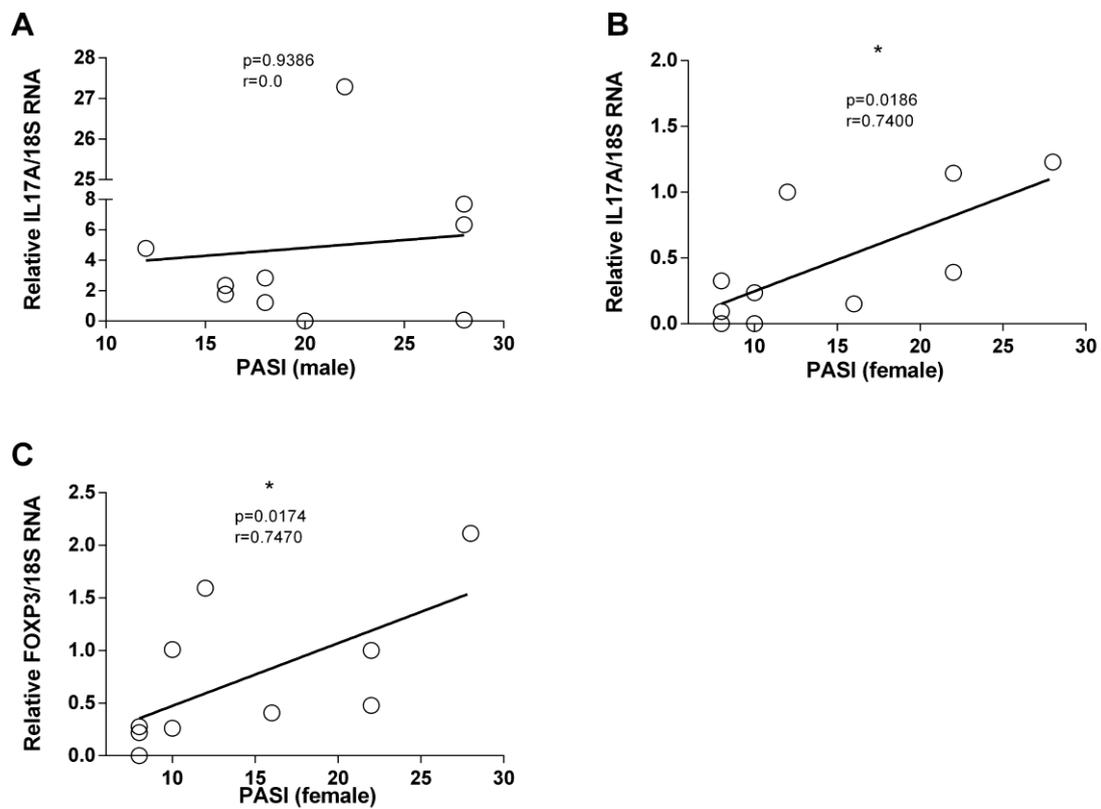


Table 3: correlation coefficients and p values by gender^a

Gene	Man	Gene	Woman
IL17A vs IL8	p= 0.017 r=0.716	IL17A vs IFNG	p<0.001 r=0.976
IL17A vs IL22	p=0.041 r=0.633	IL17A vs FOXP3	p=0.049 r=0.644
IL17A vs IL36A	p=0.031 r=0.664	FOXP3 vs IL36A	p<0.001 r=0.806
IL17A vs IL10	p=0.001 r=0.882	-	-
IL10 vs IL8	p=0.042 r=0.633	-	-
IL10 vs IL22	p=0.034 r=0.651	-	-
IL36A vs IL8	p=0.024 r=0.688	-	-
RORC vs FOXP3	p=0.005 r=0.800	-	-

^aDetermination of statistical correlations was made according to Spearman's rank correlation test and represented by p value. * equals to p<0.05, ** to p<0.01 and *** to p<0.001. The correlation coefficient is represented by "r". "vs" means versus.

3.5. IL17A exhibits greater influence on disease severity

Finally, in order to understand the relationship between transcripts levels and PASI score, we conducted a multiple logistic regression. We found that IL17A high levels increased the chance to have moderate-severe disease as shown in **Table 4**. Due to the multicollinearity existence, IFNG and IL10 could not be included in the regression model.

Table 4: Association of transcripts expression and disease activity^a

PASI score	odds ratio	95% CI ⁺	p value
IL22	0.189	0.005-6.247	0.351
RORC	0.388	0.053-2.825	0.350
FOXP3	0.014	6.18e-07-344.728	0.411
IL17A	8.16e-06	5.49e-10-0.121	0.017*
IL36A	21.499	0.191-2414.25	0.203
IL33	1.000	0.989-1.012	0.881
IL8	1.686	0.984-2.888	0.057

^a CI⁺: confidence interval

4. Discussion

Recently, we demonstrated that IL-17A, IL-22 and IL-6 cytokines were more elevated in serum from psoriasis patients than in healthy controls. However, we have not found any correlation between systemic cytokine expression and disease severity [19]. So, we decided to investigate the lesion microenvironment and investigate if there was a correlation with disease severity and if it occurred in a local level in our group.

Over the past years, researches focused in Th1/Th17 pathways and described high levels of IFN γ , IL-17 and its isoforms in lesional psoriatic skin in both gene and protein levels [20,21,22,23]. Despite the availability of studies of psoriasis large-scale genomic and transcriptomes platforms [24,25,26] there is still a gap between the current knowledge and the clinical progression.

Our study showed increased expression of IL17A, IFNG and FOXP3 in patients who exhibited severe clinical disease profile. Just as we did, Kim and Colleagues (2016) found significant difference in IL17A transcript expression between their clinically stratified groups [27]. In contrast to our study, they showed that patients classified with mild disease activity had the highest levels of IL17A. Suarez-Farinas et al. (2012) also detected greater expression of IL23 p19 and p40 subunits, IL17, IL22 and IFNG in lesions of moderate-severe patients using real-time reverse transcriptase method [28].

Further, we verified significant levels of FOXP3 in psoriasis lesions from severe patients. Considering that it is reported as a T regulatory cell transcription factor, we did not expect this increase. Soler and colleagues (2013) demonstrated that psoriasis patients really had regulatory T cells presenting FOXP3, although most of them was non-functional [29].

We did not observe significant differences in expression of IL8, IL22, IL10, RORC, IL33 and IL36A. However, we detected their signature in psoriatic skin at a transcript level and this corroborated with previous studies [30,31,32].

Continuing our analysis, we conducted all possible correlations between cytokines. Then, we found statistically significant correlation between cytokines from all three pathways with each other. It is important to notice that IL17A showed correlation with almost all analysed transcripts. Carrier and colleagues (2011) previously identified the inter-regulation among Th17 Cytokines and IL-36 homologous forms. They also

verified significance in correlation between IL36A versus IL17A and IFNG [33], as we did.

Curiously, we noted that IL17A had strong significant correlation with anti-inflammatory FOXP3 and IL10. As we did not expect increased Foxp3 in moderate-severe patients, this correlation seems antagonistic. Nevertheless, recent studies demonstrated another side of Treg cells. Bovenschen et al. (2011) found positive triple CD4⁺ IL-17⁺ FOXP3⁺ in lesions from psoriasis patients indicating co-pathogenic profile. Soler and colleagues (2011) also pointed the connection between IL17 and FOXP3. They defended that Treg Cells in psoriasis readily turn into IL-17-expressing cells [34,35].

We also verified that, when we considered gender, some correlations between cytokines only occurred in one of the groups. The male group preserved most of correlations especially those involving Th17 pathway. We could associate it to the fact that male group showed PASI mean 21.3 ± 5.8 and it is statistically higher than in women PASI 14.4 ± 7.2 . It is worth pointing out that the severity of psoriasis in female patients may fluctuate with hormonal changes with worsening in puberty and peak at menopause [36]. Taking into consideration that population in this study consisted of elderer women (57.7 ± 9.8), they presented milder disease.

It is important to recognize our limitations in this study. We identified some failures such as small sample size, elevated cases of patients with moderate-severe disease, absence of healthy controls and lack of proteomic analysis to confirm our findings. However, we know that, in psoriasis research, there are few studies with emphasis on experimental immunology in Brazil. Therefore, we hope that these data may open doors for future investigations.

5. Conclusion

Our study revealed increased transcripts levels of IL17A, IFNG and FOXP3 in moderate-severe psoriasis patients. IL17A seems to play major influence in disease severity. In addition, we also showed complex network correlations between Th1, Th17, Treg and IL-1 family related transcripts.

Acknowledgements

The present study was supported by grants from Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (573663/2008-4), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes, Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco – FACEPE and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Conflict of interest

All authors declare no conflicts of interest

References

- [1] Gudjonsson, J. E. and J. T. Elder. Psoriasis: Epidemiology. *Clinics in Dermatology* 25, no. 6 (2007): 535-546.
- [2] Baeta, I. G., F. V. Bittencourt, B. Gontijo and E. M. Goulart. Comorbidities and Cardiovascular Risk Factors in Patients with Psoriasis. *An Bras Dermatol* 89, no. 5 (2014): 735-44.
- [3] Park, H. S., S. J. Koh, G. Y. Park, D. H. Lee, H. S. Yoon, J. I. Youn and S. Cho. Psoriasis Concurrent with Inflammatory Bowel Disease. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 28, no. 11 (2014): 1436-1441.
- [4] Lew, W., A. M. Bowcock and J. G. Krueger. Psoriasis Vulgaris: Cutaneous Lymphoid Tissue Supports T-Cell Activation and "Type 1" Inflammatory Gene Expression. *Trends Immunol* 25, no. 6 (2004): 295-305
- [5] Athie-Morales V, Smits HH, Cantrell DA, Hilkens CM. Sustained IL-12 signaling is required for Th1 development. *J Immunol.* (2004) Jan 1;172(1):61-9
- [6] Lowes, M. A., C. B. Russell, D. A. Martin, J. E. Towne and J. G. Krueger. The IL-23/T17 Pathogenic Axis in Psoriasis Is Amplified by Keratinocyte Responses. *Trends Immunol* 34, no. 4 (2013): 174-81.
- [7] Duan H et al. Interleukin-8-positive neutrophils in psoriasis. *J Dermatol Sci.* (2001) Jun;26(2):119-24.
- [8] J.Schmitz et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* ,vol .23 , no.5 (2005), pp.479–490.
- [9] Balato A et al., IL-33 is secreted by psoriatic keratinocytes and induces pro inflammatory cytokines via keratinocyte and mast cell activation. *Exp Dermatol.* (2012) Nov;21(11):892-4.

- [10] Balato A et al., IL-33 is regulated by TNF- α in normal and psoriatic skin. *Arch Dermatol Res.* (2014) Apr;306(3):299-304.
- [11] Vignee et al. IL-36R ligands are potent regulators of dendritic and T cells. *Blood* 118 (2011), 5813–5823.
- [12] Marrakchiet al. Interleukin-36-receptor antagonist deficiency and generalized pustular psoriasis. *N. Engl. J. Med.* (2011) 365, 620–628.
- [13] Tortola et al., Psoriasiform dermatitis is driven by IL-36–mediated DC-keratinocyte crosstalk. *J Clin Invest.* (2012); 122(11):3965–3976.
- [14] Richetta et al: CD4+ CD25+ T-regulatory cells in psoriasis. Correlation between their numbers and biologics-induced clinical improvement. *Eur J Dermatol.* (2011); 21:344348.
- [15] Soler et al., Psoriasis patients exhibit impairment of the high potency CCR5+ T regulatory cell subset. *vol 149 (2013) (1):111-118.*
- [16] Markus Friedrich. Immunomodulation by Interleukin-10 Therapy Decreases the Incidence of Relapse and Prolongs the Relapse-free Interval in Psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology* (2002) 118, 672–677.
- [17] Nestle, Kaplan and Barker. Psoriasis. *The New England Journal of Medicine* (2009), vol.361, pp 496-509.
- [18] Menter et al. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis. *Journal of American Academy of Dermatology* (2008), v. 58, n. 5, p. 826-864.
- [19] Oliveira, Priscilla. IL-17A, IL-22, IL-6 and IL-21 serum levels in plaque-type psoriasis in Brazilian patients. *Mediators of Inflammation* Volume 2015 (2015), 5 pages.
- [20] Teunissen et al. Interleukin-17 and interferon-gamma synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes. *J Invest Dermatol* (1998) 111: 645–9.
- [21] Jiawen, Dongsheng and Zhijian. The expression of interleukin-17, interferon-gamma, and macrophage inflammatory protein-3 alpha mRNA in patients with psoriasis vulgaris. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]* (2004) 4, Volume 24, Issue 3, pp 294-296
- [22] Johansen et al. Characterization of the interleukin-17 isoforms and receptors in lesional psoriatic skin. *Br J Dermatol* (2009), 160(2):319-24.
- [23] Lowes et al. Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *J Invest Dermatol* (2008); 128:1207–11

- [24] Jabbari et al. Transcriptional profiling of psoriasis using RNA-seq reveals previously unidentified differentially expressed genes. *J Invest Dermatol* (2012) 132:246–9
- [25] Joyce et al. Deep sequencing of small RNAs from human skin reveals major alterations in the psoriasis miRNAome. *Hum Mol Genet* (2011) 20:4025–40
- [26] Gudjonsson et al. Assessment of the psoriatic transcriptome in a large sample: additional regulated genes and comparisons with in vitro models. *J Invest Dermatol* (2010) 130:1829–40
- [27] Kim et al., Molecular Phenotyping Small (Asian) versus Large (Western) Plaque Psoriasis Shows Common Activation of IL-17 Pathway Genes but Different Regulatory Gene Sets. *Journal of Investigative Dermatology* (2016) 136, 161-172
- [28] Suarez-Farinas et al., Expanding the Psoriasis Disease Profile: Interrogation of the Skin and Serum of Patients with Moderate-to-Severe Psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology* (2012) 132, 2552–2564.
- [29] Soler and McCormick. The Dark Side of Regulatory T Cells in Psoriasis. *J Invest Dermatol.* (2011) Sep; 131(9): 1785–1786.
- [30] Asadullah et al., IL-10 Is a Key Cytokine in Psoriasis. *J. Clin. Invest.* (1998). 101:783–794.
- [31] Boniface et al., A role for T cell-derived interleukin 22 in psoriatic skin inflammation. *Clinical and Experimental Immunology*, 150: 407–415
- [32] Balato et al., IL-33 is secreted by psoriatic keratinocytes and induces pro-inflammatory cytokines via keratinocyte and mast cell activation. *Experimental Dermatology* (2012), 21, 876–894
- [33] Carrier et al., Inter-regulation of Th17 Cytokines and the IL-36 Cytokines In vitro and In vivo: Implication in psoriasis pathogenesis. *Journal of Investigative Dermatology* (2011) 131, 2428–2437.
- [34] Bovenschen et al., Foxp3⁺ regulatory T cells of psoriasis patients easily differentiate into IL-17A-producing cells and are found in lesional skin. *J Invest Dermatol.* (2011) Sep;131(9):1853-60.
- [35] Soler et al., Psoriasis patients exhibit impairment of the high potency CCR5⁺ T regulatory cell subset. *Clinical Immunology*. Vol 149 (2013) (1), pp 111–118.
- [36] Ceovic et al., Psoriasis: Female Skin Changes in Various Hormonal Stages throughout Life—Puberty, Pregnancy, and Menopause. *BioMed Research International* Volume 2013 (2013), Article ID 571912, 6 pages.

6 DISCUSSÃO

Em virtude do aparecimento das lesões epidérmicas e das comorbidades associadas a psoríase em placas, marcadores imunológicos locais e sistêmicos tem sido alvo de pesquisas em amostras de soro e pele de pacientes portadores da doença. Em nosso estudo, procuramos investigar alguma associação entre os níveis moléculas inflamatórias e os parâmetros clínicos da doença.

Encontramos níveis aumentados de IL-6, IL-22 e, principalmente, IL-17A no soro de pacientes em comparação ao grupo controle. Esta expressão elevada já havia sido relatada em trabalhos anteriores (ARICAN *et al.*,2005; ELANGO *et al.*,2012; MICHALAK-STOMA *et al.*,2013 e CORDIALI-FEI *et al.*,2014). Apesar de não observado a correlação dos níveis séricos com o índice de gravidade da doença (PASI), este trabalho reitera o fato das citocinas relacionadas a via Th17 estarem aumentadas no soro de indivíduos com psoríase em placas. É importante ressaltar que, até o momento, não foram encontrados estudos da via Th17 em soro de pacientes com psoríase em uma amostragem da população brasileira, tornando este estudo referência para futuras investigações.

Sabe-se que a IL-17A é capaz de induzir a produção de quimiocinas por parte dos queratinócitos. Estas moléculas promovem a quimotaxia de células inflamatórias para a placa em formação. O ciclo é então formado quando as células recrutadas $T\gamma\Delta$ e, principalmente, Th17 produzem mais IL-17 (MARTIN *et al.*,2012; LOWES *et al.*, 2013). A IL-6 foi encontrada em níveis elevados e associada a uma variante mais grave da doença, a psoríase pustular (SANGININI *et al.*,2014). Além disso, esta citocina *in vitro* é capaz de induzir células T auxiliares imaturas ao fenótipo Th17 (ANNUZIATO *et al.*, 2007). Produzida também pelas células Th17, a citocina IL-22 interfere principalmente nas fases finais de maturação dos queratinócitos epidérmicos. As células periféricas permanecem com os núcleos celulares os quais deveriam ser expulsos para a formação da camada anucleada de queratinócitos preenchidos somente pela queratina (WOLK *et al.*, 2009).

Assim como observado no soro, transcritos da via Th17 (IL17A, RORC e IL22) também foram detectados em amostras de biópsia de pele de pacientes com psoríase. Adicionalmente, as citocinas da Th1 (IFNG e IL8), T regulatória (FOXP3 e IL10 e família da IL-1 (IL33 e IL36A) foram pesquisadas e igualmente detectadas. Contudo, os resultados mostram que apenas IL17A, IFNG e FOXP3 estão aumentados de maneira

significante no grupo de pacientes que apresentam a doença mais grave comparado aos pacientes com apresentação clínica branda. É esperado que IL17A e IFNG, principais interleucinas das vias Th17 e Th1, estejam aumentadas no microambiente da lesão conforme evidenciado em trabalhos anteriores (JIAWEN *et al.*,2004, SUAREZ-FARINAS *et al.*,2012; JOHANSEN *et al.*2009).

De maneira interessante, o FOXP3, fator de transcrição de células T regulatórias, também foi encontrado aumentado. Contudo, este resultado não implica necessariamente que estas células estejam exercendo seu papel anti-inflamatório. Soler e colaboradores (2013) demonstraram que pacientes com psoríase possuem células T regulatórias, contudo, grande parte não-funcionais.

Também foi observado correlações positivas e estatisticamente significantes entre as citocinas avaliadas. Dentre estas, destaca-se a IL-17A a qual correlacionou-se com pelo menos um transcrito de cada via imunológica avaliada. Carrier *et al.*, 2011 descreveu a inter-correlação entre as citocinas IL-17A, IL-22, IL-23, IL-12, IFN γ e TNF α com a citocina IL-36A. De forma semelhante a este estudo, a correlação entre IL-17A e IL-36A obteve valor de significância igual a $p=0.001$ e coeficiente de correlação em torno de $r=0.7$. Estes achados reforçam a importância da ação sinérgica ou aditivadas citocinas pró-inflamatórias na psoríase (KIRKHAM, KAVANAUGH REICH, 2014). E além do mais, pela regressão logística realizada, a IL-17A de forma independente, exibiu maior influência na gravidade da doença. Os presentes achados mostram, ainda, que a única citocina que apresentou perfil de correlação negativa foi a IL-33 com IL-8 e IL-22, porém não estatisticamente significante.

Entre as correlações positivas mais significativas, $p<0.001$, curiosamente destacam-se IL-17A vs FOXP3, ROR γ t vs FOXP3 e IL-17A vs IL-10. Apesar de apresentarem papel antagônico no processo inflamatório, Bovenschen *et al.*, 2011 encontraram células triplo positivas CD4⁺IL-17⁺FOXP3⁺ em lesões de pacientes com psoríase grave. Sob condições inflamatórias, as células T reg (CD25⁺FOXP3⁺IL-10⁺) se converteriam em células produtoras de IL-17A, perdendo gradativamente o FOXP3 e elevando os níveis de ROR γ t. Esta conversão seria mediada por IL-23 e pelo processo epigenético de acetilação de histonas (SOLER *et al.*, 2011).

Em outras doenças autoimunes como espondilite anquilosante e artrite psoriática, diferenças moleculares e clínicas relacionadas ao gênero têm sido extensivamente investigadas (ÉDER, CHANDRAN E GLADMAN, 2012). Apesar da incidência e prevalência da psoríase ser reportada como igual em ambos os gêneros (PARISI *et al.*, 2013), os resultados encontrados mostram que no grupo analisado, os homens apresentaram atividade da doença mais severa do que as mulheres. O mesmo foi observado em um estudo de cohort publicado por Hagg *et al.*, 2013 na qual a população masculina fazia uso de tratamento com biológicos por apresentar doença mais severa.

No presente estudo, o perfil de correlação entre as citocinas também diferiu em relação ao gênero. Os homens mantiveram a maioria das correlações significativas que envolvia a citocina IL-17A e diferentes daquelas encontradas no grupo feminino. Adicionalmente, o coeficiente de correlação aumentou quando a análise foi realizada entre os grupos. Na análise geral, a relação RORC vs FOXP3 era de $r=0.68$ e no grupo masculino observou-se um $r=0.8$. Em relação as mulheres, observou-se que as correlações de IL-17 vs IFN γ e FOXP3 vs IL-36A cujos coeficientes eram de $r=0.56$ e $r=0.77$ aumentaram para $r=0.97$ e $r=0.8$, respectivamente. Como dito anteriormente, a relação IL-17 x IFN γ é bem relatada na psoríase enquanto que FOXP3 x IL-36A ainda precisa ser melhor esclarecida.

Em estudo recente, Bebes *et al.*, 2014 demonstraram que células T regulatórias de pacientes psoriáticos expressaram níveis elevados do receptor de IL-1 (IL-1R2 e sIL-1R2) após ativação. Enquanto membro da família da IL-1, a IL-36A é agonista deste receptor e, portanto, sugere-se que este seria um dos possíveis mecanismos para explicar a relação positiva entre IL-36A e FOXP3.

A diferença entre as correlações entre os gêneros pode ser justificada pelo fato de que os homens apresentaram atividade da doença mais grave. Como já apresentado, IL17A, IFN γ e FOXP3 encontraram-se significativamente aumentados em pacientes com doença moderada-grave. Segundo Ceovic *et al.*, 2013, as mulheres apresentam pico de atividade da doença na puberdade e na menopausa. O grupo de mulheres incluídas neste estudo apresentou média de idade de 57,7, superior a idade referida para ocorrer menopausa natural em mulheres brasileiras, 51,2 anos (PEDRO *et al.*, 2003). Dessa forma, é plausível constatar que o grupo feminino apresentou doença com índice de severidade da doença mais brando do que os homens.

7 CONCLUSÕES

- IL-17 A, IL-6 e IL-22 estão significativamente aumentadas no soro de pacientes com psoríase em comparação com controles saudáveis. Todavia não foi encontrado correlação com PASI ou idade;
- IL17A, IFNG, FOXP3 estão significativamente aumentados em biópsias de pele de pacientes com apresentação clínica moderada-grave;
- Não foi observado correlação entre as citocinas IL8, IL33, IL36A, IL-17A, RORC, IL22, IFNG, IL10 e FOXP3 e os parâmetros clínicos de idade, uso prévio de Metotrexato e tempo de doença;
- Homens e mulheres apresentaram perfil de correlações distintos, todavia apenas os homens recrutados para biópsia de pele apresentaram doença mais grave;
- Foram encontradas correlações positivas e estatisticamente significantes entre os genes das da via Th1 (IFNG, IL8) com a expressão de genes da via Th17 (IL17, IL22 e RORC), Treg (FOXP3 e IL10) e da família IL-1 (IL33 e IL36A) em biópsias de pele.

8 PERSPECTIVAS

- Avaliar a expressão protéica na pele de pacientes com psoríase dos marcadores IL-17A, IFN γ e FOXP3 por Western Blotting;
- Investigar o fenótipo das células T regulatórias em células mononucleares do sangue periférico de pacientes portadores de psoríase;
- Quantificar os genes da via Th1 (IFN γ , IL8), Th17 (IL17, IL22 e RORC), Treg (FOXP3 e IL10) e da família IL-1 (IL36A) em amostras biópsias de pele de lesão e não lesão e controle saudáveis;
- Avaliar a atividade imunomoduladora *in vitro* do Metotrexato em células mononucleares do sangue periférico de pacientes portadores de psoríase.

REFERÊNCIAS

AITHAL, G. P., B. HAUGK, S. DAS, T. CARD, A. D. BURT AND C. O. RECORD. "Monitoring Methotrexate-Induced Hepatic Fibrosis in Patients with Psoriasis: Are Serial Liver Biopsies Justified?" **Aliment Pharmacol Ther**, v 19, no. 4, pp 391-9, 2004.

ALI, M. AND M. WHITEHEAD. "Clearance of Chronic Psoriasis after Eradication Therapy for Helicobacter Pylori Infection." **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v 22, no. 6, pp 753-4, 2008.

ALLEN *et al.* The Major Psoriasis Susceptibility Locus Psors1 Is Not a Risk Factor for Late-Onset Psoriasis." **J Invest Dermatol**, v 124, no. 1, pp 103-6, 2005.

ANNUNZIATO, F., L. *et al.* Phenotypic and Functional Features of Human Th17 Cells." **J Exp Med**, v 204, no. 8, pp 1849-61, 2007.

ANTONI, C. AND J. BRAUN. Side Effects of Anti-Tnf Therapy: Current Knowledge **Clin Exp Rheumatol**, v 20, no. 6 (28), pp S152-7, 2002.

ATASOY, M., I. *et al.* Association of Hla Class I and Class II Alleles with Psoriasis Vulgaris in Turkish Population. Influence of Type I and II Psoriasis. **Saudi Med**, v 27, no. 3, pp 373-6, 2006.

ATEFI, N., S. *et al.* The Rise of Staphylococcal Super Antigens in Psoriatic Patients: A Case-Control Study. **Jundishapur J Microbiol**, v 7, no. 5, e9912, 2014.

ATTWA, E. AND E. SWELAM. Relationship between Smoking-Induced Oxidative Stress and the Clinical Severity of Psoriasis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v 25, no. 7, pp 782-787, 2011.

AUGUSTIN, M., G. *et al.* Epidemiology and Comorbidity of Psoriasis in Children." *Br J Dermatol* 162, no. 3 (2010): 633-6.

BAETA, I. G. *et al.* Comorbidities and Cardiovascular Risk Factors in Patients with Psoriasis. **An Bras Dermatol**, v 89, no. 5, pp 735-44, 2014.

BERTH-JONES, J. The Use of Cyclosporin in Psoriasis. **J Dermatolog Treat**, v 16, no. 5-6, pp 258-77, 2005.

BHOSLE, M. J. *et al.* Quality of Life in Patients with Psoriasis. **Health Qual Life Outcomes**, v 4, p 35, 2006.

BOEHNCKE, W. H. AND S. BOEHNCKE. Cardiovascular Mortality in Psoriasis and Psoriatic Arthritis: Epidemiology, Pathomechanisms, Therapeutic Implications, and Perspectives. **Curr Rheumatol Rep**, v 14, no. 4, pp 343-8, 2012.

BOEHNCKE, W. H. AND S. BOEHNCKE. More Than Skin-Deep: The Many Dimensions of the Psoriatic Disease. **Swiss Med Wkly**, v 144, pp w13968, 2014.

BRENAUT, E., C. Alcohol Consumption and Psoriasis: A Systematic Literature Review. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, vol 27,nº 3,pp 30-5, 2013.

BOVENSCHEN H.J. et al. Foxp3+ regulatory T cells of psoriasis patients easily differentiate into IL-17A-producing cells and are found in lesional skin. **J Invest Dermatol**.v 131, nº 9, pp1853-60, 2011

BROTAS, A. M. et al. Tumor Necrosis Factor-Alpha and the Cytokine Network in Psoriasis. **An Bras Dermatol**, v 87, no. 5, pp 673-81, 2012.

CARRETERO G, et al. Acitretina: guía de uso en psoriasis. **Actas Dermosifiliogr**. vol104, pp 598-616,2013

CHEN, G. Y. et al. Prevalence of Skin Diseases among Schoolchildren in Magong, Penghu, Taiwan: A Community-Based Clinical Survey. **J Formos Med Assoc**, vol 107, no. 1, pp 21-9, 2008.

CLOP, A. et al. An in-Depth Characterization of the Major Psoriasis Susceptibility Locus Identifies Candidate Susceptibility Alleles within an Hla-C Enhancer Element. **PLoS One**, vol 8, no. 8, e71690, 2013.

CONSENSO BRASILEIRO DE PSORÍASE - **Guias de avaliação e tratamento Sociedade Brasileira de Dermatologia**. – 2 ed. Rio de Janeiro, 2012.

COSTA DE FARIA et al. Importância da variação do PASI realizado por diversos observadores. **An. Bras. Dermatol**. vol.85, no.5, 2010

CROME, S. Q., A. Y. WANG AND M. K. LEVINGS. Translational Mini-Review Series on Th17 Cells: Function and Regulation of Human T Helper 17 Cells in Health and Disease. **Clinical and Experimental Immunology**, vol 159, no. 2, pp 109-119, 2010.

CROXTALL, J. D et al. Ustekinumab a Review of Its Use in the Management of Moderate to Severe Plaque Psoriasis. **Drugs**, vol 71, no. 13,pp 1733-1753, 2011.

CUA, D. J. AND C. M. TATO. Innate IL-17-Producing Cells: The Sentinels of the Immune System. **Nature Reviews Immunology**. vol 10, no. 8, pp 612-612, 2010.

DAUDEN, E. et al. Expert Recommendations: The Use of the Fixed Combination Calcipotriol and Betamethasone Dipropionate Gel for the Topical Treatment of Psoriasis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, vol 28, (2014): 22-32.

EMRE, S., A et al. The Relationship between Oxidative Stress, Smoking and the Clinical Severity of Psoriasis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, vol 27, no. 3, pp e370-e375, 2013.

- FRAGA, N. A Psoriasis and Uveitis: A Literature Review. **An Bras Dermatol**, vol 87, no. 6, pp 877-83, 2012.
- FREDRIKSSON, T. AND U. PETTERSSON. Severe Psoriasis - Oral Therapy with a New Retinoid. **Dermatologica**, vol 157, no. 4, pp 238-244, 1978.
- FRIEDRICH, M., C. Il-36gamma Sustains a Proinflammatory Self-Amplifying Loop with Il-17c in Anti-Tnf-Induced Psoriasiform Skin Lesions of Patients with Crohn's Disease. **Inflamm Bowel Dis**, vol 20, no. 11, pp 1891-901, 2014.
- GELFAND, J. M. et al. The Prevalence of Psoriasis in African Americans: Results from a Population-Based Study. **J Am Acad Dermatol**, vol 52, no. 1, pp 23-6, 2005.
- GERDES, S. et al. Comedication Related to Comorbidities: A Study in 1203 Hospitalized Patients with Severe Psoriasis. **British Journal of Dermatology**, vol 159, no. 5, pp 1116-1123, 2008.
- GISONDI, P. et al. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Patients with Chronic Plaque Psoriasis." **J Hepatol**, vol 51, no. 4, pp 758-64, 2009.
- GLADYS, A. M. Systemic treatment of psoriasis - Part I: Methotrexate and acitretin. **An bras Dermatol**, vol 79, pp 263-278, 2004.
- GOMI, T. et al. Interleukin-1-Alpha, Tumor-Necrosis-Factor-Alpha, and Interferon-Gamma in Psoriasis. **Archives of Dermatology**, vol 127, no. 6, pp 827-830, 1991.
- GUDJONSSON, J. E. AND J. T. ELDER. Psoriasis: Epidemiology. **Clinics in Dermatology**, vol 25, no. 6, pp 535-546, 2007.
- GURGEL A, et al. Corticoterapia t6pica: conhecendo detalhes. Programa de educa77o m6dica continuada. **Unimagem**, 2005.
- HARPER, E. G. et al. Th17 Cytokines Stimulate Ccl20 Expression in Keratinocytes in Vitro and in Vivo: Implications for Psoriasis Pathogenesis. **Journal of Investigative Dermatology**, vol 129, no. 9, pp 2175-2183, 2009.
- JACOBI, A., A. MAYER AND M. AUGUSTIN. Keratolytics and Emollients and Their Role in the Therapy of Psoriasis: A Systematic Review. **Dermatol Ther (Heidelb)**, vol 5, no. 1, pp 1-18, 2015.
- JANOWSKI, K. et al. Social Support and Adaptation to the Disease in Men and Women with Psoriasis. **Archives of Dermatological Research**, vol 304, no. 6, pp 421-432, 2012.
- JOHANSEN, C. Characterization of the Interleukin-17 Isoforms and Receptors in Lesional Psoriatic Skin. **British Journal of Dermatology**, vol 160, no. 2, pp 319-324, 2009.
- KAVANAUGH, A., et al. Long-Term Follow-up of Patients Treated with Remicade (Infliximab) in Clinical Trials. **Arthritis and Rheumatism**, vol 44, no. 9, pp S81-S81, 2001.

- KEANEY, T. C. AND R. S. KIRSNER. New Insights into the Mechanism of Narrow-Band Uvb Therapy for Psoriasis. **J Invest Dermatol**, vol 130, no. 11, pp 2534. 2010.
- KELLY, J. B., P. FOLEY AND B. E. STROBER. Current and Future Oral Systemic Therapies for Psoriasis. **Dermatologic Clinics**, vol 33, no. 1, pp 91-109, 2015.
- KIM, B. Y. et al. Histopathological Findings Are Associated with the Clinical Types of Psoriasis but Not with the Corresponding Lesional Psoriasis Severity Index. **Ann Dermatol**, vol 27, no. 1, pp 26-31, 2015.
- KOLLIAS G, SFIKAKIS PP. TNF Pathophysiology. Molecular and Cellular Mechanisms. **Curr Dir Autoimmun**. vol 11, pp 180–210, 2010.
- KORKOLIAKOU, P. C. et al. Alexithymia, Anxiety and Depression in Patients with Psoriasis: A Case-Control Study. **Ann Gen Psychiatry**, vol 13, no. 1, pp 38, 2014.
- KOURIS, A. et al . Proinflammatory Cytokine Responses in Patients with Psoriasis. **Eur Cytokine Netw**, vol 25, no. 4, pp 63-8, 2014.
- KRUEGER, J. G. AND A. BOWCOCK. Psoriasis Pathophysiology: Current Concepts of Pathogenesis. **Ann Rheum Dis**, vol 64, Suppl 2, pp ii30-6, 2005.
- KURILIC, M., et al. Systemic Therapy in the Treatment of Psoriasis: Drugs of Prebiological Era. **Lijec Vjesn**, vol 132, no. 7-8, pp 246-51, 2010.
- KURIZKY, P. S. AND L. M. H. DA MOTA. Sexual Dysfunction in Patients with Psoriasis and Psoriatic Arthritis - a Systematic Review. **Revista Brasileira De Reumatologia**, vol 52, no. 6, pp 938-948, 2012.
- LAMBA, S. AND M. LEBWOHL. Combination Therapy with Vitamin D Analogues. **Br J Dermatol**, vol 144, Suppl 58, pp 27-32, 2001.
- LEE, E. et al. Increased Expression of Interleukin 23 P19 and P40 in Lesional Skin of Patients with Psoriasis Vulgaris. **J Exp Med**, vol 199, no. 1, pp 125-30, 2004.
- LEW, W., A. M. BOWCOCK AND J. G. KRUEGER. Psoriasis Vulgaris: Cutaneous Lymphoid Tissue Supports T-Cell Activation and "Type 1" Inflammatory Gene Expression. **Trends Immunol**, vol 25, no. 6, pp 295-305, 2004.
- LEW, W., E. LEE AND J. G. KRUEGER. Psoriasis Genomics: Analysis of Proinflammatory (Type 1) Gene Expression in Large Plaque (Western) and Small Plaque (Asian) Psoriasis Vulgaris. **Br J Dermatol**, vol 150, no. 4, pp 668-76, 2004.
- LOWES, M. A. ET AL. The Il-23/T17 Pathogenic Axis in Psoriasis Is Amplified by Keratinocyte Responses. **Trends Immunol**, vol 34, no. 4, pp 174-81, 2013.
- MAHAJAN, B. B. AND M. SINGLA. Evaluation of Intralesional 5% 5-Fluorouracil in Resistant Localized Plaque Psoriasis. **Indian Dermatol Online**, vol 5, no. 3, pp 287-90, 2014.

MAMKIN, I., A. MAMKIN AND S. V. RAMANAN. Hiv-Associated Psoriasis. **Lancet Infect Dis**, vol 7, no. 7, pp 496, 2007.

MARTIN, D. A. et al. The Emerging Role of Il-17 in the Pathogenesis of Psoriasis: Preclinical and Clinical Findings. **J Invest Dermatol**, vol 133, no. 1, pp 17-26, 2013.

MASON, A. R., et al Topical Treatments for Chronic Plaque Psoriasis of the Scalp: A Systematic Review. **Br J Dermatol**, vol 169, no. 3, pp 519-27, 2013.

MCALFEER, M. A. et al Alcohol Misuse in Patients with Psoriasis: Identification and Relationship to Disease Severity and Psychological Distress. **Br J Dermatol**, vol 164, no. 6, pp 1256-61, 2011.

MCMULLEN, E. A. et al "Association between Long-Term Acitretin Therapy and Osteoporosis: No Evidence of Increased Risk. **Clinical and Experimental Dermatology**, vol 28, no. 6, pp 691-691, 2003.

MEASE, P. J. Psoriatic Arthritis Assessment and Treatment Update. **Current Opinion in Rheumatology**, vol 21, no. 4, pp 348-355, 2009.

MEHTA, N. N. et al. Attributable Risk Estimate of Severe Psoriasis on Major Cardiovascular Events. **American Journal of Medicine**, vol 124, no. 8, 2011.

MENTER, A. et al. Guidelines of Care for the Management of Psoriasis and Psoriatic Arthritis: Section 5. Guidelines of Care for the Treatment of Psoriasis with Phototherapy and Photochemotherapy. **J Am Acad Dermatol**, vol 62, no. 1, pp 114-35, 2010.

Menter, A. et al. Guidelines of Care for the Management of Psoriasis and Psoriatic Arthritis. Section 3. Guidelines of Care for the Management and Treatment of Psoriasis with Topical Therapies. **J Am Acad Dermatol**, vol 60, no. 4, pp 643-59, 2009.

MINGNORANCE, R.C. Psoriasis patients: quality of life and psychosocial adjustment **An. Bras.dermatol**, vol 77(2), pp 146-159, 2002.

MROWIETZ, U. AND K. REICH. Psoriasis--New Insights into Pathogenesis and Treatment. **Dtsch Arztebl Int**, vol 106, no. 1-2, pp 11-8, 2009.

MROWIETZ, U. AND K. REICH. Ten Years of Infliximab: It's Role in Dermatology. **Eur J Pharmacol**, vol 623 Suppl 1, pp S10-6, 2009.

Mussi, A. et al. Serum Tnf-Alpha Levels Correlate with Disease Severity and Are Reduced by Effective Therapy in Plaque-Type Psoriasis. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**, vol 11, no. 3, pp 115-118, 1997.

NAIR, R. P. et al Localization of Psoriasis-Susceptibility Locus Psors1 to a 60-Kb Interval Telomeric to Hla-C. **American Journal of Human Genetics**, vol 66, no. 6, 1833-1844, 2000.

NALDI, L. Scoring and Monitoring the Severity of Psoriasis. What Is the Preferred Method? What Is the Ideal Method? Is Pasi Passe? Facts and Controversies. **Clin Dermatol**, vol 28, no. 1, pp 67-72, 2010.

NESTLE, F. O., D. H. KAPLAN AND J. BARKER. Mechanisms of Disease: Psoriasis. **New England Journal of Medicine**, vol 361, no. 5, pp 496-509, 2009.

NI, C. AND M. W. CHIU. Psoriasis and Comorbidities: Links and Risks. **Clin Cosmet Investig Dermatol**, vol 7, pp 119-32, 2014.

NOGRALES, K. E., B. DAVIDOVICI AND J. G. KRUEGER. New Insights in the Immunologic Basis of Psoriasis. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, vol 29, no. 1, pp 3-9, 2010.

ONSUN, N. et al. Impact of Helicobacter Pylori Infection on Severity of Psoriasis and Response to Treatment. **Eur J Dermatol**, vol 22, no. 1, pp 117-20, 2012.

PARHAM, C. et al. A Receptor for the Heterodimeric Cytokine Il-23 Is Composed of Il-12rbeta1 and a Novel Cytokine Receptor Subunit, Il-23r. **J Immunol**, vol 168, no. 11, pp 5699-708, 2002

PARISI, R., D. P. M. SYMMONS, C. E. M. GRIFFITHS, D. M. Ashcroft and Identification Management. Global Epidemiology of Psoriasis: A Systematic Review of Incidence and Prevalence. **Journal of Investigative Dermatology**, vol 133, no. 2, pp 377-385, 2013.

PARK, H. S. et al. Psoriasis Concurrent with Inflammatory Bowel Disease. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, vol 28, no. 11, pp 1436-1441, 2014.

PISKIN, G. et al. In Vitro and in Situ Expression of Il-23 by Keratinocytes in Healthy Skin and Psoriasis Lesions: Enhanced Expression in Psoriatic Skin. **Journal of Immunology**, vol 176, no. 3, pp 1908-1915, 2006.

PUZENAT, E. et al. What Are the Best Outcome Measures for Assessing Plaque Psoriasis Severity? A Systematic Review of the Literature. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, vol 24, pp 10-16, 2010.

QUEIRO, R. et al. Age at Disease Onset: A Key Factor for Understanding Psoriatic Disease. **Rheumatology**, vol 53, no. 7, pp 1178-1185, 2014.

ROMANO A, et al. FOXP3⁺ Regulatory T Cells in Hepatic Fibrosis and Splenomegaly Caused by *Schistosoma japonicum*: The Spleen May Be a Major Source of Tregs in Subjects with Splenomegaly. **PLoS Negl Trop Dis**, vol 10(1), pp e0004306, 2016.

RUSSELL, C. B. et al. Blockade of the Il-17r with Amg 827 Leads to Rapid Reversal of Gene Expression and Histopathologic Abnormalities in Psoriatic Skin, Including Substantial Pathway-Specific Effects within One Week. **Journal of Investigative Dermatology**, vol 131, pp S11-S11, 2011.

SAKAGUCHI, S. et al Foxp3+ Regulatory T Cells in the Human Immune System. **Nat Rev Immunol**, vol 10, no. 7, pp 490-500, 2010.

SARACENO, R., R. MANNHEIMER AND S. CHIMENTI. Regional Distribution of Psoriasis in Italy. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, vol 22, no. 3, pp 324-329, 2008.

SOLER, D. C. AND T. S. MCCORMICK. The Dark Side of Regulatory T Cells in Psoriasis. **J Invest Dermatol**, vol 131, no. 9, pp 1785-6, 2011.

SOLER, D. C. et al. Psoriasis Patients Exhibit Impairment of the High Potency Ccr5(+) T Regulatory Cell Subset. **Clin Immunol**, vol 149, no. 1, pp 111-8, 2013.

STAN, C. Cellular and molecular changes of psoriatic keratinocytes in response to uva in vitro treatment, **Romanian J. Biophys**, vol 14, pp 1-12, 2015

STEINMAN, L. Mixed Results with Modulation of Th-17 Cells in Human Autoimmune Diseases. **Nat Immunol**, vol 11, no. 1, pp 41-4, 2010.

STERN, R. S. Lymphoma Risk in Psoriasis: Results of the Puva Follow-up Study. **Arch Dermatol**, vol 142, no. 9, pp 1132-5, 2006.

STERN, R. S. AND N. LAIRD. The Carcinogenic Risk of Treatments for Severe Psoriasis. Photochemotherapy Follow-up Study. **Cancer**, vol 73, no. 11, pp 2759-64, 1994.

Sterry, W. et al. Comparison of Two Etanercept Regimens for Treatment of Psoriasis and Psoriatic Arthritis: Presta Randomised Double Blind Multicentre Trial. **BMJ**, vol 340, c147, 2010.

STUART, P. et al. Analysis of phenotypic variation in psoriasis as a function of age at onset and family history. **Arch Dermatol Res**, vol 294, pp 207-13, 2002.

TAK, P. P. AND J. R. KALDEN. Advances in Rheumatology: New Targeted Therapeutics. **Arthritis Res Ther**, vol 13 Suppl 1, pp S5, 2011.

TAN et al. Quality of life issues and measurement in patients with psoriasis. **Psoriasis: Targets and Therapy**, vol 2, pp 13-23, 2012.

TOBIN, A. M. et al. Prevalence of Psoriasis in Patients with Alcoholic Liver Disease. **Clin Exp Dermatol**, vol 34, no. 6, pp 698-701, 2009.

VADASZ, Z., D. RIMAR AND E. TOUBI. The New Era of Biological Treatments. **Israel Medical Association Journal**, vol 16, no. 12, pp 793-798, 2014.

VALESINI, G. et al. Biological and Clinical Effects of Anti-Tnfalpha Treatment. **Autoimmun Ver**, vol 7, no. 1, pp 35-41, 2007.

VILLANOVA, F., P. DI MEGLIO AND F. O. NESTLE. Biomarkers in Psoriasis and Psoriatic Arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, vol 72, pp 104-110, 2013.

WEIDMANN, A. et al. Methotrexate toxicity during treatment of chronic plaque psoriasis: a case report and review of the literature. **Dermatol Ther (Heidelb)**, vol 4(2), pp145-56, 2014.

WEISENSEEL, P. B. et al. Streptococcal Infection Distinguishes Different Types of Psoriasis. **Journal of Medical Genetics**, vol 39, no. 10, pp 767-768, 2002.

WILLIS, R. F., R. PEDERSEN AND ETANERCEPT EUROPEAN INVESTIGATORS. A Long-Term, Open-Label Trial of the Safety and Efficacy of Etanercept (25 Mg Twice Weekly) in Patients with Rheumatoid Arthritis (Interim Analysis). **Journal of Rheumatology**, vol 28, pp101-101, 2001.

XHAJA, A. et al. An Epidemiological Study on Trigger Factors and Quality of Life in Psoriatic Patients. **Mater Sociomed**, vol 26, no. 3, pp 168-71, 2014.

YANG, Y. C. et al., Prevalence of Childhood Acne, Ephelides, Warts, Atopic Dermatitis, Psoriasis, Alopecia Areata and Keloid in Kaohsiung County, Taiwan: A Community-Based Clinical Survey. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, vol 21, no. 5, pp 643-9, 2007.

YÉLAMOS , O. et al. Acute severe methotrexate toxicity in patients with psoriasis: a case series and discussion. **Dermatology**. Vol 229(4), pp 306-9, 2014.

ZAHAVA V., DORON R. AND ELIAS T. The New Era of Biological Treatments. **IMAJ**, vol 16, pp 793-98, 2014.

APÊNDICE

Apêndice A– Termo de consentimento Livre e esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE EESCLARECIDO PARA CIDADÃOS ALFABETIZADOS

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa **Avaliação de genes envolvidos no processo inflamatório em pacientes portadores de psoríase: busca de novos marcadores de predição, prognóstico e alvos terapêuticos**, que está sob a responsabilidade da pesquisadora **Dr. Michelly Cristinny Pereira**, CPF: 067.369.646-44, Rua José Augusto da Silva Braga Bairro Novo – Olinda-PE, (81) 34396206, michelly2305@yahoo.com.br. Também participam também desta pesquisa: Priscilla Stela Santana de Oliveira fone: (81) 91641122

Este Termo de Consentimento pode conter alguns tópicos que o/a senhor/a não entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte à pessoa a quem está lhe entrevistando, para que o/a senhor/a esteja bem esclarecido (a) sobre tudo que está respondendo. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, caso aceite em fazer parte do estudo, rubriche as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa o (a) Sr. (a) não será penalizado (a) de forma alguma. Também garantimos que o (a) Senhor (a) tem o direito de retirar o consentimento da sua participação em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalidade.

A psoríase (Pso) é uma doença inflamatória e crônica da pele, caracterizada pela formação de placas vermelhas, descamativas e bem delimitadas o que gera grande impacto na qualidade de vida dos portadores não só pelo comprometimento estético-corporal, mas também por estar associada ao aumento na frequência de outras doenças como síndrome metabólica, doença cardiovascular, doença inflamatória intestinal e câncer nestes pacientes, com conseqüente diminuição da expectativa de vida.

Nós solicitamos a sua colaboração e participação neste estudo porque você é **um voluntário portador ou não desta doença**. Para este estudo, precisamos coletar algumas células do sangue. A coleta de sangue é feita no braço, e a quantidade coletada é equivalente a duas colheres de sopa (10-15 ml). Antes de iniciar a coleta, nós limparemos

o braço com álcool, e todo material usado na coleta é descartável. A coleta será feita por profissionais treinados, competentes e orientados para reduzir os riscos. Para os portadores da doença será necessário realizar uma biópsia, que consiste em retirar um fragmento (pedacinho) de mais ou menos 0,5 (meio) centímetro de pele, bem superficial. O objetivo é estudar o que acontece na pele das pessoas que têm psoríase. O procedimento será realizado por profissional competente, com Título de Especialista em Dermatologia e com habilidade cirúrgica, para reduzir ao mínimo os riscos para o paciente. Para os não portadores desta doença, a amostra de pele será proveniente dos restos de pele retirados na cirurgia plástica no Hospital das Clínicas, não havendo necessidade de nenhum procedimento adicional.

Os riscos envolvidos nesse projeto se referem à coleta de sangue, que pode ser um pouco desconfortável e o braço pode ficar dolorido e apresentar um hematoma, que é uma área arroxeadada no local da coleta. Na biópsia da pele incomoda um pouco apenas a picada da anestesia que é realizada com agulha muito fina, e pode deixar uma pequena cicatriz, referente a um grau de feijão. Com relação aos benefícios, o voluntário será submetido a uma avaliação clínica completa e, caso seja detectada alguma alteração, ele será comunicado e também será prescrito o tratamento adequado.

Os resultados deste estudo serão apresentados em congressos, conferências ou em revistas médicas, mas não aparecerá seu nome. Suas informações nunca serão divulgadas, permanecerão confidenciais.

Os dados coletados nesta pesquisa, provenientes dos resultados das amostras coletadas ficarão devidamente armazenadas em arquivos digitais em computadores ou impressos em pastas de arquivos sob responsabilidade da pesquisadora responsável Dr. Michelly Cristinny Pereira, no Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino NUPIT-SG localizado no 1º andar do Prédio da Diretoria de Inovação e Empreendedorismo - DINE (ao lado do Dept. de Educação Física) cujo endereço é Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE, por um período mínimo 5 anos.

Você tem alguma pergunta sobre a sua participação neste estudo?

Se você tiver alguma pergunta mais tarde, poderá conversar com um dos membros da nossa equipe, podendo contatar:

Profa. Dra. Maira Galdino Da Rocha Pitta, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE. E-mail: mgrpitta@gmail.com. Telefone/Fax: 55 (81) 2126-8346

Assim como, o coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/CCS, o **Professor Dr. Geraldo Bosco Lindoso Couto**, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, situado na Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Telefone/Fax: 55 (81) 2126-8588.

Você ficará com uma cópia deste documento.

Nome do responsável pela coleta da amostra:

Se você aceitar participar deste estudo, por favor, preencha o formulário abaixo.

Nome:

RG: _____ **Data:** _____

Endereço: _____

Assinatura: _____

Testemunha 1: _____

RG: _____ **Data:** _____

Testemunha 2: _____

RG: _____ **Data:** _____

Pesquisador Responsável: _____ **Data:** _____

APÊNDICE B: FICHA CLÍNICA AMBULATÓRIO PSORÍASE –HC-UFPE

PSORÍASE

Data de início dos sintomas: ____/____/____

Δt = _____(anos, meses, etc.)

Data do diagnóstico: ____/____/____

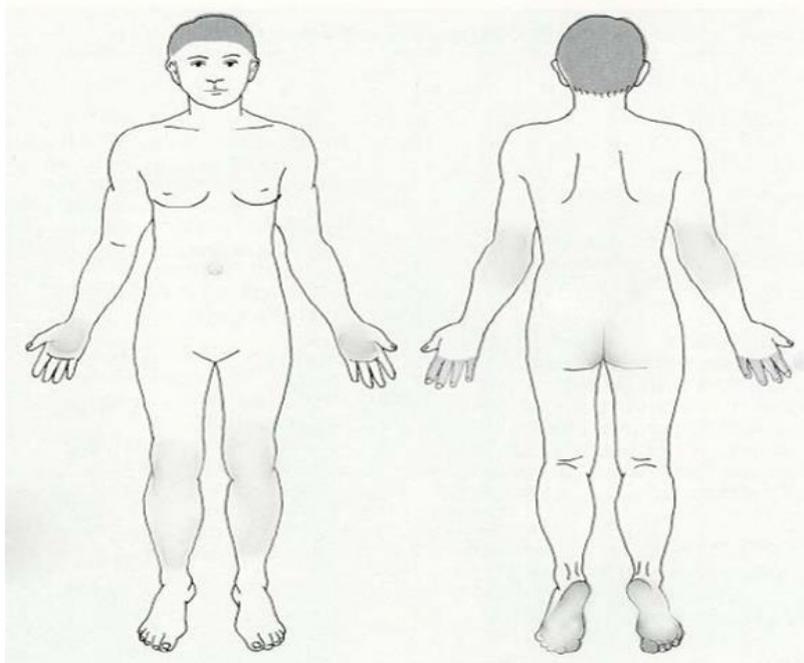
Comorbidades: _____

Medicação: _____

PASI(0 – 72): _____

	Área	Eritema	Infiltração	Descamação	Soma x Área x Escore	Total
Cabeça (x 0,1)						
Tronco (x 0,3)						
MMSS (x 0,2)						
MMII (x 0,4)						

Pontuação	0	1	2	3	4	5	6
Eritema							
Infiltração	Nenhum	Discreto	Moderado	Grave	Muito Grave	-----	-----
Descamação							
Área Real (%)	0	1 – 9	10 - 29	30 - 49	50 - 69	70 - 89	90 – 100



ANEXOS

ANEXO A: Parecer comitê de ética 1

➤ AMOSTRAS DE SORO DE PACIENTES COM PSORÍASE

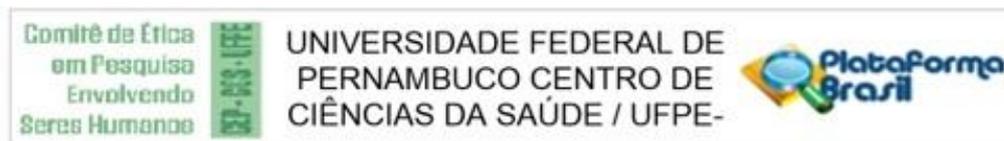
Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos

O projeto foi aprovado no CEP-CCS-UFPE

Número do CEP: **528/11**

ANEXO B: Parecer comitê de ética 2

➤ BIÓPSIAS DE PELE DE PACIENTES COM PSORÍASE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de genes envolvidos no processo inflamatório em pacientes portadores de psoríase: busca de novos marcadores de predição, prognóstico e alvos terapêuticos

Pesquisador: Michelly Cristiny Pereira

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 1

CAAE: 30748614.7.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 723.390

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o pesquisador está autorizado para iniciar a coleta de dados.

Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, após a entrega do relatório final, na PLATAFORMA BRASIL, através de "Notificação" e, após apreciação, será emitido Parecer Consubstanciado.

RECIFE, 20 de Julho de 2014

Assinado por:
GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
 (Coordenador)
