

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

Pablo Ramon Gualberto Cardoso

**Avaliação da Atividade Imunomoduladora de Novos Derivados
Tiazolidínicos em Células do Sangue Periférico de Pacientes Portadores
de Psoríase**

Recife

2014

Pablo Ramon Gualberto Cardoso

**Avaliação da Atividade Imunomoduladora de Novos Derivados
Tiazolidínicos em Células do Sangue Periférico de Pacientes Portadores
de Psoríase**

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

Orientador(a): Prof.(a). Dr^a. Maira Galdino da Rocha Pitta
Coorientador: Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo
Coorientador: Dr^a. Michelly Cristiny Pereira

Recife

2014

Catálogo na fonte

Elaine Barroso

CRB 1728

Cardoso, Pablo Ramon Gualberto

Avaliação da atividade imunomoduladora de novos derivados tiazolidínicos em células do sangue periférico de pacientes portadores de Psoríase/ Pablo Ramon Gualberto Cardoso– Recife: O Autor, 2014.

122 folhas: Il., fig., tab.

Orientadora: Maira Galdino da Rocha Pitta

Coorientadores: Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo e Michelly Cristiny Pereira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Inovação Terapêutica, 2014

Inclui bibliografia, apêndices e anexos

- 1. Psoríase 2. Tiazóis 3. Inflamação I. Pitta, Maira Galdino da Rocha (orientadora) II. Rêgo, Moacyr Jesus Barreto de Melo (coorientador) III. Pereira, Michelly Cristiny (coorientadora) IV. Título**

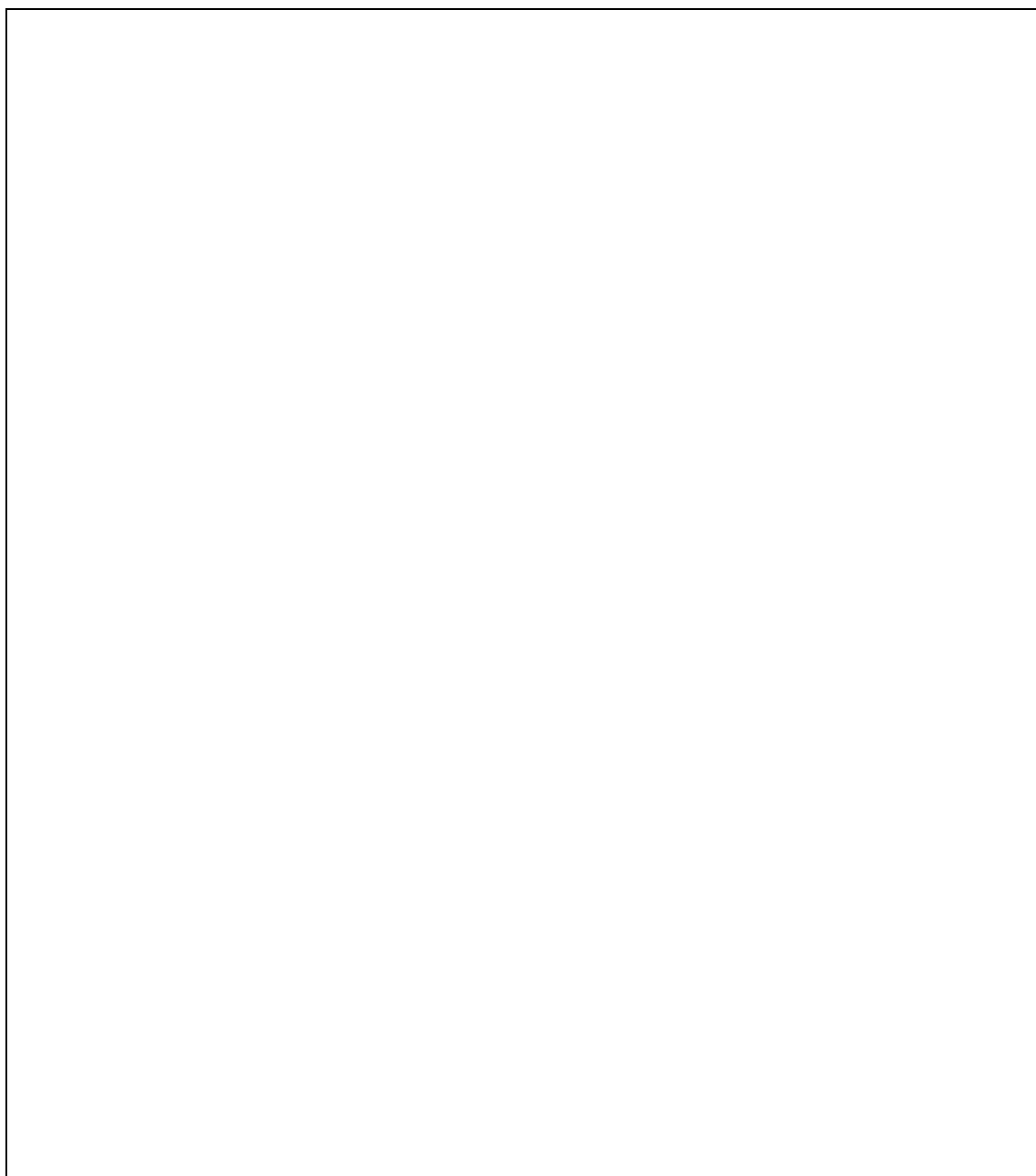
615.1

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-263

Cardoso, PRG	Avaliação da Atividade Imunomoduladora de Novos Derivados Tiazolidínicos em Células do Sangue Periférico de Pacientes Portadores de Psoríase	2,5 cm espaço reservado para etiqueta de localização	Mestrado PPGITUFPE 2014
--------------	--	--	-------------------------------

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. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profa. Dra. Maria Eduarda Lacerda de Larrazábal

VICE- DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profa. Dra. Oliane Maria Correia Magalhães

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade

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

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Recife, 15 de abril de 2014.

Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 15 de abril de 2014, cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E PRIMEIRO EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo (Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

PRIMEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Profa. Dra. Angela Luzia Branco Pinto Duarte (Departamento de Medicina Clínica – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

SEGUNDO EXAMINADOR EXTERNO: Profa. Dra. Eliane Campos Coimbra (Departamento de Genética – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

Dedicatória

A todos que sempre me apoiaram.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus familiares por terem me dado todo o apoio, me manterem voltado aos estudos, estando ao meu lado enviando força e perseverança para que sempre me mantivesse determinado, comemorando cada etapa conquistada e buscando aprimorar sempre, nunca desistindo dos meus sonhos.

Agradeço aos três pilares da minha formação como mestre, professores, pesquisadores e amigos comprometidos. Primeiramente minha orientadora, a Professora Maira Pitta, por ter investido em mim logo no começo como aluno de graduação e agora como futuro mestre. Em seguida a Michelly e Moacyr que me apoiaram durante essa etapa sempre muito solícitos e atenciosos, fosse nos procedimentos ou dúvidas que surgiram ao longo.

A Emerson Lima, o qual foi responsável por parte do trabalho e que esteve sempre disposto a ajudar e formando então uma nova amizade. Agradeço também a todos do Laboratório LINAT, os quais formam uma nova família, já que convivemos tanto, deixando de lado o “status” de colegas de trabalho para grandes amigos, em especial Henrique Mariz, Mardonny Chagas, Priscilla Stela e Sayonara Calado, os quais tenho grande apreço.

A Paulo Brito, secretário do PPGIT, o qual sempre se mostrou empenhado em resolver e ajudar fosse em qualquer problema, tornando uma importante peça no concluir desta dissertação.

E, por fim, mas tão importante quanto, a Clayton Rodrigues, Romero Henrique, Diogo Chalegre, Diogo Castelo Branco, Leonardo Aquino, Cleber Albuquerque, Renata Cavalcanti, Polyana Lira e a todos os meus amigos que convivo sempre, em horas boas ou ruins, que sempre foram importantes no desenvolvimento da minha pessoa, nas diversas ocasiões que já vivemos.

Obrigado a todos.

“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece.”

(Benjamin Disraeli)

Resumo

CARDOSO, Pablo Ramon Gualberto. Avaliação da Atividade Imunomoduladora de Novos Derivados Tiazolidínicos Agonistas do PPAR- γ em Células do Sangue Periférico de Pacientes Portadores Psoríase. 2014. 136f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Introdução: A psoríase afeta cerca de 2-3% da população. Esta doença é uma dermatite crônica, recorrente e tem envolvimento inflamatório mediado por células T. A apresentação mais comum da psoríase é o envolvimento da pele com placas eritematosas bem definidas, escamosas, de posição e tamanhos variados. Na placa psoriásica há uma disfunção imunológica que envolve vários tipos celulares e mediadores inflamatórios, como citocinas, tal qual IL -17A. Estuda-se uma atividade imunomoduladora dos derivados tiazolidinadionas (TZD). Esta classe de medicamentos tem uma possível ação anti-inflamatória, e pode ser capaz de reduzir as lesões de psoriásicas.

Materiais e Métodos: Portanto, decidiu-se estudar três novos derivados TZD em células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) de pacientes com psoríase. Depois da confirmação da estrutura química, os compostos LPSF-SF-33, LPSF-SF-34 e LPSF-SF-35 foram adicionados em cultura de PBMC estimuladas ou não com PMA/Iono. Após 48h os sobrenadantes destas culturas foram utilizados para a avaliação da IL-17A, IL-22 e IL-6.

Resultados: O LPSF-SF-33 mostrou uma boa atividade imunomoduladora, reduzindo os níveis de IL - 17A e IL - 22 no sobrenadante de cultura em comparação com a estimulação por PMA/Iono. O LPSF-SF-34 mostrou bons resultados de inibição de IL-17A e IL-22 e ainda em todas as doses foi mais eficaz do que a metilprednisolona, droga padrão, na redução da IL-22. O composto do LPSF-SF-35 diminuiu a produção de IL-17A e IL-22 e também foi capaz de diminuir a produção de IL-6 quando comparado com PMA/Iono.

Conclusão: Estes novos derivados tiazolidínicos LPSF-SF-33, LPSF-SF-34 and LPSF-SF-3 são capazes de inibir a produção de IL-17A, IL-22 e IL-6 em doses diferentes e o efeito pode indicar melhoria da inflamação.

Palavras-chave: Psoríase. Tiazolidinadionas. Citocinas. Inflamação.

Abstract

CARDOSO, Pablo Ramon Gualberto. Evaluation of Immunomodulatory Activity of New Derivatives Tiazolidínicos Agonists of PPAR- γ in Peripheral Blood Cells of Patients with Psoriasis. 2014. 136f. Dissertation (Master). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Introduction: Psoriasis affects about 2-3% of the population. This is a chronic dermatitis, recurrent and inflammatory disease mediated by T cells. The most common presentation of psoriasis is skin involvement with well-defined and demarcated erythematous plaque, scaly, and random position in the patient's body. In psoriatic plaque, there is an immune dysfunction involving many cell types and inflammatory mediators such as cytokines like IL-17A. There is an immunomodulatory activity of thiazolidinedione derivatives. This class of drugs has a possible anti-inflammatory action, may be able to mitigate the psoriatic lesions.

Objectives and Methods: Therefore, we decided to study three new TZD derivatives in PBMC of patients with Pso. After chemical structure confirmation, the thiazolidinedione derivatives LPSF-33, LPSF-34 and LPSF-35 were prepared in culture of PBMC, stimulated or not with PMA / Iono. After that, the supernatant of these cultures were used for IL-17A, IL-22 and IL-6 evaluation.

Discussion: The three new TZDs tested were able to reduce the expression of IL-17A and IL-22 at different doses compared to PMA/Iono, but only LPSF-SF-35 was able to reduce a significant IL-6 levels. The compounds differ in their molecular structure that is added by the radical and perhaps the LPSF-SF-35 has been better because in its final structure it features a pyridine.

Conclusion: The new thiazolidinedione derivatives LPSF-SF-33, LPSF-SF-34 and LPSF-SF-35 are capable of inhibiting the production of IL-17A, IL-22 and IL-6 at different doses and the effect may indicate improvement in inflammation.

Key words: Psoriasis, Thiazolidinediones, Cytokines, Inflammation

Lista de Ilustrações

Figuras	Pág.
Figura 1: Lesões Psoriásicas	26
Figura 2: Início do Quadro inflamatório da Psoríase	29
Figura 3: O papel da IL-23 na Psoríase	32
Figura 4: Principais células e agentes inflamatórios envolvidos na Psoríase	34
Figura 5: Atuação do PPAR- γ em vários órgãos e tecidos do corpo humano	38
Figura 6: Estrutura química dos compostos LPSF-SF-33, LPSF-SF34, LPSF-SF-35, LPSF-SF-37 e LPSF-SF-38.	43

Lista de Quadros

	Tabela	Pág.
Quadro 1: Representação do Valor de P		44

Lista de Tabelas

Tabela	Pág.
Tabela 1: Interpreta o valor do PASI dos pacientes nos grupos masculino e feminino.	47

Lista de Abreviações e Siglas

anti-TNF- α	Anti - Fator de Necrose Tumoral alfa
CID10	Classificação Internacional de Doenças
CO ₂	Dióxido de Carbono
COX	Ciclooxigenase
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FDA	Food and Drug Administration (USA)
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
ICAM	Molécula 1 de Adesão Intercelular
IFN- γ	Interferon- <i>gamma</i>
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IL-23R	Receptor de IL-23
Iono	Ionicina
IP-10	Proteína 10 Indutora de Interferon
LPSF	Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógenos
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MMP	Metaloproteinase
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NF- κ B	Fator de Transcrição Nuclear kappa B
NK	Células Natural Killer

NOs	Óxido Nítrico
PASI	Psoríase Índice de Gravidade da Área
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PMA	Acetato Miristato de Forbol
PPAR	Receptores Proliferadores de Peroxissoma
PPAR- γ	Receptores Proliferadores de Peroxissoma <i>gamma</i>
Pso	Psoríase
RXR	Receptores Retinóides
STAT	Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição
T CD4+	Linfócitos auxiliares T CD4 positivos
T CD8+	Linfócitos auxiliares T CD8 positivos
Tc1	Linfócito T citotóxico tipo 1
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- β	Fator de Crescimento Tumoral Beta
Th1	T helper 1
Th17	T helper 17
Th2	T helper 2
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
Treg	Células T regulatórias
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VSH	Velocidade de Sedimentação das Hemácias

Sumário

1. Introdução	19
2. Justificativa	22
3. Objetivos	23
3.1. Geral	23
3.2. Específico	23
4. Revisão Bibliográfica	24
4.1. Aspectos Gerais	24
4.2. Características Clínicas e Epidemiológicas	26
4.3. Fisiopatogenia	28
4.4. Tratamento	35
4.5. O PPAR- γ e os Derivados Tiazolidínicos	37
5. Metodologia	41
5.1. Delineamento do Estudo	41
5.2. Tipo do Estudo	41
5.3. Métodos	41
5.3.1. Pacientes	41
5.3.2. Coleta de Sangue	42
5.3.3. Cultura de Células	42
5.3.4. Determinação de Citocinas	42
5.3.5. Teste de citotoxicidade dos Novos derivados Tiazolidínicos em PBMCs	42
5.3.6. Avaliação da Atividade Imunomoduladora dos Novos Derivados Tiazolidínicos	44
5.3.7. Estatística dos Resultados	44
5.3.8. Considerações Éticas	45
6. Resultados	46
6.1. Avaliação clínica dos Pacientes portadores de Psoríase e Seleção dos Controles	46
6.2. Artigo 1: New Thiazolidinediones derivate and this immunomodulatory effects in PBMCs of Patients with Psoriasis	48

6.3. Artigo 2: Clinical and Cytokine Profile Evaluation in Northeast Brazilian Psoriasis Plaque-type Patients	62
6.4. Artigo 3: IL-17A, IL-22, IL-6 and IL-21 Serum Levels in Plaque-type Psoriasis in Brazilian Patients	74
7. Discussão	85
8. Conclusões	89
9. Perspectivas	89
10. Referências	90
11. Anexos	107
11.1. Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos	107
12. Apêndices	108
12.1. Artigo publicado durante o mestrado	108
12.2. Ficha Clínica para Recrutamento dos Pacientes portadores de Psoríase	120

1. Introdução

A Psoríase (Pso) é uma doença sistêmica, poligênica, inflamatória, progressiva e recorrente, caracterizada por proliferação acelerada dos queratinócitos, associada à ativação imune desordenada e a alterações sistêmicas correlacionadas (Nestle, Kaplan e Barker, 2009). A apresentação clássica (85% a 90%) é o acometimento flexural, dobras, da pele por placas eritematosas e descamativas, bem delimitadas, com dimensão e disposição variadas, comprometendo profundamente a imagem corporal. Estas lesões geram constrangimentos sociais devido à falta de informação e comprometimento na qualidade de vida do paciente, conduzindo frequentemente a ansiedade, depressão e, não raro, suicídio (Vardy *et al.*, 2002; Griffiths e Barker, 2007). Esse contexto é agravado pelo acometimento de pacientes jovens, em idade laborativa, acarretando falta ao trabalho, redução na produtividade e prejuízos econômicos (Bhosle *et al.*, 2006; Aghaei, Moradi e Ardekani, 2009).

Estudos de base populacional apresentam uma variação de prevalência mundial da doença de zero a 3,58%, segundo localização geográfica e etnia. No entanto, algumas variações de incidência e prevalência da Pso são atribuídas à falta de uniformidade metodológica dos estudos (Gudjonsson e Elder, 2007; Chua *et al.*, 2009). Epidemiologicamente é uma enfermidade comum e universal, acometendo aproximadamente 4% da população mundial e acomete igualmente homens e mulheres, sem distinção por sexo (Marques, 2009).

A imunopatogênese da Pso é complexa envolvendo queratinócitos, células do sistema imune inato como macrófagos, mastócitos, neutrófilos e células endoteliais e o sistema imune adaptativo principalmente com os linfócitos T (Sanchez, 2010). A atividade inflamatória das placas psoriásicas ocorre principalmente devido a ação de células T. Os linfócitos Th1 estão presentes nas lesões e secretam TNF- α , Interleucinas (IL) 6 e 8 (Duarte e Chehin, 2011), IFN- γ e outros fatores os quais induzem a proliferação dos queratinócitos e ajudam a manter o quadro inflamatório nas lesões (Sanchez, 2010). Recentemente, além do papel do IFN- γ e IL-12, produzidas pelas células Th1, a IL-17 produzida pelas células Th17 têm demonstrado uma função ainda mais relevante no desencadeamento de doenças inflamatórias ou autoimunes como a Pso e Artrite Psoriásica (APso), caracterizando-as como uma enfermidade mediada por células Th1/Th17 (Chan *et al.*, 2006).

Uma variedade de tratamentos está disponível para a Pso. Receptores hormonais nucleares são utilizados como alvos terapêuticos no desenvolvimento de fármacos antipsoriásicos há muito tempo (Mckay *et al.*, 1994). Embora ligantes para estes receptores, glicocorticoides, retinóides e vitamina D tenham sido comumente usados como agentes

antipsoriásicos, cada um destes apresentam efeitos adversos característicos de suas ações e o reaparecimento da Pso, consequentemente novas opções terapêuticas são necessárias que visem principalmente diminuir a recorrência da doença (Lajevardi *et al.*, 2014).

A terapêutica para Pso moderada a grave sofreu modificações dramáticas nas últimas décadas com a introdução das terapias biológicas (Saraceno, Mannheimer e Chimenti, 2008). O tratamento com anti-TNF- α tem mostrado uma maior eficácia nos vários aspectos clínicos desta doença (Clark e Lebwohl, 2008). Entretanto, entre os possíveis eventos adversos está a maior susceptibilidade para infecções graves (reativação de tuberculose latente), oportunistas e neoplasias (Mease, 2009). Outras citocinas envolvidas no desenvolvimento da Pso são a IL-12 e a IL-23, que compartilham a subunidade p40 (Lee *et al.*, 2004; Rosmarin e Strober, 2005) e, devido a isso, novos tratamentos biológicos buscaram bloqueá-las também. O anti-IL-12p40 foi o primeiro monoclonal usado e os resultados com esse novo tratamento se mostraram promissores (Toichi *et al.*, 2006) passando a ser uma opção de tratamento em 2009 (Zheng *et al.*, 2011).

Os receptores proliferadores de peroxissoma (PPARs) pertencem a uma superfamília de receptores nucleares ligante-induzível. Os PPARs possuem a capacidade de controlar a expressão de genes envolvidos na adipogênese e na inflamação (Ahmadian *et al.*, 2013). Estudos colocam em evidência a implicação de ligantes dos PPARs no controle da resposta inflamatória, na qual a sua ativação resultou na inibição da transcrição de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e TNF- α), de genes inflamatórios Ciclooxigenase 2 (Cox-2) e Óxido Nítrico (NOS) e de metaloproteinases da matriz (MMP-1 e MMP-13) (Na e Surh, 2003; Wang *et al.*, 2009).

Há evidências de um possível papel de PPARs no tratamento da Pso, uma vez que a expressão de PPAR- γ está diminuída na pele lesionada e o tratamento com agonistas do PPAR- γ reduz a hiperplasia de queratinócitos psoriásicos in vitro e in vivo (Mössner *et al.*, 2004). Assim, é importante destacar que derivados tiazolidínicos ligantes agonistas do PPAR foram implicados na inibição da produção de IL-17 e de IFN- γ pelas células T CD4+, provenientes de linfócitos retirados das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) isolados de voluntários, após estimulação com Acetato Miristato De Forbol (PMA) e Ionomicina (Iono) (Lee *et al.*, 2007; Straus e Glass, 2007; Da Rocha Junior *et al.*, 2013).

Neste contexto, as tiazolidinadionas (TZDs) ligantes sintéticos que ativam PPARs e esses receptores significativamente atenuam a expressão de citocinas pro-inflamatórias e suprimem a angiogênese em diferentes modelos de doenças inflamatórias (Jiang, Ting e Seed, 1998; Goetze

et al., 1999; Murata *et al.*, 2000), além de inibir a proliferação e promover a diferenciação em uma variedade de tecidos malignos e não malignos (Mueller *et al.*, 1998).

Este estudo visou determinar o perfil sérico de citocinas inflamatórias presentes no soro de pacientes portadores de Psoríase, bem como testar cinco novos derivados tiazolidínicos agonistas do PPAR- γ em células mononucleadas de pacientes com psoríase e observar seu potencial perfil imunomodulador.

2. Justificativa

A terapêutica atual da Psoríase tem ressalvas tanto para o paciente com alguns efeitos adversos, custo alto dos medicamentos biológicos e a taxa de recidiva ainda alta, se faz necessária a busca por novos medicamentos que possam atenuar os efeitos inflamatórios e que, por sua vez, apresentem menor remissão da doença e nenhuma limitação ou contraindicação. Podemos então observar que os agonistas do PPAR- γ constituem uma promissora classe de agentes anti-inflamatórios e imunomoduladores, podendo ser utilizados no tratamento da Pso.

3. Objetivos

3.1. Geral

Investigar a atividade imunomoduladora de novos derivados tiazolidínicos em linfócitos extraídos das PBMCs de pacientes portadores de Psoríase.

3.2. Específico

- Avaliar o perfil de citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-8, IL-9, IL-17, IL-21, IL-22, IL-27, IL-29, IL-35 e TGF- β no soro de pacientes portadores de psoríase;
- Correlacionar as citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-8, IL-9, IL-17, IL-21, IL-22, IL-27, IL-29, IL-35 e TGF- β com a gravidade do acometimento cutâneo do grupo psoríase;
- Testar a citotoxicidade de cinco novos derivados tiazolidínicos em PBMCs de voluntários saudáveis;
- Avaliar a atividade imunomoduladora dos novos derivados tiazolidínicos que não apresentem citotoxicidade em PBMCs provenientes de pacientes portadores de psoríase;

4. Revisão Bibliográfica

4.1. Aspectos Gerais

A Psoríase (Pso) é uma dermatite crônica que afeta cerca de 2-3% da população, foi notificada ainda no início do século 19, pelo físico inglês Robert Willan, e é caracterizada por uma hiper-proliferação dos queratinócitos. A Psoríase *vulgaris* é a mais comum, onde sua recorrência em relação aos outros tipos é cerca de 90%. Acomete homens e mulheres sem distinção por sexo (Schön e Boehncke, 2005).

Hoje a Pso é aceita como uma doença sistêmica, crônica, recorrente, inflamatória, mediada por células T, que envolve predisposição genética relacionada com os genes PSORS01 ao PSORS10. (Coimbra *et al.*, 2012). Além de características hereditárias para o desenvolvimento da Pso, fatores ambientais também estão implicados bem como fatores imunológicos. A doença tem a característica de ser recorrente, com remissões por determinados períodos e retornar sem motivos aparentes (Weller, 1996).

É encontrada associação da Pso com doenças como diabetes, hipertensão e doenças cardiovasculares, síndrome metabólica, dislipidemia e obesidade devido ao agravamento da produção de fatores inflamatórios, como citocinas pró-inflamatórias (Cohen *et al.*, 2007; Huerta, Rivero e Rodríguez, 2007; Johnston *et al.*, 2008; Zindanci *et al.*, 2012). Alguns medicamentos como antidepressivos, ansiolíticos, β -bloqueadores e alguns corticosteroides estão relacionados com o aparecimento e o desenvolvimento da Pso (Huerta, Rivero e Rodríguez, 2007).

Associação genética vem sendo relatada há bastante tempo. Estudos mostram que gêmeos monozigóticos apresentam maiores chances de desenvolver Pso em ambos e que indivíduos com pais e mãe psoriásicos apresentam cerca de quatro vezes mais possibilidades de desenvolverem a Pso (Farber e Nall, 1974). Foi demonstrado por (Wang, Zhang e Yang, 2001), que indivíduos com histórico familiar de Pso desenvolviam a doença mais previamente em comparação a indivíduos que não tinham registro da enfermidade na família, indicando um envolvimento genético. Foi observado também o desenvolvimento de Pso em pacientes que receberam transplante de medula óssea de pacientes portadores de Pso (Wahie *et al.*, 2006). Há associação da Pso com certos tipos do Antígeno Leucocitário Humano – HLA, sendo eles HLA-Cw6, HLA-B13, HLA-B57, HLA-B17, HLA-DRA e os indivíduos com o HLA-Cw6 apresentam 10 vezes mais disponibilidade de desenvolver Pso. Adicionalmente o HLA-Cw 0602 é o principal determinante da expressão fenotípica e vem sendo associado a um quadro clínico de Pso mais grave e agressivo (Gudjonsson *et al.*, 2006; Elder *et al.*, 2010). Estudos apontam que indivíduos

com o HLA-Cw 0602 desenvolvem a Pso até 12 anos mais cedo em relação a pacientes sem o HLA-Cw 0602 (Lu *et al.*, 2013).

O maior *lócus* de susceptibilidade para Pso, o gene PSORS1 está dentro do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) no cromossoma 6p21.3, sendo responsável por grande percentual do risco genético para a doença, aproximadamente 50% (Allen *et al.*, 2005). Além do PSORS1 existem outros nove genes numerados em sequência até PSORS10 envolvidos na patologia da doença (Duffin e Krueger, 2009).

Até então não há uma conclusão sobre o que leva ao desenvolvimento da Pso. Sabe-se que uma junção de fatores genéticos com fatores ambientais, físicos e socioculturais levam ao seu aparecimento. Logo, fatores intrínsecos e extrínsecos, bem como estresse emocional, alcoolismo, tabagismo e obesidade podem estar diretamente ligados com o desenvolvimento da Pso (Raychaudhuri e Gross, 2000). Discute-se o envolvimento da Pso com o estresse, tanto que já foi relatado que cerca de 70% de pacientes com Pso afirmaram um aumento na gravidade da doença após períodos de estresse e destes, 35% dos pacientes afirmaram o estresse como causa inicial da Pso (Zachariae *et al.*, 2004).

A ingestão de álcool vem sendo associada direta e indiretamente com a Pso. O aumento do consumo de bebidas alcoólicas leva a uma susceptibilidade a infecções e também ao maior risco de trauma mecânico devido a lesões, fatores estes que podem desencadear um quadro psoriásico (Poikolainen *et al.*, 1990). Embora tenha sido difícil fazer a correlação de ingestão de álcool e o acometimento da Pso em épocas passadas, estudos recentes indicam que há uma linha tênue entre o hábito e a doença, podendo elevar em até 8 vezes a predisposição ao desenvolvimento da Pso (Behnam, Behnam e Koo, 2005). Não só o álcool está associado com o desenvolvimento da Pso como é diferenciado pelo tipo de bebida alcoólica que é consumida. A cerveja escura mostra uma maior relação com o desenvolvimento da doença em mulheres (Qureshi *et al.*, 2010).

Há também uma associação entre o tabagismo e o aparecimento da Pso, não só em relação a quem mantinha o hábito antes do acometimento da doença, como também um aumento dose-resposta em relação ao consumo de mais de 20 cigarros por dia por pacientes portadores de Pso (Mills *et al.*, 1992). Foi demonstrado também um grande aumento no desenvolvimento da doença quando o tabagismo está associado com o consumo de bebidas alcoólicas (Higgins, Duvivier e Peters, 1994; Hayes e Koo, 2010).

4.2. Características Clínicas e Epidemiológicas

A apresentação mais comum da Pso é pelo acometimento da pele com lesões eritematosas, com descamação, bem delimitadas e de tamanho e disposição ao longo do corpo variados (Griffiths e Barker, 2007). A principal forma da Pso é de placas crônicas e estende-se por cerca de 90% dos casos, acometendo a derme do paciente com o aparecimento das placas vermelhas e descamativas e, a nível microscópico observa-se uma hiper-proliferação e diferenciação desordenadas dos queratinócitos (Johnston *et al.*, 2008).

Observa-se, então, na Pso uma acantose acentuada (aumento na espessura da epiderme) e uma paraqueratose (aumento de queratina na epiderme) acompanhados de um infiltrado de células de defesa, causando o quadro de inflamação (Harper *et al.*, 2009) (**Figura 1**).

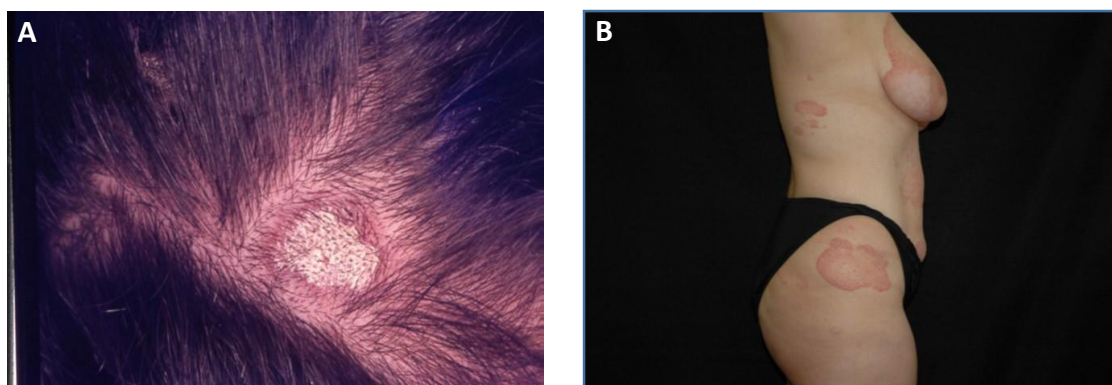


Figura 1 – Lesões Psoriásicas: A) Típica lesão psoriásica de couro cabeludo. B) Lesões psoriásicas crônicas em placas. (Naldi e Gambini, 2007).

Além do tipo “em placas” a Pso também pode se apresentar em outras formas clínicas, algumas delas raras, diferenciando entre formas de lesões e sintomas bem como as localidades. Mucosas e genitais geralmente apresentam sintomas de irritação e queimação. A forma pustulosa é uma das mais graves e mais difíceis de tratar (Prystowsky e Cohen, 1995; Ayala, 2007), geralmente é observada nas palmas das mãos e planta dos pés e, a Acrodermatite Contínua afeta principalmente os dedos e áreas ungueais. As unhas também podem ser acometidas (Cribier, 2012) e, muitas vezes associadas com artrite, é observada uma coloração amarelada (Grasland e Vinceneux, 1999; Naldi e Gambini, 2007).

De acordo com a Classificação Internacional de Doenças (International Classification of Diseases – CID10) a Pso é classificada em (Organization, 1994):

- Vulgar: lesões de tamanhos variados, delimitadas e avermelhadas, com escamas secas, aderentes, prateadas ou acinzentadas que surgem no couro cabeludo, joelhos e cotovelos;
- Pustulosa ou Generalizada: aparecem lesões com pus nos pés e nas mãos (forma localizada) ou espalhadas pelo corpo;
- Pustulosa palmar e plantar: as lesões aparecem como fissuras nas palmas das mãos e solas dos pés;
- Gutata: pequenas lesões localizadas, em forma de gotas, associadas a processos infecciosos. Geralmente, aparecem no tronco, braços e coxas (bem próximas aos ombros e quadril) e ocorrem com maior frequência em crianças e adultos jovens;
- Atrópia psoriásica: em cerca de 8% dos casos, pode estar associada a comprometimento articular. Surge ao acaso com dor nas interfalanges distais palmar e plantar e/ou nas grandes articulações como a do joelho;
- Invertida – lesões mais úmidas, localizadas em áreas de dobras como axilas, joelhos e cotovelos;
- Eritrodérmica – lesões generalizadas em 75% ou mais do corpo;
- Ungueal – surgem depressões puntiformes ou manchas amareladas principalmente nas unhas das mãos;
- Outras formas;

As variações étnicas e geográficas estão intimamente relacionadas com a prevalência da Pso. Na Europa a prevalência varia entre 0,6 a 6,5%, já nos Estados Unidos é estimada em torno de 3,15%. A África Ocidental e países ocidentais como China e Japão apresentam menos casos que os demais países da América e Europa. O Brasil apresenta uma grande incidência de casos de Pso, mas estudos apontam a miscigenação da população como facilitador (Chandran e Raychaudhuri, 2010; Porto Ferreira *et al.*, 2010). Logo, é uma doença globalizada, e a sua prevalência é estimada de zero a 3,58%, segundo localização geográfica e etnia (Gudjonsson e Elder, 2007; Chua *et al.*, 2009). Além disso, é observado que pacientes com Pso são mais propensos a desenvolver artrite, o que caracteriza a APso. Até 42% dos indivíduos com Pso podem desenvolver a APso (Carneiro, Paula e Martins, 2012).

A Pso pode acometer o indivíduo a partir da puberdade e raramente é vista acima dos 90 anos, principalmente devido à imunossenescência ou mesmo pela idade avançada, seu

aparecimento pode ocorrer ao longo de toda a vida adulta, porém há dois picos mais relacionados entre os 20 e após os 30 anos (Gudjonsson e Elder, 2007; Tollefson *et al.*, 2010).

O diagnóstico da Pso deve ser feito por médicos dermatologistas em sua especialidade, quando este observa as lesões aparentes. O método de avaliação da gravidade da doença pode ser feito pelo Índice da Área e Gravidade da Psoríase (PASI), do inglês Psoriasis Area and Severity Index (Fredriksson e Pettersson, 1978).

O PASI é um dos métodos mais utilizados para mensurar a gravidade da Pso, podendo subdividir a gravidade da doença em: Remissão ou Mínima; Leve; Moderada; Grave (Apêndice 3). Embora o PASI não avalie a saúde emocional, psicológica ou outras consequências sociais ele é um indicador de porcentagem de área corporal acometida pelas placas psoriásicas (Naldi e Gambini, 2007; Silva *et al.*, 2013).

Na década de 70 foi observado um crescente número de casos de Pso no Japão, Coréia, Cazaquistão e África Oriental, provavelmente pelo aumento do consumo de produtos industrializados e a associação deste tipo de alimentação está envolvida com alguns genes no desenvolvimento psoriásico (Eckes, Ananthakrishnan e Walter, 1975). A Pso estaria também relacionada com a mudança do estilo de vida. Na Groelândia foi observado um aumento no número de indivíduos com Pso e outras doenças após mudanças de hábitos alimentares (Kromann e Green, 1980). Na América Latina também foi observada essa tendência em países como o Brasil e a Guiana Francesa (Guillet, Strobel e Pradinaud, 1984).

Embora haja bastante avanços no esclarecimento da etiopatogenia da doença, ainda não há uma soma de fatores laboratoriais que possam caracterizar o quadro psoriásico tão bem como a avaliação das lesões psoriásicas que o paciente apresente. De antemão, é importante avaliar a velocidade de sedimentação das hemácias (VSH), pois o aumento no nível do VSH está relacionado com as doenças autoimunes como Artrite Reumatóide (Reitzenstein, Yamamoto e Mavoori, 2010; Hariharan e Kabrhel, 2011) e também com a Apso, doença a qual une o acometimento cutâneo pela Pso e o acometimento articular, presente em aproximadamente 10% dos pacientes psoriásicos (Helliwell *et al.*, 1991).

4.3. Fisiopatogenia

Na Pso há uma disfunção imunológica da pele, com mediadores inflamatórios, ativação de diversos tipos celulares como queratinócitos, linfócitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e outros. Esses mediadores desencadeiam a proliferação desordenada dos queratinócitos, ponto crucial no quadro inflamatório psoriásico (**Figura 2**) (Gudjonsson e Elder,

2007). As células de *Langerhans* são os primeiros subconjuntos de células dendríticas da derme, junto com as células T CD4+, células Th1 e Th17. Na epiderme estão principalmente as células T CD8+ e os neutrófilos (Chu, Di Meglio e Nestle, 2011). A partir do momento que ocorre algum distúrbio, endógeno, exógeno ou a soma desses fatores, nos queratinócitos e ocorre a proliferação exagerada, células dendríticas começam a trabalhar para tentar reverter o quadro recrutando as células T, que por sua vez, ao lançarem no meio citocinas inflamatórias cria um ciclo vicioso que não para facilmente, tanto a proliferação das células da derme quanto o distúrbio imunológico (Grayson, 2012)

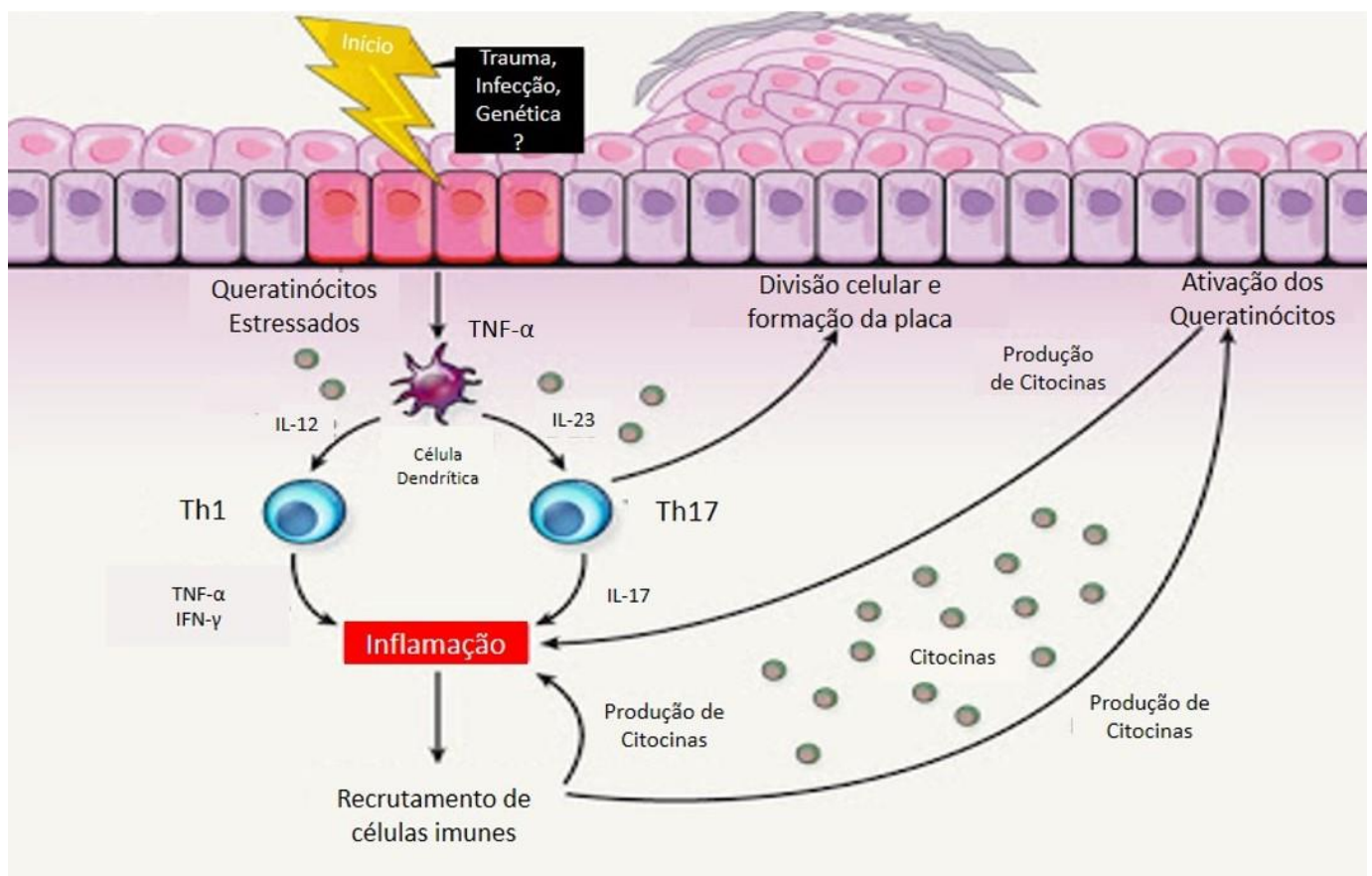


Figura 2 – Quadro inflamatório da Psoríase. Há o início da desordem epitelial por uma soma de fatores. Os queratinócitos “estressados” passam a produzir TNF-α em excesso bem como outras citocinas. Todas essas informações chegam ao Sistema Imune que então ativado tenta reverter a inflamação, tornando-se um ciclo. Adaptado de (Grayson, 2012).

Recentes estudos indicam que o sistema HLA, presente no braço curto do cromossomo 6, em todas as células do organismo, está intimamente relacionado com a ativação de células T. Uma variação na fração desse cromossoma, HLA-Cw6, relaciona-se com a predisposição para Pso em 66% dos portadores dessa variação (Swanbeck *et al.*, 1995; Bunce *et al.*, 1996; Schön e Boehncke, 2005). O alelo HLA-Cw6 está presente em 90% dos pacientes com Pso de início

precoce e 50% de início tardio e apenas em cerca de 7% da população saudável (Mak, Hundhausen e Nestle, 2009).

Há um infiltrado de células T e células dendríticas no quadro psoriásico (Mak, Hundhausen e Nestle, 2009) bem como fibroblastos (Albanesi, De Pità e Girolomoni, 2007) macrófagos, células Natural Killer (NK), neutrófilos e poucos linfócitos B (Tobin *et al.*, 2011). As células de Langherans imaturas estão presentes em grande quantidade na epiderme, assim como as células dendríticas mielóides que são derivadas de monócitos, responsáveis pela estimulação linfocitária devido a liberação de IL-12 e IL-23. As células dendríticas plasmocitóides estão presentes sintetizando e liberando grandes quantidades de IFN- γ , assim como as células NK, estimulando linfócitos T na lesão. (Chu, Di Meglio e Nestle, 2011; Lima e Lima, 2011).

Ainda não se sabe ao certo se a lesão psoriásica começa com a proliferação descontrolada dos queratinócitos ou se é devido a um distúrbio imunológico. Em pacientes psoriásicos sem lesões aparentes, observou-se um aumento de células T residentes com capacidade considerável de proliferação, fortalecendo assim a ideia do sistema imune começar agir primeiramente perante aos queratinócitos (Nickoloff, Qin e Nestle, 2007). Embora infiltrado celular conte com linfócitos TCD4+ e TCD8+, há uma predominância dos linfócitos da via Th1 nos processos patológicos da doença. As células Th1 estão responsáveis por sintetizar principalmente IFN- γ , IL-2 e IL-12, as quais podem ativar células T residentes em efectoras (Traub e Marshall, 2007).

A via dos linfócitos Th17 foi descoberta nas doenças autoimunes e logo após na Pso. Sabe-se que esta via está relacionada com o início e o agravamento da doença, sendo mediada principalmente pelas citocinas IL-17 e IL-23. Nas inflamações psoriásicas são observadas principalmente a IL-12 e a IL-23 induzindo uma resposta Th1 e Th17, respectivamente, resposta essa que faz decair a via Th2, quase não expressa na doença. O IFN- γ e a IL-12 ativam a via Th1 e a IL-17 e IL-23 são capazes de ativar as células Th17. Estas vias influenciam diretamente os linfócitos T regulatórios, mediando seu decaimento. O principal bloqueador da via Th1 é a IL-4 produzida pela via Th2, mas como esta via está subdesenvolvida na Pso, devido aos fatores das vias Th1 e Th17 em conjunto citados, a doença prolifera. O aumento na diferenciação das células em Th17 é potencializado também devido as citocinas IL-6 e TNF- α produzidas por outras células (Nickoloff, Qin e Nestle, 2007).

A IL-23 é uma citocina heterodímero da junção da IL-23p19 e a IL-12p40 e está envolvida na ativação das células Th17 na placa psoriásica. A IL-23 é capaz de induzir outras células T e queratinócitos a produzirem IL-17A, IL-29 e IL-24 (Chan *et al.*, 2006; Mak, Hundhausen e Nestle,

2009). Estudos com camundongos indicam a importância da IL-23 no desenvolvimento da Pso, uma vez que foi administrada IL-23 nesses camundongos e observada a propensão em desenvolver lesões semelhantes a Pso. Quando esses camundongos foram tratados com anti-IL-23 as lesões diminuía consideravelmente. Os efeitos do anti-IL-23 puderam ser comparados aos efeitos dos bloqueadores de TNF- α , mas sem aparente redução de IL-17 e IFN- γ (Tonel *et al.*, 2010). A importância da IL-23 no desenvolvimento das lesões (**Figura 3**) deve-se ao fato de que tanto queratinócitos quanto as células do sistema imune possuem seu receptor IL-23R (Tonel *et al.*, 2010). Em ensaios com camundongos, foram injetadas IL-17, IL-22 e IL-23 no dorso do animal e apenas aqueles que tinham IL-23 injetada desenvolveram lesões psoriásicas características, com esses dados ressalta-se o papel dominante da IL-23 ativa no desenvolvimento da doença (Rizzo *et al.*, 2011). Bloqueadores de IL-23 tem se mostrado como uma nova busca terapêutica no tratamento da Pso, com melhoras significativas de até 75% dos pacientes (Di Meglio e Nestle, 2010).

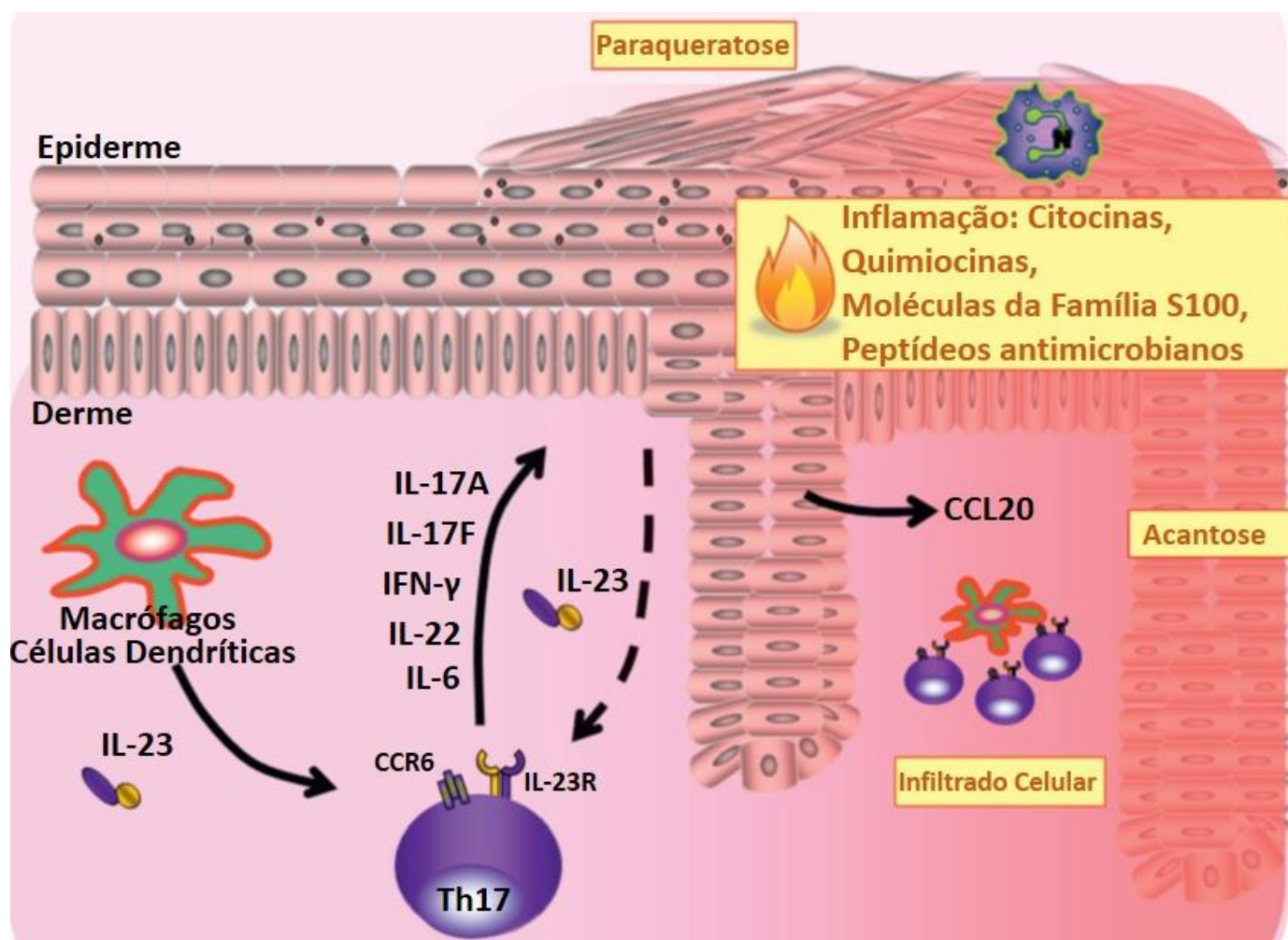


Figura 3 – O papel da IL-23 na Psoríase. A IL-23 atua no desenvolvimento da Psoríase, sendo produzida pelas Células Dendríticas e Macrófagos, estimulando a via Th17 que, por sua vez, produz diversas citocinas inflamatórias que agem diretamente nos queratinócitos. Outras células do infiltrado celular produzem mais IL-23 tornando o quadro um ciclo de produção de agentes inflamatórios. Adaptado de (Di Meglio e Nestle, 2010).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória pleiotrópica que atua em diversos tipos celulares, e em um quadro inflamatório psoriásico promove o aumento da proliferação dos queratinócitos (i) e de células endoteliais (ii) formando novos vasos capilares (Lima e Lima, 2011). O TNF- α é visto como ponto crucial no início de doenças inflamatórias, incluindo a Pso na qual observa-se células Th1 e NK como iniciais no processo inflamatório e subsequente ativação da via Th17 (Nestle, Kaplan e Barker, 2009). Esta citocina está aumentada nas lesões psoriásicas intensificando a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão e outros, como a IL-1, IL-6, IL-8, Fator de Transcrição Nuclear *kappa* B (NF- κ B) e Molécula 1 de Adesão Intercelular (ICAM) (Victor e Gottlieb, 2002).

Monócitos e queratinócitos psoriásicos são capazes de produzir IL-6 para regular e aumentar o quadro inflamatório (Neuner *et al.*, 1991) e outras citocinas, como IL-1 e TNF- α , em

maior escala, se comparado à células sadias (Mizutani *et al.*, 1997). Nos queratinócitos a síntese e liberação de IL-6 é promovida principalmente por IL-17A, IL-17F e TNF- α (Fujishima *et al.*, 2010) enquanto os monócitos são os principais secretores de IL-12, importante citocina ativadora da via Th1 (Tada *et al.*, 2006).

A IL-2 e IL-12 produzida pelas células dendríticas e monócitos contribuem para a ativação mitótica e proliferação dos linfócitos Th1. Após a ativação das células dendríticas ocorre a cascata da inflamação com diferenciação de linfócitos em Th1 e linfócitos T citotóxicos tipo 1 (Tc1) e, assim, o início do desenvolvimento da placa Psoriásica. As APCs desencadeiam a especialização de linfócitos T CD4+ e T CD8+. Esta estimulação promove a diferenciação de TCD4+ em Th1 e TCD8+ em Tc1, capazes de sintetizar e liberar outras citocinas como IL-2, TNF- α e IFN- γ . O IFN- γ inibe a apoptose dos queratinócitos e consequentemente aumenta sua proliferação e, junto com a IL-17, promovem a secreção de citocinas pró-inflamatórias pelos próprios queratinócitos como IL-6 e IL-8. A IL-6 aumenta a proliferação dos queratinócitos enquanto a IL-8, além da proliferação, aumenta também a quimiotaxia dos neutrófilos. (Lima e Lima, 2011).

A células T naïve são estimuladas pelo TGF- β , IL-6 e IL-21 com a ajuda da IL-23 ativando a via Th17. As células da via Th17 induzem a produção de IL-17A, IL-17F, IL-22 e IL-26, estas citocinas funcionam como proliferadoras dos queratinócitos e aumentando a população dessas células da pele há um maior infiltrado celular e maior inflamação. As células T regulatórias (Treg) nas doenças autoimunes controlam a proliferação e ativação das células T CD4+ e CD8+, na Pso as células Treg tem defeitos na sua função e proliferação, diminuindo sua quantidade, assim há uma maior proliferação de células CD 4 e CD8 positivas, o que aumenta a inflamação. Esse quadro de depleção de células Treg pode ter como tratamento a fototerapia. (Mak, Hundhausen e Nestle, 2009).

Estudos sugerem que a IL-22 regula a Pso inibindo a diferenciação e proliferação dos queratinócitos inibindo diferentes proteínas de proliferação (Wolk *et al.*, 2006). Complementando, outros experimentos sugerem ainda que a IL-22 e a IL-17, em cultura, são capazes de retardar e aumentar, respectivamente, a via de inflamação Ik κ /NF κ B em quantidades consideráveis, logo a IL-17 agrava o processo inflamatório e a IL-22 aparenta ter um efeito benéfico na Pso (Cho *et al.*, 2012).

A IL-9 pertence a família da IL-2 e acredita-se que sua maior função é como fator de crescimento e proliferação de células T. Ainda que suponha-se que exista a via Th9, esta citocina

pode ser produzida por células Treg e Th17 (Noelle e Nowak, 2010). Recentemente a IL-25 foi mostrada como citocina chave na indução da produção de IL-9 (Angkasekwina *et al.*, 2010).

Diversos trabalhos mostram a atuação da IL-9, que parece estar envolvida no desenvolvimento de doenças autoimunes, respiratórias e até em pacientes com diabetes devido a sua íntima relação com fatores de transcrição inflamatórios como STAT 1, STAT 3 e STAT 5 e indução da proliferação de células Th17 (Noelle e Nowak, 2010).

Na dermatite atópica a IL-9 parece estar envolvida ao induzir os queratinócitos a secretarem o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um importante carreador da angiogênese (Ma *et al.*, 2014). Um resumo da atuação das diferentes células e citocinas envolvidas no quadro psoriásico pode ser visto na **Figura 4**.

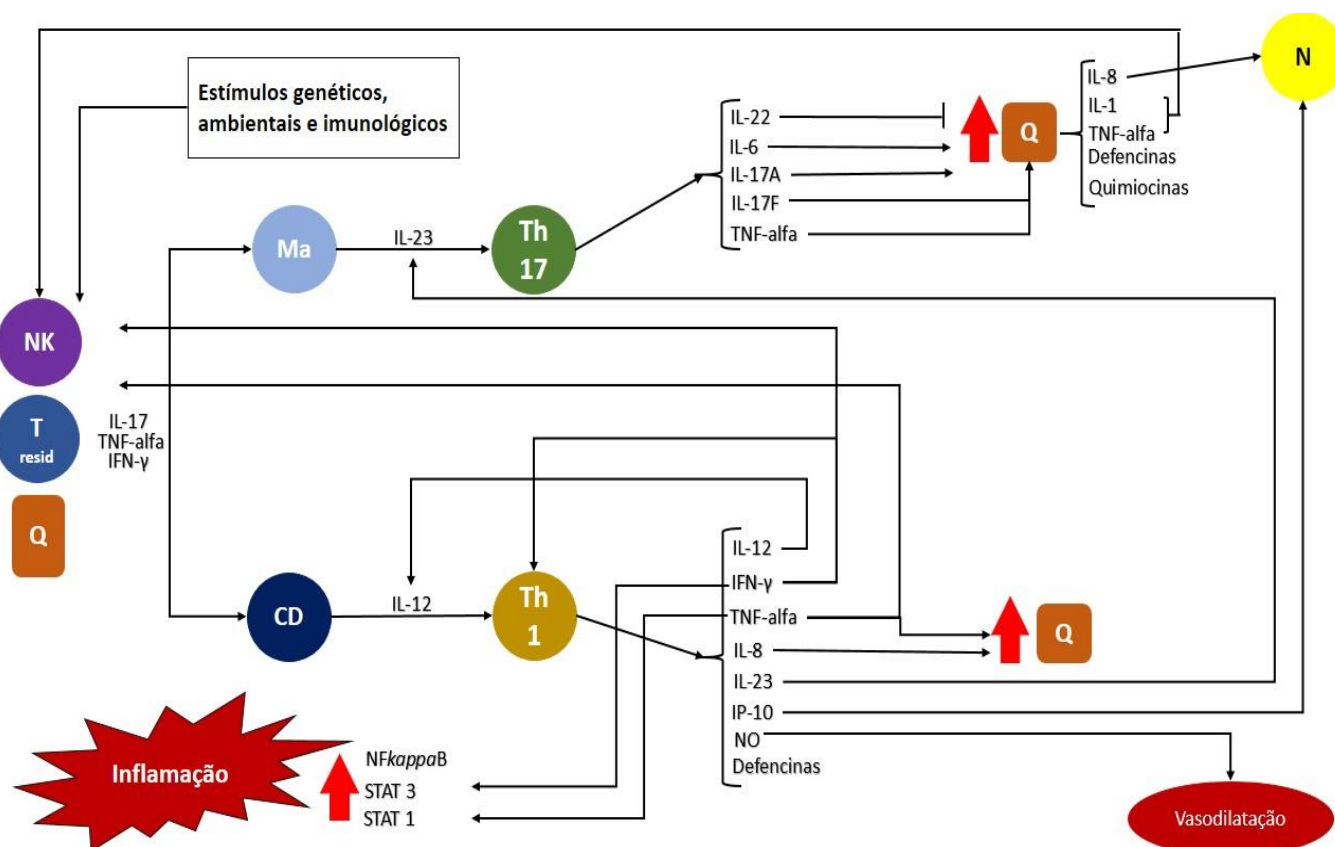


Figura 4 – Principais células e agentes inflamatórios envolvidos na Psoríase. As células Natural Killer (NK), Células T residentes (T resid.), Queratinócitos (Q) recebem estímulos no início do distúrbio psoriásico e produzem citocinas inflamatórias que induzem Macrófagos (Ma) a produzirem IL-23 e Células Dendríticas (CD) a produzirem IL-12. As células Th1 (Th1) são ativadas e produzem mais IL-12 e IFN- γ , o qual juntamente com o TNF- α induz novamente as células iniciais da inflamação com o TNF- α . O TNF- α e a IL-8 induzem a proliferação de Q. Produzem ainda IL-23 intensificando a ativação da via Th17 e IP-10 responsável por quimiotaxia e Óxido Nítrico (NO) um vasodilatador. A IL-23 induz a diferenciação de células T em Th17 que sintetizam principalmente IL-6, IL-17A, IL-17F, IL-22 e TNF- α , citocinas que intensificam a proliferação de Q. Os Q em proliferação produzem IL-1 e TNF- α que intensificam as células NK, T resid. e Q. Produzem também IL-8 e quimiocinas quimiotáticas. Elaborado pelo autor.

4.4. Tratamento

O tratamento da Pso é bastante diversificado. Antagonistas do ácido fólico são utilizados no tratamento da Pso, pois a metilação do ácido nucléico causa uma diminuição na hiperproliferação de queratinócitos. Por outro lado, a não continuidade do tratamento pode causar a recorrência da Pso (Farber e Peterson, 1961).

O tratamento da Pso inclui retinóides, metotrexato, ciclosporina, hidroxiuréia (Camisa, 1995), imunossuppressores, imunoterapia e vitamina D (Disepio e Chandraratna, 2000). O tratamento com antimalárico quando tinham seu uso interrompido apresentou em alguns pacientes a remissão rápida e mais grave em relação ao quadro anterior (Farber e Peterson, 1961). O metotrexato, ciclosporina e acitretina proporcionam um controle da doença. O metotrexato e a acitretina são usados como terapia de manutenção e a ciclosporina como medicamento intermitente. Ainda assim essas drogas possuem alguns efeitos adversos (Kurilić *et al.*, 2010).

O metotrexato é um antimetabólico análogo ao ácido fólico e sua ação mais intensa é em populações celulares em crescimento exponencial. Ele diminui a quimiotaxia dos polimorfonucleares, inibindo a inflamação cutânea, diminuindo a produção da IL-1, causando um efeito imunomodulador. Como efeito colateral existe uma mielotoxicidade, ou seja, dificuldade da medula em repor as células sanguíneas, e o comprometimento hepático com fibrose e cirrose (Gladys, Aires e Martins, 2004).

A acitretina é capaz de melhorar o quadro psoriásico, porém são observadas reações adversas (Török, Kádár e Geiger, 1989) como queilite e queda de cabelo e mais raramente hepatotoxicidade, alterações lipídicas e pancreatite (Katz, Waalen e Leach, 1999). Não está muito esclarecido como é o mecanismo de ação da acitretina na Pso, mas sabe-se que tanto ela quanto o metotrexato, por não serem imunossuppressores, podem ser usados em pacientes com imunodeficiências (Lee e Li, 2009).

Medicamentos biológicos passaram a ser usados no tratamento da Pso, principalmente os inibidores de TNF- α para aqueles pacientes que não respondiam bem ao tratamento padrão (Kemény *et al.*, 2006). Sabe-se que o TNF- α tem concentrações elevadas tanto na pele quanto na sinóvia dos pacientes com APso. Logo, medicamentos como Infliximabe, Adalimumabe e Etanercepte, que são bloqueadores seletivos do TNF- α , revelam-se eficazes no tratamento destes pacientes (Tobin e Kirby, 2005).

O Infliximabe, um anticorpo monoclonal de região constante humana e região variável de produção em murinos, é utilizado no tratamento da Pso, pois este tem afinidade pelos receptores de TNF- α . Pelo fato da Pso ser uma doença mediada por células T e o TNF- α é uma citocina chefe no desencadear da inflamação, se concretiza como uma opção de tratamento em pacientes mais graves (Clark e Lebwohl, 2008). Com esse bloqueio a célula deixa de ter o estímulo pró-inflamatório e assim não há proliferação. Embora apresente bons resultados, o Infliximabe tem reações indesejáveis como exacerbação da Pso quando em recidivas, pode ativar a tuberculose latente, indução de pitíriase liquenóide crônica e tumores (Duarte e Chehin, 2011) e comprometimento hepático (Melgaço *et al.*, 2013). Outro medicamento biológico bloqueador de TNF alfa é o Etanercepte, que quando ligado à IgG1 humana é capaz de reduzir a inflamação, porém é também um medicamento de alto custo e com reações adversas similares ao Infliximabe (Strober, 2005; Woolacott *et al.*, 2006).

O Adalimumabe é o anticorpo monoclonal totalmente humano produzido para o tratamento da Artrite Reumatóide e outras doenças autoimunes e depois como nova terapêutica para Pso (Scheinfeld, 2003). O Adalimumabe se mostra como um medicamento seguro e com boa resposta também na Apso reduzindo os sintomas cutâneos e articulares (Mease, 2005). Foi observado também o potencial do Adalimumabe em atenuar um quadro de Pso Invertida, um dos tipos de Pso mais complexos de tratar, reduzindo não só o acometimento cutâneo como articular (Ješe *et al.*, 2014). O Adalimumabe é, então, uma boa alternativa de tratamento embora o uso prolongado deste medicamento apresente um decaimento no seu efeito terapêutico (Saraceno *et al.*, 2013). Ainda assim, mesmo com uma eficácia garantida, o uso de bloqueadores de TNF- α apresentam efeitos adversos, pois estudos mostram o ressurgimento das lesões psoriásicas nos pacientes e, muitas vezes, mais fortes (Seneschal, Lepreux, Bouyssou-Gauthier, *et al.*, 2007; Seneschal, Lepreux, Milpied, *et al.*, 2007; Ubriani e Van Voorhees, 2007) bem como já foi demonstrado a trombocitopenia e neutropenia e mais raramente a eosinofilia (Malisiewicz *et al.*, 2011). O uso de medicamentos imunobiológicos podem acarretar em distúrbios eletrolíticos em pacientes com Pso (Melgaço *et al.*, 2013).

Dois citocinas muito importantes no desenvolvimento da Pso são a IL-12 e a IL-23 envolvidas nas etapas iniciais da inflamação (Nickoloff, Qin e Nestle, 2007), com isso, a terapêutica biológica começou a focar no bloqueio da subunidade p40 compartilhada por essas duas Interleucinas (Ghoreschi, Weigert e Röcken, 2007; Okamoto e Momohara, 2007). O medicamento ficou conhecido como Ustekinumabe e seu uso na Pso foi aprovado (Leman e Burden, 2012) como também em algumas outras doenças autoimunes como Artrite e doenças inflamatórias intestinais (Quatresooz *et al.*, 2012). Embora o uso do Ustekinumabe ainda seja

recente, muitas pesquisas de tratamentos biológicos já se voltam a outras citocinas. Sabe-se que na Pso além da IL-23 e IL-12, a IL-17A e a IL-22 das vias Th17 e Th22, respectivamente, também estão diretamente envolvidas e exacerbadas nesse tipo de inflamação, a IL-17A medeia, principalmente, efeitos inflamatórios sobre os queratinócitos (Lowes, Suárez-Fariñas e Krueger, 2014) e com isso a IL-17A pode sustentar a inflamação crônica da Pso fazendo uma ponte do sistema imune inato com o adaptativo (Lynde *et al.*, 2014). Quando a indução da Pso pela IL-23 não ocorreu em camundongos Knock-out para IL-17A e IL-22, ficou evidente que essas citocinas possuem um papel importante no desenvolvimento da Pso (Mitra, Fallen e Lima, 2013) assim, bloqueadores de IL-17A já estão em testes iniciais e apresentam boas respostas na redução da inflamação (Brown *et al.*, 2014).

Além de medicamentos, foi avaliado que a fototerapia pode ser um coadjuvante no tratamento da Pso, pois os pacientes mostram boas respostas principalmente diminuição das placas psoriásicas. O tratamento da fototerapia pode ser ainda intensificado se associado com a administração de vitamina D já que a síntese desta está intimamente relacionada com a epiderme, local das placas psoriásicas (Boer, Schothorst e Suurmond, 1980; Guilhou *et al.*, 1990; Zanolli, 2004; Osmancevic *et al.*, 2010). É importante comentar que a fototerapia possui diferentes meios de intervir na Pso. Pode levar a apoptose celular ou intervir na supressão das vias Th1/Th17, reduzindo a inflamação. Não está completamente elucidado por qual meio a fototerapia age, e com isso observa-se a complexidade do quadro inflamatório psoriásico (Wong, Hsu e Liao, 2013). Embora o tratamento fototerápico apresente melhoras, principalmente em associação com tratamentos biológicos, ambos possuem ressalvas a longo prazo, pois há relatos de desenvolvimento de outras doenças, tal qual o câncer de pele (Richard e Hönigsmann, 2014)

4.5.O PPAR-γ e os Derivados Tiazolidínicos

Os Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma Gama, do inglês Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR-γ) são receptores nucleares intimamente relacionados com os Receptores Retinóides (RXR) e agem a nível de transcrição nuclear (Braissant *et al.*, 1996), ou seja, quando há a transcrição do código genético, fatores anti-inflamatórios são produzidos. Existem três tipos de PPAR, α, β e γ (Chawla *et al.*, 1994) são da família de receptores nucleares de fatores de transcrição (Jiang, Ting e Seed, 1998) e são co-expressos em diversos tipos celulares, variando a concentração pelo grupo celular. O PPAR-α é mais encontrado em hepatócitos, cardiomiócitos e enterócitos. O PPAR-β por sua vez é expresso

em vários tipos celulares. O PPAR- γ é expresso principalmente no tecido adiposo e nas células do sistema imune (**Figura 5**) (Braissant *et al.*, 1996).

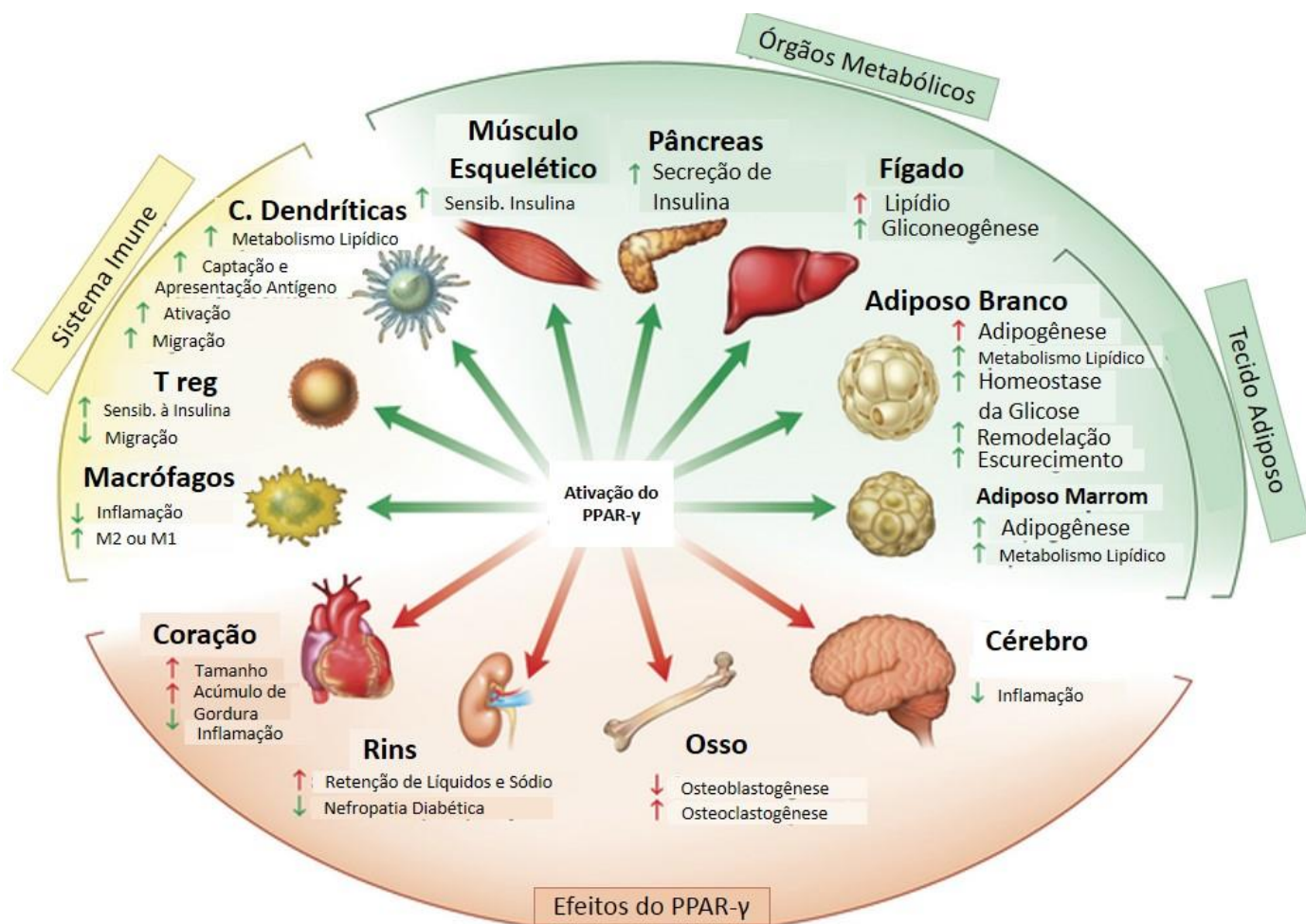


Figura 5 – Atuação do PPAR- γ . Diferentes tipos celulares em que o PPAR pode ser ativado. Uma vez no sistema imune diversos tipos celulares o apresentam, como os macrófagos e sua ativação diminui a inflamação; Células T onde observa-se também diminuição da inflamação; e em Células Dendríticas com diversas funções. Setas verdes indicam ações desejáveis e as vermelhas, ações não desejáveis em diversos tecidos do organismo. Adaptado de (Ahmadian *et al.*, 2013).

Anti-inflamatórios não esteroidais, como derivados tiazolidínicos, são potentes agonistas do PPAR- γ e são capazes de diminuir a expressão de citocinas inflamatórias produzidas por macrófagos (Jiang, Ting e Seed, 1998; Spiegelman, 1998) e outras células do sistema imune, podendo ser um potencial agente terapêutico em doenças inflamatórias (Murphy e Holder, 2000). Os agonistas do PPAR- γ agem inibindo diversas vias de inflamação, dentre elas a proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e o NF- κ B (Padilla, Leung e Phipps, 2002; Alarcón De La

Lastra *et al.*, 2004; Ban *et al.*, 2011). O NF- κ B controla a transcrição de genes de inflamação, quando no citoplasma ele é ativado desligando do seu inibidor, entra no núcleo celular e interage diretamente com o DNA em regiões promotoras (Schmid, Adler e Liptay, 1998).

Observou-se a modulação em células T, após presença de agonistas do PPAR- γ , a diminuição de IL-2 em esplenócitos (Clark *et al.*, 2000) e diminuição da produção de IL-4 por células T CD4+ (Chung, Kang e Kim, 2003), e o potencial imunomodulador dos agonistas do PPAR- γ na sinóvia de pacientes portadores de Artrite Reumatoide podendo diminuir a expressão de diversas citocinas pró-inflamatórias (Ji *et al.*, 2001).

Os derivados tiazolidínicos, ligantes sintéticos do PPAR- γ , suprimem a resposta proliferativa de células T *in vitro* e atenuam a produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células do sistema imune, podendo melhorar uma variedade de condições inflamatórias como aterosclerose, artrite reumatoide e outras doenças com características de atuação autoimune (Yuan *et al.*, 2004).

O PPAR- γ é expresso nos linfócitos T humanos e agonistas do PPAR- γ melhoram o quadro clínico e histopatológico de doenças inflamatórias como a esclerose múltipla, pois em modelos de camundongo e em cultura de PBMCs de pacientes com esclerose múltipla, alguns derivados tiazolidínicos testados mostraram potencial na inibição de citocinas inflamatórias como IFN- γ e TNF- α , como também suprimiu a proliferação de células T (Schmidt *et al.*, 2004).

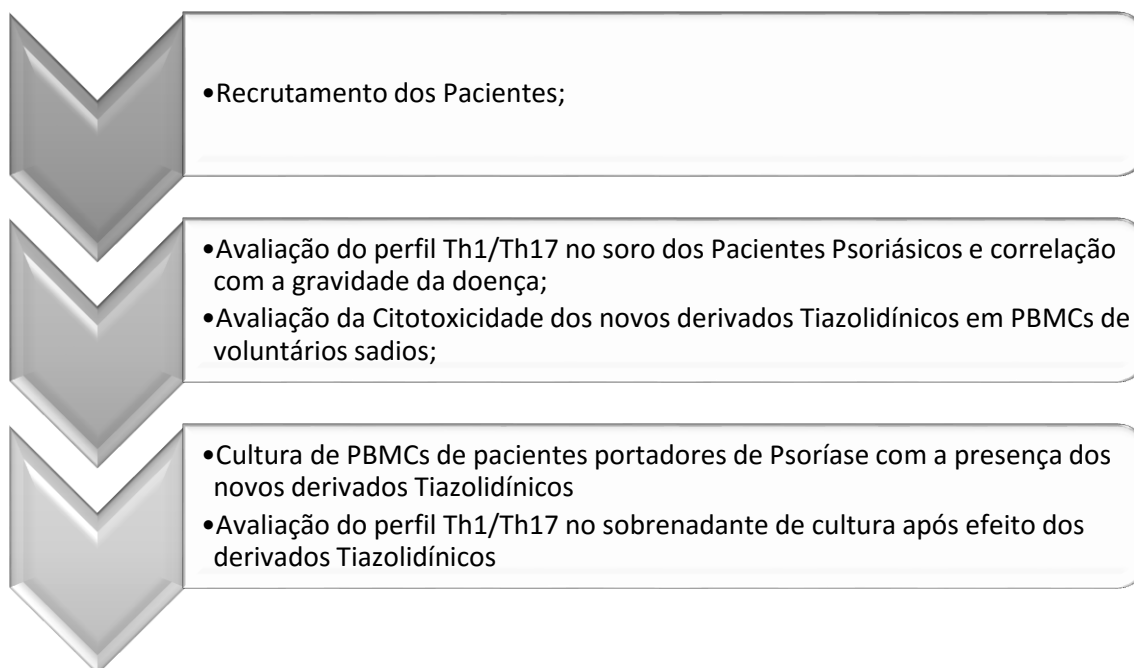
Em doenças inflamatórias mediadas por células Th17 foi constatado o potencial dos agonistas dos PPAR- γ em inibir a diferenciação dessas células, ou seja, não deixando células T CD4+ tornarem Th17 e com isso a inflamação mediada seria reduzida em doenças autoimunes ou inflamatórias (Klotz *et al.*, 2009). Em ensaios com PBMCs de pacientes com Artrite Reumatóide, um derivado tiazolidínico, o TM17, foi capaz de diminuir a produção de citocinas inflamatórias como IL-17A, IFN- γ e IL-22, e em esplenócitos além destas, foi observada também a redução da IL-6 (Da Rocha Junior *et al.*, 2013).

Os principais agonistas do PPAR- γ conhecidos e no mercado são a Pioglitazona, Rosiglitazona, Troglitazona, Ciglitazona e GW7845. Os estudos confirmam sua atividade anti-inflamatória uma vez que puderam reduzir a produção de citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-1, genes inflamatórios como NOS e COX-2, bem como metaloproteínases de matriz MMP-1 e MMP-13 (Lima *et al.*, 2013). A Troglitazona é a droga pioneira das tiazolidinadionas, mas seu uso foi proibido em alguns países, como Estados Unidos, devido a uma potente hepatotoxicidade. A Rosiglitazona e a Pioglitazona são outros derivados em circulação no mercado e são aprovadas pelo Food and Drug Administration (FDA), utilizadas no tratamento da diabetes tipo 2, em

associação ou em monoterapia, a depender do quadro do paciente (Sood, Colleran e Burge, 2000). Em estudos clínicos com pacientes Psoriásicos, a troglitazona se mostrou atuante e foi capaz de reduzir placas psoriásicas de pacientes em quadro avançado (Ellis *et al.*, 2000) e em pacientes com Artrite Psoriásica a Pioglitazona mostrou uma boa resposta em 10 pacientes, reduzindo o PASI em 38% e a dor e inchaços da Artrite Psoriásica também foram diminuídos (Bongartz *et al.*, 2005).

5. Metodologia

5.1. Delineamento do Estudo



5.2. Tipo de Estudo

Para as avaliações séricas o tipo de estudo foi observacional, do tipo analítico transversal. O estudo realizado foi do tipo experimental randômico para as análises dos compostos derivados tiazolidínicos.

5.3. Métodos

5.3.1. Pacientes

Foram selecionados 44 pacientes sem distinção de gênero, com idades acima de 18 anos que foram atendidos no Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, com diagnóstico de Pso. 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). Uma via do TCLE ficou sob posse do paciente e a segunda via com a equipe de pesquisadores. Para participar da pesquisa os voluntários deveriam ter a doença ativa e não poderia estar em uso de nenhum medicamento imunossupressor e tampouco ter acometimento articular, o que poderia ser indício de APso. O grupo controle consistiu de 24 indivíduos do sexo feminino, escolhidas ao acaso, sem uso de medicamentos imunossupressores ou doenças reumatológicas.

5.3.2. Coleta de sangue

Para este estudo foi necessário coletar amostras do sangue periférico dos pacientes. Foi coletado cerca de 10-15ml de sangue em tubo contendo o anticoagulante heparina e/ou tubo seco com ativador de coágulo. As coletas foram feitas pelo mestrando, capacitado, treinado para reduzir os riscos ao paciente. Nenhuma coleta foi realizada sem a autorização prévia dos voluntários. Para isso, membros da equipe apresentaram aos pacientes o objetivo do estudo e o interesse da sua participação.

5.3.3. Cultura de células

As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram isoladas a partir do sangue de doadores sadios por centrifugação com Ficoll Paque Plus™ (GE Healthcare Bio-Sciences), exclusivo para separação de linfócitos. As PBMCs isoladas foram cultivadas (10e6 células/1000μL) em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com L-Glutamina, 10% de Soro Bovino Fetal (Lonza), 10mM de HEPES (4-(2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid) (Gibco) e 200 U/mL de Penicilina/Estreptomicina (Gibco). Estas células foram cultivadas em estufa de CO₂ 5% a 37°C por 48 horas. As células foram estimuladas, ou não, com PMA (Sigma) + Ionomicina (Sigma).

5.3.4. Determinação de citocinas

As citocinas presentes no sobrenadante de cultura e no soro dos pacientes e dos controles foram quantificadas por teste imunoenzimático ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) do tipo sanduíche, seguindo as informações recomendadas pelos fornecedores. As citocinas avaliadas foram: IFN-γ, TNF-α e IL-6 (BD Biosciences); IL-1β, IL-8, IL-9, IL-17, IL-21, IL-22, IL-27, IL-29, IL-35 e TGF-β (EBiosciences).

5.3.5. Teste de citotoxicidade dos Novos derivados Tiazolidínicos em PBMCs

Os testes foram realizados com cinco novos derivados tiazolidínicos, sendo eles o 5-(3,5-dimetoxi-benzilideno)-3-(4-nitro-benzil-tiazolidina-2,4-diona) (LPSF-SF-33); 3-(4-nitro-benzil)-5-(4-piperidin-1-il-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF-SF-34); 3-(4-nitro-benzil)-5-(4-Piridin-2-il-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF-SF-35); 3-(4-nitro-benzil)-5-(4-Pirrolidin-1-il-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF-SF-37); 3-(4-nitro-benzil)-5-(4-pirrolidin-4-il-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF-SF-38). A **Figura 6** mostra a estrutura química dos compostos testados.

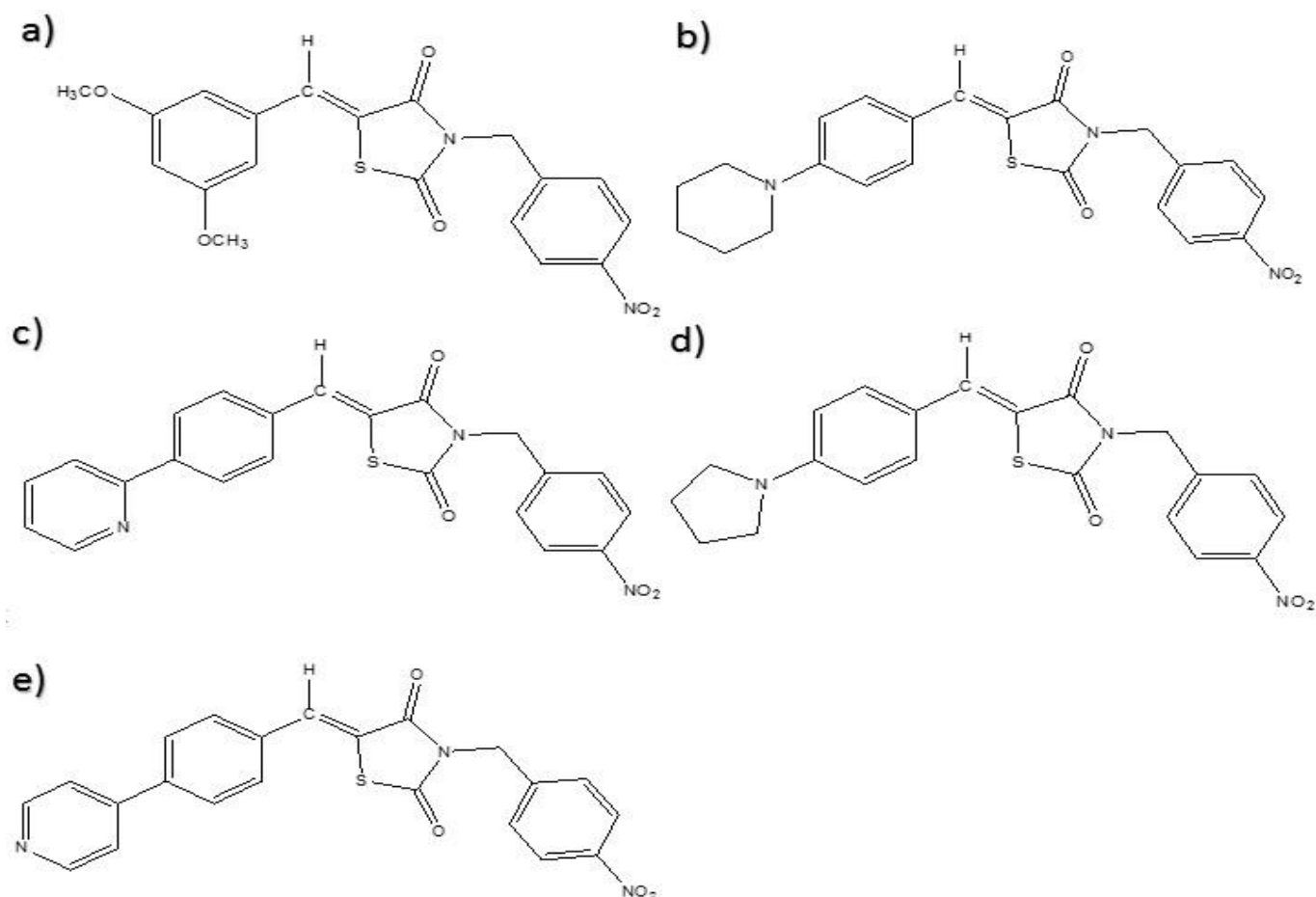


Figura 6 – Estrutura química dos compostos LPSF-SF-33 (a), LPSF-SF-34 (b), LPSF-SF-35 (c), LPSF-SF-37 (d) e LPSF-SF-38 (e). Todos apresentam o anel tiazolidina-2,4-diona.

O teste de citotoxicidade, para avaliação da atividade anti-inflamatória dos derivados tiazolidínicos, foi realizado em PBMCs, quantificada pelo método MTT – brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio. Para tal estudo, as amostras foram feitas em triplicata. Com o auxílio da câmera de Neubauer foi realizado o ajuste celular para 1×10^6 células/mL e, foram adicionados os derivados tiazolidínicos nas diferentes concentrações de 1, 10, 50 e 100 μ M. Após 48 horas em estufa a 5% de CO_2 a 37°C, foram adicionados 20 μ L da solução de MTT 0,5mg/mL, e incubado por 3 horas na estufa. Em seguida, foi adicionada a solução de SDS 20% para dissolução do precipitado. A absorbância foi lida em espectrofotômetro de placa a 570nm, após 24 horas ou até que não houvesse mais precipitado. Quanto mais intensa fosse a coloração azulada, mais MTT fora convertido e, conseqüentemente, mais células estão viáveis demonstrando menor ou nenhuma citotoxicidade do composto testado.

5.3.6. Avaliação da ação imunomoduladora dos Novos Derivados Tiazolidínicos

As células retiradas dos pacientes psoriásicos foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 10mM de HEPES (4-(2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid) (Gibco) e 200 U/mL de Penicilina/Estreptomicina (Gibco). Estas células foram cultivadas em estufa de CO₂ 5% a 37°C por 48 horas na presença ou ausência de SF-33, SF-34 e SF-35 nas concentrações de 10, 50 e 100µM para o SF-33, e 10 e 50µM para os outros. Metilprednisolona (Pfizer) em 100µM foi utilizado como um controlo positivo. Após as 48 horas em estufa de CO₂, o sobrenadante da cultura de cada poço foi aliquoteado, identificado e estocado para as dosagens das citocinas, as quais foram determinados por Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), seguindo as instruções do fabricante. Foram dosadas a IL-6 (BD Bioscience), IL-22 e IL-17A (eBiosciences). Os limites inferiores de detecção para cada kit foram 4,6875 pg / ml para IL-6 humana; 15.625 pg / ml para IL-17A; e 7,8125 pg / ml para IL-22 humana.

5.3.7. Estatística dos resultados

Para a Idade, PASI e demais dados clínicos dos pacientes Pso foram utilizados média e desvio padrão. O teste de Mann-Whitney foi utilizado nas comparações séricos dos níveis de citocinas do Grupo Psoríase (GPso) e Grupo Controle (GC). O teste de correlação de Pearson foi utilizado para correlacionar os níveis de citocinas com a gravidade do PASI. O r^2 foi utilizado na equação da reta.

Foi utilizado o teste ANOVA na dosagem das citocinas em cultura na presença dos compostos LPSF-SF-33, LPSF-SF-34 e LPSF-SF35. Para comparar a amostra de estímulo com a amostra em adição do composto foi utilizado o teste de Wilcoxon. Para essas amostras também foram utilizadas a mediana, máxima e mínima com margem de erro de 5%.

Para facilitar o entendimento o valor de P foi representado nos gráficos de acordo com o seguinte quadro (Quadro 1).

Quadro 1. Representação gráfica do valor de P.

Valor de P	Representação
P > 0,01	*
P > 0,001	**
P > 0,0001	***
P < 0,0001	****

5.3.8. Considerações éticas

O Projeto foi submetido e aprovado no COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS – 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.

6. Resultados

6.1. Avaliação clínica dos pacientes portadores de Psoríase e seleção dos controles

Os pacientes psoriásicos do Ambulatório de Reumatologia e Psoríase do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, atendidos por médicos do grupo de pesquisa e não estavam sob uso de medicamentos imunossupressores. Como forma de classificar a Pso o PASI foi utilizado como método padrão e os grupos divididos entre leve, moderado e grave. Na avaliação dos pacientes selecionados para a pesquisa a ficha clínica continha um questionário sobre os medicamentos tomados pelos mesmos, mas não foi encontrada qualquer reação que desencadeasse o quadro psoriásico.

Foram recrutados 44 pacientes com média de idade do grupo $50,4 \pm 12,6$ anos (mais jovem com 18 anos e 76 a idade mais avançada), o PASI dos pacientes ficou com média $16,2 \pm 8,6$ e tivemos pacientes nos três grupos de classificação, sendo 15 no grupo Leve PASI $8,3 \pm 1,1$. O grupo Moderado com 17 pacientes PASI $14,7 \pm 2,7$. Por fim o grupo Grave com 12 pacientes e PASI $28,3 \pm 5,5$. A velocidade de sedimentação das hemácias (VSH) também foi avaliada no grupo psoriásico e a média dos valores de hemossedimentação foi $18,7 \pm 4,7$.

Referente à classificação de gênero tivemos mais pacientes no grupo masculino, foram 24 pacientes com idade média 48 ± 13 anos, PASI $16,8 \pm 8,3$ e VSH $17,8 \pm 12,7$. O grupo masculino teve pacientes nas três classificações de PASI: Leve $8,1 \pm 1,2$; Moderado o PASI foi de $14,5 \pm 2,8$; E o grupo Grave com PASI $26,9 \pm 4,3$.

O grupo psoriásico feminino consiste de 20 mulheres com média de idade $53,3 \pm 11,7$ anos, PASI $15,6 \pm 9,2$ e VSH $19,6 \pm 12,8$. Obtivemos mulheres com as três classificações do PASI, assim como o grupo masculino, sendo: Leve $8,5 \pm 1,2$; Moderado $14,9 \pm 2,8$; e o PASI Grave $31,2 \pm 7,3$.

O grupo controle consiste de 24 voluntárias mulheres, saudáveis que aceitaram participar da pesquisa, com média de idade $34,5 \pm 10,8$ anos. Não apresentavam nenhuma doença reumatológica ou Pso, bem como Hipertensão ou doença cardiovascular, diabetes, tireoide ou endocrinopatias, tampouco estavam sob uso de medicamentos imunossupressores.

A **Tabela 1** interpreta o valor do PASI dos pacientes nos grupos masculino e feminino.

Tabela 1 – Valores do PASI dos pacientes com Pso

PACIENTES COM PSO		
	Masculino	Feminino
N	24	20
IDADE	48±13	53±12
PASI		
LEVE	8,1±1,2	8,5±1,2
MODERADO	14,5±2,8	14,9±2,8
GRAVE	26,9±4,3	31,3±7,3

6.2. Artigo 1: New thiazolidinediones derivative and this immunomodulatory effect in PBMCs of patients with Psoriasis

Sugestão de revista a ser publicado: European Journal of Clinical Pharmacology

Fator de Impacto: 2,741

Resumo

A psoríase afeta cerca de 2-3% da população. Esta doença é uma dermatite crônica, recorrente e tem envolvimento inflamatório mediado por células T. A apresentação mais comum da psoríase é o envolvimento da pele com placas eritematosas bem definidas, escamosas, de posição e tamanhos variados. Na placa psoriásica há uma disfunção imunológica que envolve vários tipos celulares e mediadores inflamatórios, como citocinas, tal qual IL -17A. Estuda-se uma atividade imunomoduladora dos derivados tiazolidinadionas (TZD). Esta classe de medicamentos tem uma possível ação anti-inflamatória, e pode ser capaz de reduzir as lesões de psoriásicas. Portanto, decidiu-se estudar três novos derivados TZD em células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) de pacientes com psoríase. Depois da confirmação da estrutura química, os compostos LPSF-SF-33, LPSF-SF-34 e LPSF-SF-35 foram adicionados em cultura de PBMC estimuladas ou não com PMA/Iono. Após 48h o sobrenadante destas culturas foram utilizados para a avaliação da IL-17A, IL-22 e IL-6. O LPSF-SF-33 mostrou uma boa atividade imunomoduladora, reduzindo os níveis de IL - 17A e IL - 22 no sobrenadante de cultura em comparação com a estimulação por PMA/Iono. O LPSF-SF-34 mostrou bons resultados de inibição de IL-17A e IL-22 e ainda em todas as doses foi mais eficaz do que a metilprednisolona, droga padrão, na redução da IL-22. O composto do LPSF-SF-35 diminuiu a produção de IL-17A e IL-22 e também foi capaz de diminuir a produção de IL-6 quando comparado com PMA/Iono. Em conclusão, os estes novos derivados tiazolidínicos são capazes de inibir a produção de IL-17A, IL-22 e IL-6 em doses diferentes e o efeito pode indicar melhoria da inflamação.

Palavras chave: Psoríase, Tiazolidinadionas, Citocinas, Inflamação

New thiazolidinediones derivative and this immunomodulatory effect in PBMCs of patients with Psoriasis

Pablo Ramon Gualberto Cardoso¹, Emerson de Andrade Lima^{1,2}, Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo¹, Michelly Cristiny Pereira¹, Marina Rocha Galdino Pitta¹, Mariana de Andrade Lima², Maria do Carmo Alves de Lima³, Ivan da Rocha Pitta¹, Ângela Luzia Branco Pinto Duarte², Maira Galdino da Rocha Pitta^{1*}

1. Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), Núcleo de Pesquisa em Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas Suely Galdino (Nupit SG), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil.
2. Hospital das Clínicas, (UFPE), Recife, Brazil.
3. Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, UFPE, Recife, Brazil.

*Address correspondence to Prof. M.G.R. Pitta, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Centro de Ciências Biológicas, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (Nupit SG), Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife – PE, 50670-901, Brazil. E-mail: mgrpitta@gmail.com

Abstract

Introduction: Psoriasis affects about 2-3% of the population. This is a chronic dermatitis, recurrent and inflammatory disease mediated by T cells. The most common presentation of psoriasis is skin involvement with well-defined and demarcated erythematous plaque, scaly, and random position in the patient's body. In psoriatic plaque, there is an immune dysfunction involving many cell types and inflammatory mediators such as cytokines like IL-17A. There is an immunomodulatory activity of thiazolidinedione derivatives. This class of drugs has a possible anti-inflammatory action, may be able to mitigate the psoriatic lesions.

Objectives and Methods: Therefore, we decided to study three new TZD derivatives in PBMC of patients with Pso. After chemical structure confirmation, the thiazolidinedione derivatives LPSF-33, LPSF-34 and LPSF-35 were prepared in culture of PBMC, stimulated or not with PMA / Iono. After that, the supernatant of these cultures were used for IL-17A, IL-22 and IL-6 evaluation.

Discussion: The three new TZDs tested were able to reduce the expression of IL-17A and IL-22 at different doses compared to PMA/Iono, but only LPSF-SF-35 was able to reduce a significant IL-6 levels. The compounds differ in their molecular structure that is added by the radical and perhaps the LPSF-SF-35 has been better because in its final structure it features a pyridine.

Conclusion: The new thiazolidinedione derivatives LPSF-SF-33, LPSF-SF-34 and LPSF-SF-35 are capable of inhibiting the production of IL-17A, IL-22 and IL-6 at different doses and the effect may indicate improvement in inflammation.

Key words: Psoriasis, Thiazolidinediones, Cytokines, Inflammation

Introduction

Psoriasis (Pso) is a chronic dermatitis that affects about 2-3% of the population, today Pso is accepted as a chronic, recurrent, inflammatory disease mediated by T cells, with a certain genetic predisposition (Coimbra *et al.*, 2012). Apart from hereditary characteristics, environmental and immunological factors are also involved in disease onset. The Pso is a recurrent disease can stay in a latent phase and appear in another moment in the patient. (Weller, 1996).

About 70% of patients with psoriasis have a worsening state under periods when subjected to stress, that implies the involvement of the disease with psychological characteristics (Zachariae *et al.*, 2004). The most common presentation of psoriasis is skin involvement and size with well-defined, scaly erythematous, and can appear on any area of the body, this form is found in 90% of cases (Griffiths e Barker, 2007; Johnston *et al.*, 2008).

There is an immune dysfunction in psoriatic plaque involving many cell types and inflammatory mediators such as cytokines. These cytokines increase keratinocyte proliferation and recruitment of T cells. Recruited lymphocytes keeps local inflammation. Th1 and Th17 cells are the most involved in this process. (Gudjonsson e Elder, 2007; Chu, Di Meglio e Nestle, 2011). Monocytes and keratinocytes are responsible for releasing the middle IL-12 and IL-23 by stimulating the recruitment of lymphocytes (Chu, Di Meglio e Nestle, 2011; Lima e Lima, 2011). The inflammatory infiltrate consisting of CD4 + and CD8 + T cells. Th1 are primarily responsible for synthesizing IFN- γ , IL-2 and IL-12, which can activate resident T cells into effector (Traub e Marshall, 2007). The Th17 pathway was first observed in the autoimmune diseases. Subsequent research showed the involvement of these cells in Pso. It has known that this pathway is related to the onset and aggravation of the disease, being primarily mediated by the cytokines IL-17 and IL-23. Although increasing Th17 differentiation are IL-6 and TNF- α cytokines produced by other cells (Nickoloff, Qin e Nestle, 2007).

Thiazolidinediones (TZD) derivatives as Pioglitazone and Rosiglitazone are able to decrease the rate of apoptosis of T cells as well as decreased activation of NF κ B (Ban *et al.*, 2011; Kutsenko, Vesnina e Kařdashev, 2012). A new TZD derivative TM17 has been shown to be inhibit IL-6, IFN- γ and IL-17 in PBMC from patients with rheumatoid arthritis and in splenocytes from mouse BALB/c culture, thus indicating a potential imunomodulador effects of these derivatives (Da Rocha Junior *et al.*, 2013). There is evidence of a potential role in the treatment of Pso with PPARs since the expression of PPAR is decreased in the damaged skin, and treatment with PPAR

agonists reduces the hyperplasia of psoriatic keratinocytes *in vitro* and *in vivo* (Mössner *et al.*, 2004).

Methylprednisolone was used as a control drug, because their anti-inflammatory activity are known. The Methylprednisolone was able to reduce the inflammation of the synovium of patients with rheumatoid arthritis (Ostergaard *et al.*, 1996) has also shown significant results in psoriasis treatment (Ruzicka, 2006). Although used in many types of diseases has anti-inflammatory action, anti-allergic and immunosuppressive, sometimes the adverse effects of methylprednisolone are greater than the benefits, and there is a time limitation of drug use (Tęsiorowski *et al.*, 2013).

Materials and Methods

Compounds

We tested *in vitro* the viability and immunomodulatory capacity of three new TZD derivatives, they are 5-(3,5-Dimethoxy-benzylidene)-3-(4-Nitro-Benzyl-Thiazolidine-2,4-dione) (LPSF-SF-33), 3-(4-Nitro-benzyl)-5-(4-Piperidin-1-yl-benzylidene)-Thiazolidine-2,4-dione (LPSF-SF-34) and 3-(4-Nitro-benzil)-5-(4-Pyridin-2-yl-benzylidene)-Thiazolidine-2,4-dione (LPSF-SF-35). The compounds are from Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos from Universidade Federal de Pernambuco, UFPE.

Pso Patients and health volunteers

Patients with Pso (n=19) were recruited from Rheumatology Division at Hospital das Clínicas - Universidade Federal de Pernambuco according to the Ethics Committee for Research in Human. Demographic and clinical aspects were collected from all patients by questionnaire and from hospital records. Patients were included after evaluation with the Psoriasis Area Severity Index (PASI). Patients and controls were asked about the presence of rheumatic diseases, cardiovascular, endocrine and thyroid diseases. Those who presented some of these were not selected for the study. Were also asked about treatment with immunosuppressive drugs, which would be an exclusion factor. Three patients healthy volunteers were selected for the cytotoxicity test (n = 3). Peripheral blood samples were obtained from patients and healthy volunteers. All patients were submitted to agree with the search for the term of free and informed consent to the procedures which would be made in accordance with the rules of the Center for Health Sciences Ethics Committee. The peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from studies subjects by centrifugation on Ficoll Paque™ Plus (density 1.077 g/ml -GE Healthcare Bio-Sciences). Then, the PBMCs were resuspended in RPMI 1640 medium

(Gibco) supplemented with L-Glutamine, 10% Fetal Serum Bovino (Gibco), 10 mM HEPES (4 - (2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (Gibco) and 200 U/mL penicillin/streptomycin (Gibco). The cell viability determined by trypan blue 0.4%. The samples were only used when viability was upper than 98%.

MTT assay

The PBMCs from health donors were incubated in the presence of four different concentrations (1, 10, 50 and 100 μ M) of the compounds SF-33, SF-34 and SF-35 for 48 hours. Then cytotoxicity was quantified by the ability of living cells to reduce MTT to a purple compound. The compounds were tested in three independent assays and at the end of incubation wells were centrifuged and the medium was replaced by medium without compound (150 μ L) containing MTT (0.5mg/mL). Three hours later the MTT formazan was diluted with 100mL of 20% SDS and its absorbance measured (570nm) by the apparatus (BioTek EL808 ®). The cytotoxic activity was quantified as the percentage of control absorbance. In this sense, the absorbance of the SF-33, SF-34 and SF-35 treated group was obtained in relation to vehicle-treated control group. In all analyzed experiments, the vehicle (DMSO 0.1%) treated group presented viability upper than 90% compared to cells control without vehicle.

PBMCs cultures

PBMC (1 x 10⁶cell/ml) were cultured in RPMI-1640 (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco), HEPES 10 mM (Gibco) and penicillin (10.000 U/ml) /(streptomycin 10.000 μ g/ml) (Gibco). Cells were stimulated with PMA (Sigma) + Ionomycin (Sigma) in the presence or absence of SF-33, SF-34 and SF-35 at concentrations of 10, 50 and 100 μ M for SF-33 and 10 and 50 μ M for the others. Methylprednisolone (Pfizer) at 100 μ M was used as a positive control. Cells were incubated for 48hours at 37°C in humidified 5% CO₂ incubator.

Cytokine titration

Cytokines of cultures supernatants were determined by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) kits according to the manufacturer's instructions. In culture supernatants from PBMCs: IL-6 (BD Bioscience) IL-22 and IL-17A (eBiosciences). The lower limits of detection for the ELISA analyses were as follows: 4.687 pg/ml for human IL-6; 15.625 pg/ml for human IL-17; and 7,812 pg/ml for human IL-22.

Statistical analysis

All experiments were performed at least three times before the independent statistical analysis and the results of univariate comparisons were analyzed using nonparametric tests (Wilcoxon matched pairs test) with $p < 0.05$ being considered as a significant difference. All quantitative data were plotted with GraphPad Prism 6.01 software. The graphs were plotted with median, maximum and minimum.

Results

The synthesis of the compounds was carried out using the same products, with their modified structures at different stages of the synthesis. **Figure 1A** shows the synthesis route of the compounds SF-33, SF-34 and SF-35. The molecular structures of compounds are shown in **Figure 1B, C and D**.

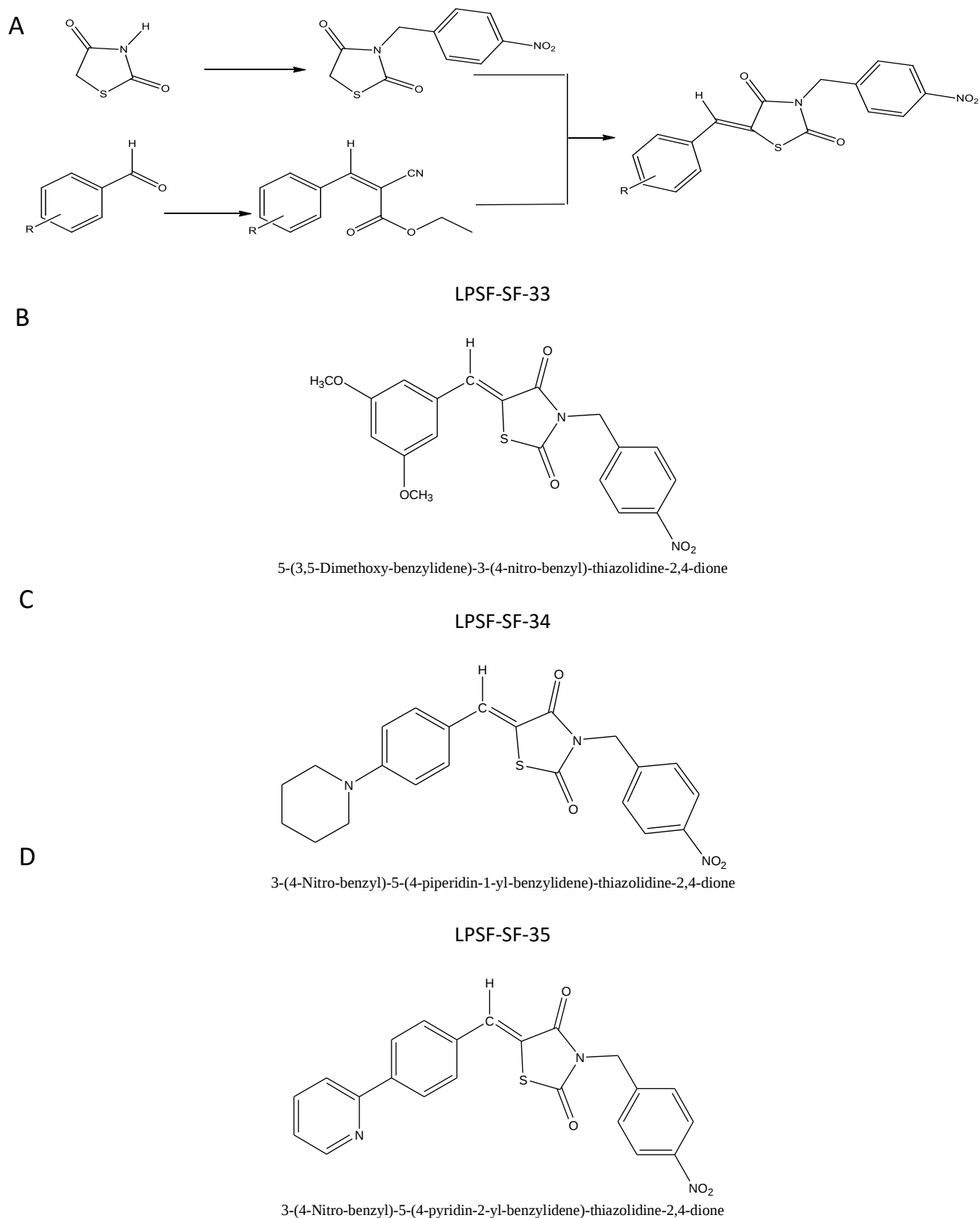


Figure 1. Synthesis route and Molecular Structures of Compounds LPSF--SF-33, LPSF-SF-34 and LPSF-SF-35. A) Synthesis route. B) LPSF-SF-33. C) LPSF-SF-34. D) LPSF-SF-35.

After the synthesized compounds, we evaluated the cytotoxicity of these compounds in healthy volunteers to confirm drug selectivity. We tested four different concentrations (1, 10, 50 and 100 μ M) of the compounds. The LPSF-SF-33 showed negative results of cytotoxicity for all four doses. The LPSF-SF-34 and LPSF-SF-35 compounds had less than 90% of viability at the dose of 100 μ M and thus this dose was not used in the culture.

The PBMCs purified from Pso patients following stimulation with PMA/Iono were treated with different compounds doses and with methylprednisolone as the standard drug. Figure 2 shows a decline on cytokine IL-17A, IL-22 and IL-6 production after treatment with LPSF-SF-33, LPSF-SF-34 and LPSF-SF-35 compounds. There was a significant decrease in IL-17A, IL-22 and IL-6 levels with SF-33, SF-34 and SF-35 in a concentration dependent manner comparing with PMA and Ionomycin and with metilprednisolone treatment (**Figure 3**).

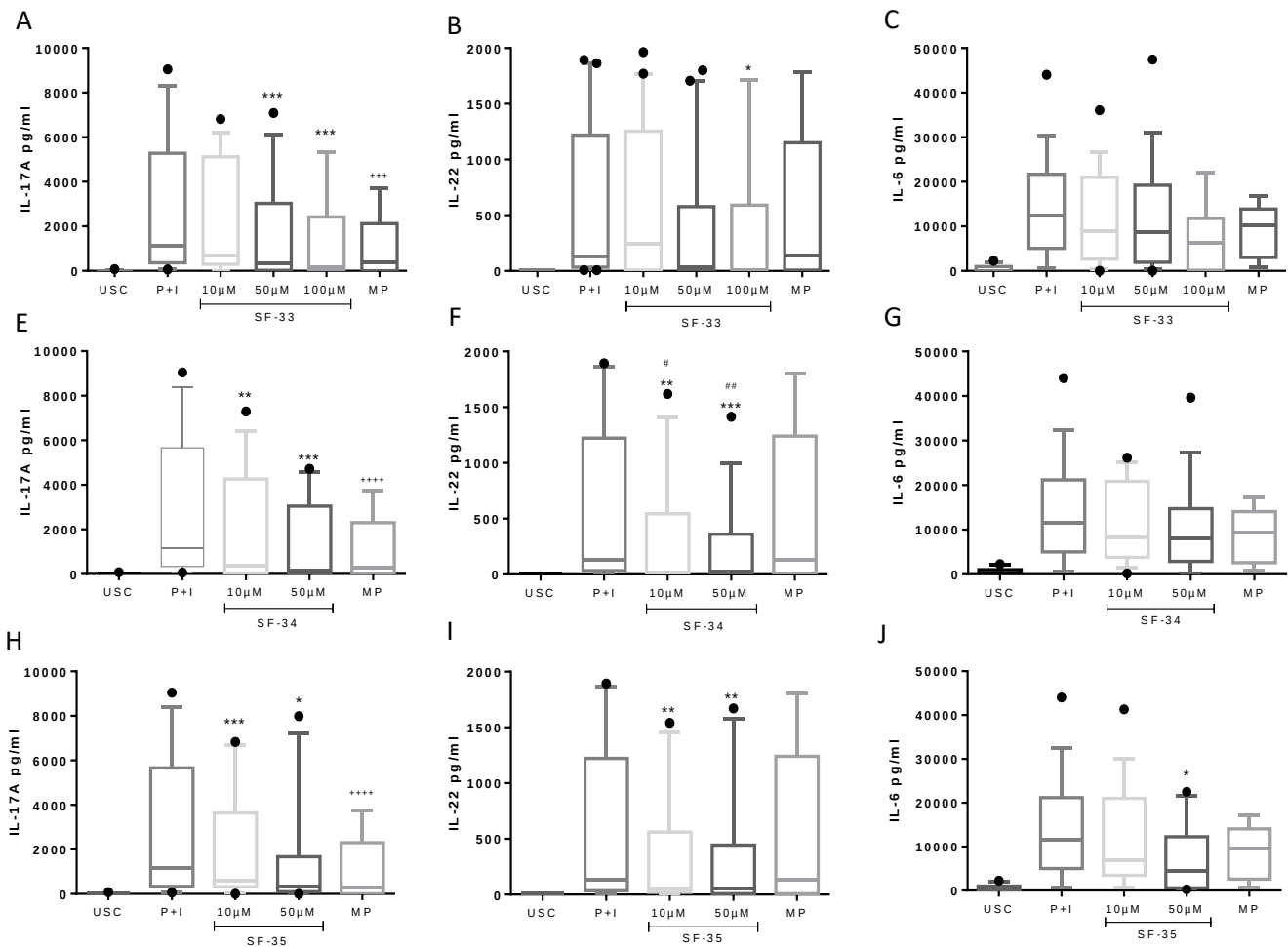


Figure 3 - Effects of LPSF-SF-33, LPSF-SF-34 and LPSF-SF-35 on cytokine profile in Pso patients. PBMCs from Pso patients following stimulation with PMA/Iono (P + I) were treated with different compounds doses and with metilprednisolone as standard drug. (*) Significant value for p when we compared cells treated with PMA/Iono with the LPSF-SF-33, LPSF-SF-34 and LPSF-SF-35

compounds, (#) compounds with the methylprednisolone and (+) methylprednisolone with PMA/Iono. USC means Unstimulated Cells and MP means Methylprednisolone.

There was a significant decrease in IL-17A levels with LPSF-SF-33 at 50 μ M (P = 0.0007) and 100 μ M (P = 0.0002) compared to PMA/Iono. The LPSF-SF-34 decrease IL-17A levels at 10 μ M (P = 0.0034) and 50 μ M (P = 0.0002) and LPSF-SF-35 at 10 μ M (P = 0.0008) and 50 μ M (P = 0.0215). The LPSF-SF-33 was able to inhibit the production of IL-22 at a dose of 100 μ M (P = 0.0348), the LPSF-SF-34 at doses of 10 μ M (P = 0.0013) and 50 μ M dose (P = 0.0006) and LPSF-SF-34 was still able to inhibit IL-22 more than methylprednisolone at 10 μ M (P = 0.0327) and 50 μ M (P = 0.0067). The SF-35 inhibit IL-22 at 10 μ M (P = 0.0023) and 50 μ M (P = 0.0034). The compound SF-35 was the only one able to decrease the production of IL-6 at a dose of 50 μ M as compared to PMA/Iono.

Discussion

The TZD were initially used in the treatment of diabetes and there was a possible immunomodulatory effects (Varani *et al.*, 2006). The new derivatives TZD have a lower risk of cytotoxicity than the old TZD drugs as troglitazone that has already been abolished in some countries. In conventional clinical rosiglitazone and pioglitazone are the TZDs in use and have few side effects, but it is still one investigated cardiotoxicity of rosiglitazone (Tolman, 2011). Some studies indicate a greater increase in fracture risk when patients are in use TZD (Schwartz e Sellmeyer, 2007; Yaturu, Bryant e Jain, 2007; Cusick *et al.*, 2013). This theory was contradictory in another scientific research that showed an increase in circulating vitamin D in women who were using TZD and had normal bone conditions (Chakreeyarat *et al.*, 2011). Additionally the TZD shown to be able to decrease the proliferation of human keratinocytes in culture. Pioglitazone and Rosiglitazone are to decrease the proliferation and They're also able to inhibit metalloproteinases involved in the development of Pso process (Varani *et al.*, 2006). Therefore, the thiazolidinedione derivatives can be a good option for future treatment for psoriasis and inflammatory skin diseases.

Troglitazone and Rosiglitazone were tested in cultured muscle cells of the airways to induce asthma to evaluate the anti-inflammatory potential. These drugs were able to inhibit IL-4, IL-6 and TNF- α (Zhu *et al.*, 2011). The circulating IL-6 levels are also decreased in the presence of TZD derivatives (Schernthaner, 2009). Our TZD derivative SF-35 was able to inhibit the production of IL-6 in the concentration of 50 μ M and showed a better reduction of IL-6 levels than the standard drug methylprednisolone.

The TZD derivatives are also capable of reducing the production of TNF, IL-6 and IL-8 in synoviocytes and inflammatory factors such as NF- κ B inhibitor, the I κ k, and cardiac markers such as PCR and some metalloproteinases from patients with rheumatoid arthritis (Consoli e Devangelio, 2005). Furthermore pioglitazone was also able to reduce levels of inflammatory cytokines in mice that were induced sepsis (Kaplan *et al.*, 2013). The TZD derivatives are shown in active intestinal diseases such as colitis, as in the experiment with mice induced colitis, rosiglitazone and Troglitazone were able to mitigate the inflammatory effects and reduced tissue levels of inflammatory cytokines such as IL-2 and IFN- γ (Celinski *et al.*, 2013).

Some studies indicate the TZD as a treatment for inflammatory and autoimmune diseases such as uveitis. In murine models of uveitis has been possible to observe a significant improvement in inflammation and a decrease in the production of inflammatory cytokines IFN, IL-6 and IL-17 (Okunuki *et al.*, 2013). In experimental models of arthritis the pioglitazone treatment showed a decrease in bone destruction of the synovium of the tested mice and the concentration of IL-17 was also reduced, which may be the cause of improvement in inflammation (Koufany *et al.*, 2013). Apart from arthritis and bowel disease TZDs have shown the beneficial effects in the treatment of respiratory diseases such as asthma and allergic rhinitis (Won *et al.*, 2010). Our results showed a decline in IL-17 dose-dependent manner in the three new derivatives tested. Recent studies have pointed to the potential of new TZD to inhibit the production of IL-22. A recent publication from our group shows the 5-(5-bromo-2-methoxy-benzylidene)-3-(2-nitro-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione (TM17), a new derivative TZD, has ability to reduce inflammatory cytokines such as IL-17, IL-22 and IFN- γ (Da Rocha Junior *et al.*, 2013). Our results suggest that novel TZD are even better than the medications used for the inhibition of IL-22, finding significant responses to standard drug methylprednisolone.

There is no work in the literature that shows the action of TZDs in patients with Pso, so our work is innovative when it makes the use of TZDs in PBMCs from psoriatic patients and provides satisfactory results in the decay of some inflammatory cytokines in the development of Pso. Still, we assess prospects as other key cytokines in Pso as IL-12, IL-23 and TNF- α , since with these answers we have further clarification of the effect of these drugs on Pso.

Conclusion

Seen the potential to reduce cytokines involved in the inflammatory process of both the Th1 pathway, as the Th17 pathway, thiazolidinedione derivatives presented here (LPSF-SF-33, SF-34-LPSF and LPSF-SF-35) are agents with immunomodulatory potential, they were able to

decrease the expression of IL-17A, IL-22 and IL-6. Still, more studies need to be done to understand the action of these derivatives and all his course of action.

Acknowledgments

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

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Referências

- 1 Coimbra S, Figueiredo A, Castro E, Rocha-Pereira P, Santos-Silva A (2012) The roles of cells and cytokines in the pathogenesis of psoriasis. *Int J Dermatol* 51 (4): 389-395; quiz 395-388 DOI 10.1111/j.1365-4632.2011.05154.x
- 2 Weller PA (1996) Psoriasis. *Med J Aust* 165 (4): 216-221
- 3 Zachariae R, Zachariae H, Blomqvist K, Davidsson S, Molin L, Mørk C, Sigurgeirsson B (2004) Self-reported stress reactivity and psoriasis-related stress of Nordic psoriasis sufferers. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 18 (1): 27-36
- 4 Griffiths CE, Barker JN (2007) Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet* 370 (9583): 263-271 DOI 10.1016/S0140-6736(07)61128-3
- 5 Johnston A, Arnadottir S, Gudjonsson JE, Aphale A, Sigmarsdottir AA, Gunnarsson SI, Steinsson JT, Elder JT, Valdimarsson H (2008) Obesity in psoriasis: leptin and resistin as mediators of cutaneous inflammation. *Br J Dermatol* 159 (2): 342-350 DOI 10.1111/j.1365-2133.2008.08655.x
- 6 Gudjonsson JE, Elder JT (2007) Psoriasis: epidemiology. *Clin Dermatol* 25 (6): 535-546 DOI 10.1016/j.clindermatol.2007.08.007
- 7 Chu CC, Di Meglio P, Nestle FO (2011) Harnessing dendritic cells in inflammatory skin diseases. *Semin Immunol* 23 (1): 28-41 DOI 10.1016/j.smim.2011.01.006
- 8 Lima EeA, Lima MeA (2011) Reviewing concepts in the immunopathogenesis of psoriasis. *An Bras Dermatol* 86 (6): 1151-1158
- 9 Traub M, Marshall K (2007) Psoriasis--pathophysiology, conventional, and alternative approaches to treatment. *Altern Med Rev* 12 (4): 319-330
- 10 Nickoloff BJ, Qin JZ, Nestle FO (2007) Immunopathogenesis of psoriasis. *Clin Rev Allergy Immunol* 33 (1-2): 45-56 DOI 10.1007/s12016-007-0039-2
- 11 Kutsenko NL, Vesnina LE, Kaïdashev IP (2012) [Pioglitazone, an activator of PPAR-gamma, reduces the expression of kB nuclear factor and inhibits apoptosis in mononuclear cells of peripheral blood in vitro]. *Fiziol Zh* 58 (2): 33-38
- 12 Ban JO, Oh JH, Son SM, Won D, Song HS, Han SB, Moon DC, Kang KW, Song MJ, Hong JT (2011) Troglitazone, a PPAR agonist, inhibits human prostate cancer cell growth through inactivation of NFkB via suppression of GSK-3β expression. *Cancer Biol Ther* 12 (4): 288-296
- 13 da Rocha Junior LF, Rêgo MJ, Cavalcanti MB, Pereira MC, Pitta MG, de Oliveira PS, Gonçalves SM, Duarte AL, de Lima MoC, Pitta IaR (2013) Synthesis of a novel thiazolidinedione and evaluation of its modulatory effect on IFN- γ , IL-6, IL-17A, and IL-22 production in PBMCs from rheumatoid arthritis patients. *Biomed Res Int* 2013: 926060 DOI 10.1155/2013/926060

- 14 Mössner R, Kaiser R, Matern P, Krüger U, Westphal GA, Brockmöller J, Ziegler A, Neumann C, König IR, Reich K (2004) Variations in the genes encoding the peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma in psoriasis. *Arch Dermatol Res* 296 (1): 1-5 DOI 10.1007/s00403-004-0463-6
- 15 Ostergaard M, Stoltenberg M, Henriksen O, Lorenzen I (1996) Quantitative assessment of synovial inflammation by dynamic gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging. A study of the effect of intra-articular methylprednisolone on the rate of early synovial enhancement. *Br J Rheumatol* 35 (1): 50-59
- 16 Ruzicka T (2006) Methylprednisolone aceponate in eczema and other inflammatory skin disorders -- a clinical update. *Int J Clin Pract* 60 (1): 85-92 DOI 10.1111/j.1368-5031.2005.00754.x
- 17 Tęsiorowski M, Potaczek T, Jasiewicz B, Sapa J, Zygmunt M (2013) [Methylprednisolone- acute spinal cord injury, benefits or risks?]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 67: 601-609 DOI 10.5604/17322693.1054873
- 18 Varani J, Bhagavathula N, Ellis CN, Pershadsingh HA (2006) Thiazolidinediones: potential as therapeutics for psoriasis and perhaps other hyperproliferative skin disease. *Expert Opin Investig Drugs* 15 (11): 1453-1468 DOI 10.1517/13543784.15.11.1453
- 19 Tolman KG (2011) The safety of thiazolidinediones. *Expert Opin Drug Saf* 10 (3): 419-428 DOI 10.1517/14740338.2011.534982
- 20 Yaturu S, Bryant B, Jain SK (2007) Thiazolidinedione treatment decreases bone mineral density in type 2 diabetic men. *Diabetes Care* 30 (6): 1574-1576 DOI 10.2337/dc06-2606
- 21 Schwartz AV, Sellmeyer DE (2007) Thiazolidinedione therapy gets complicated: is bone loss the price of improved insulin resistance? *Diabetes Care* 30 (6): 1670-1671 DOI 10.2337/dc07-0554
- 22 Cusick T, Mu J, Pennypacker BL, Li Z, Scott KR, Shen X, Fisher JE, Langdon RB, Kimmel DB, Zhang BB, Glantschnig H (2013) Bone loss in the oestrogen-depleted rat is not exacerbated by sitagliptin, either alone or in combination with a thiazolidinedione. *Diabetes Obes Metab* 15 (10): 954-957 DOI 10.1111/dom.12109
- 23 Chakreeyarat S, Saetung S, Chailurkit LO, Rattanasiri S, Ditbanjong S, Chitrapazt N, Jaovisidha S, Ongphiphadhanakul B (2011) Elevated vitamin D status in postmenopausal women on thiazolidinediones for type 2 diabetes. *Endocrine* 39 (3): 278-282 DOI 10.1007/s12020-010-9426-1
- 24 Zhu M, Flynt L, Ghosh S, Mellema M, Banerjee A, Williams E, Panettieri RA, Shore SA (2011) Anti-inflammatory effects of thiazolidinediones in human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45 (1): 111-119 DOI 10.1165/rcmb.2009-0445OC
- 25 Schernthaner G (2009) Pleiotropic effects of thiazolidinediones on traditional and non-traditional atherosclerotic risk factors. *Int J Clin Pract* 63 (6): 912-929 DOI 10.1111/j.1742-1241.2009.02025.x
- 26 Consoli A, Devangelio E (2005) Thiazolidinediones and inflammation. *Lupus* 14 (9): 794-797
- 27 Kaplan J, Nowell M, Chima R, Zingarelli B (2013) Pioglitazone reduces inflammation through inhibition of NF- κ B in polymicrobial sepsis. *Innate Immun* DOI 10.1177/1753425913501565
- 28 Celinski K, Dworzanski T, Fornal R, Korolczuk A, Madro A, Brzozowski T, Slomka M (2013) Comparison of anti-inflammatory properties of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists rosiglitazone and troglitazone in prophylactic treatment of experimental colitis. *J Physiol Pharmacol* 64 (5): 587-595
- 29 Okunuki Y, Usui Y, Nakagawa H, Tajima K, Matsuda R, Ueda S, Hattori T, Kezuka T, Goto H (2013) Peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist pioglitazone suppresses

- experimental autoimmune uveitis. *Exp Eye Res* 116: 291-297 DOI 10.1016/j.exer.2013.09.017
- 30 Koufany M, Chappard D, Netter P, Bastien C, Weryha G, Jouzeau JY, Moulin D (2013) The peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist pioglitazone preserves bone microarchitecture in experimental arthritis by reducing the interleukin-17-dependent osteoclastogenic pathway. *Arthritis Rheum* 65 (12): 3084-3095 DOI 10.1002/art.38130
- 31 Won HY, Min HJ, Ahn JH, Yoo SE, Bae MA, Hong JH, Hwang ES (2010) Anti-allergic function and regulatory mechanisms of KR62980 in allergen-induced airway inflammation. *Biochem Pharmacol* 79 (6): 888-896 DOI 10.1016/j.bcp.2009.10.023

6.3. Artigo 2: Clinical and Cytokine Profile Evaluation in Northeast Brazilian Psoriasis Plaque-type Patients

Submetido na Revista European Cytokine Network

Fator de Impacto: 1,97

Clinical and Cytokine Profile Evaluation in Northeast Brazilian Psoriasis Plaque-type Patients

Cardoso, P.R.G.¹, Lima, E.V.A.^{1,2}, Lima, M.M.A.¹, Rêgo, M.J.B.M.², Marques, C.D.L.², Pitta, I.R.¹, Duarte, A.L.B.P.², Pitta, M.G.R.^{1*}

1. Laboratory of Immunomodulation and Novel Therapeutic Approaches (LINAT), Research Center for Therapeutic Innovation Suely Galdino (NUPIT-SG), UFPE, Recife, Brazil.
2. Clinics Hospital, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil.

*Address correspondence to Prof. M.G.R. Pitta, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Centro de Ciências Biológicas, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (Nupit SG), Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife – PE, 50670-901, Brazil. E-mail: mgrpitta@gmail.com

Key words: Psoriasis, IL-8, IL-9, IL-27, IL-29, Brazilian Patients

All authors declare no conflicts of interest.

Abstract

Objective and Design: Psoriasis is a common, enigmatic and recurrent disease. The precise etiology and pathogenesis of psoriasis are still unclear. Psoriasis has been treated as an inflammatory disorder that is related to an underlying Th1/Th17-dominated immune response. Interleukins are involved in the development of psoriasis lesions through Th17-associated inflammation. Th1 and Th17 cytokines are found in skin lesions and in the peripheral blood of psoriasis patients. We sought to analyze serum levels of IL-1-beta, IL-8, IL-9, IL-27, IL-29, IL-35, IFN- γ , TNF and TGF- β in patients with psoriasis and healthy control volunteers.

Material: Blood samples were collected from fifty-three patients with psoriasis and thirty-five healthy controls.

Methods: Serum cytokines concentrations were determined using an Enzyme-linked immunosorbent assay.

Results: Serum IL-8, IL-9, IL-27, IL-29 and TNF levels were statistically significant in psoriasis patients. IL-9 detectable serum levels were found in 47 patients, amongst 53 patients in the psoriasis group.

Conclusions: Interleukines-8, 27, 29 and TNF measured in the serum of psoriasis patients were slightly elevated comparing to healthy controls in a weakly significant way. On the other hand, the difference between IL-9 levels were highly significant.

1. Introduction

Psoriasis is a chronic T-cell-mediated disorder characterized by histological features as inflammatory infiltration, hyper proliferation of epidermal cells and dilated micro vessels; affecting 1-3% of the world's population with a considerable impact on quality of life (Griffiths e Barker, 2007; Ariza, Williams e Wong, 2013). Patients with psoriasis have been found to be at greater risk of developing metabolic syndrome and cardiovascular complications (Gisondi *et al.*, 2007).

The precise pathomechanism of psoriasis remains unclear. The ultimate pathological process that leads to both skin manifestations and comorbidities is chronic inflammation with an underlying Th1/Th17-dominated immune response (Nickoloff, Qin e Nestle, 2007; Johnston *et al.*, 2008). It has been demonstrated in patients with psoriasis a cutaneous and systemic overexpression of pro-inflammatory cytokines, such as Interferon-gamma (IFN- γ), tumor necrosis factor (TNF) and interleukins (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-22, IL-23) (Dardalhon *et al.*, 2008; Killeen *et al.*, 2013). Th1 cytokines were found both in skin lesions and in the peripheral patients' blood (Griffiths e Barker, 2007; Elloso, Gomez-Angelats e Fourie, 2012).

Cytokines are directly involved in the pathogenesis of psoriasis. Some of them are able to initiate inflammation by signaling with keratinocytes and with that, there is a bigger defense cells recruitment, the leukocytes. Therefore, the characteristic inflammation of psoriasis is established (Tokura, Mori e Hino, 2010). Some authors indicate treatment blocking cytokines, such as specific blockers currently in clinical anti-TNF, and more recently blockers arise for IL-12, IL-23p40 and IL-17 bringing good results (Mease, 2005; Tobin e Kirby, 2005; Kupetsky, Mathers e Ferris, 2013).

Much has been studied on Th17 pathway in the pathogenesis of psoriasis (Michalak-Stoma *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2013; Lynde *et al.*, 2014), but in addition to cytokines on Th17 pathway, other cytokines have been found in the serum of patients with psoriasis (Arican *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 2010; Michalak-Stoma *et al.*, 2011), and these may be an interaction with the immune response exacerbated. From this information, this study has focused to conduct a search for other cytokines that may be involved in the pathogenesis of psoriasis as IL-1 beta, IL-8, IL-9, IL-27, IL-29, IL-35 IFN- γ , TNF and TGF- β and try to find a link between them and the severity of disease as measured by the PASI.

2. Material and Methods

Clinical Assessment and Patient Material

Sample population consist of 53 patients (31 men and 22 women, age range 18-80 years) with plaque-type psoriasis attending to the rheumatology outpatient clinic at the Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-Brazil and all the 35 healthy controls (Table 1).

Diagnose of plaque psoriasis was made in strict accordance with the diagnostic criteria of Nestle *et. al.* (Nestle, Kaplan e Barker, 2009). The disease severity of the patients with psoriasis was assessed using PASI score (Van De Kerkhof, 1997). Psoriasis was classified as moderate (PASI 8-12) and severe (PASI >12) (Schmitt e Wozel, 2005). According to the PASI score, 22 patients had moderate and 31 patients had severe psoriasis. In the moment of diagnostic the blood samples were collected from all patients. Diagnose of psoriatic arthritis was excluded in all 53 patients by a rheumatologist. The patients included in this study had no other autoimmune disorders, acute or chronic infections and malignancies. They had not received any systemic treatment using immunosuppressive drugs or phototherapy, and they were off topical treatment for 4 weeks prior to the PASI score evaluation and blood sample collection. Volunteer controls were matched by age and sex. For selection, chose those who did not have psoriasis, autoimmune diseases, acute or chronic infections or malignancies. A formal written consent was obtained from all the patients and healthy volunteers enrolled in the study. The ethics committee of the UFPE approved the research (CEP: 528/11).

Blood samples were collected by venipuncture each one (8mL) and processed after clotting for 20 minutes at room temperature. Serum samples were obtained for further measurement by centrifugation at 2000rpm for 10 min and they were stored at -80°C for subsequent assay.

ELISA Assay

Serum IL-1beta, IL-8, IL-9, IL-27, IL-29, IL-35, IFN- γ , TNF e TGF- β cytokines levels in the patients with psoriasis and healthy volunteers were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (eBiosciencies) according to the manufacturer instructions. The standard substances and serum samples were incubated in a 96-well polystyrene microplate with correspondent cytokine antibody. The plate was read at 450-

570 nm. The sensitivity of the ELISA test used in the experiment was 0,78pg/mL for IL-9 and IL-35. 1,95pg/mL for IL-8. 3,91pg/mL for IL-1 beta. 4,68pg/mL for IFN- γ . For IL-29 and TNF the limit was 7,81pg/mL. 15,62pg/mL for TGF- β and finally 62,5pg/mL for IL-27.

Statistical Analysis

The statistical analysis was made with the average and range for nonparametric data analysis. Mean and standard error of the mean (SEM) for normal distribution. The D'Agostino test verified the normality of samples. Differences of serum cytokines levels between patients with psoriasis and healthy controls volunteers were analyzed using the Mann-Whitney test. For two independent groups, the Fisher test was used. Pearson's coefficient was used to measure the linear relationship between two variables. The Spearman correlation coefficient (ρ) was used to measure the linear relationship between two variables in ordinal level. The correlation classification followed the consideration $r = 0.10$ to 0.29 (weak); $r = 0.30$ to 0.49 (moderate); $r = 0.50$ to 1 (strong). The statistical significance is represented by stars as follow: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism® version 6.0.

3. Results

All psoriasis patients had squamous plaques characteristic psoriasis plaque-type disease. The volunteers were chosen presenting active disease, but without biological or immunosuppressive drugs and/or phototherapy, From the classification of psoriatic lesions, patients were grouped by PASI scale into moderate and severe (Schmitt e Wozel, 2005). **Table 1** shown clinical and laboratory parameters of volunteers.

Table 1. Volunteers Clinical Parameters

Characteristics	Mean (Range or SD)	Mean (Range)
	Patients (n = 53)	Controls (n = 35)
Male	31	19
Female	22	16
Age (years)	49 (18 - 80)	46 (22 – 64)
PASI	17,15 (7 – 41)	
Moderate (n = 22)	9,2 ($\pm 1,8$)	-

Severe (n = 31)	22,8 ($\pm 7,1$)	-
Erythrocyte Sedimentation Rate	17,8 ($\pm 13,2$)	-
Immunosuppressive treatment	None	None

ELISA sandwich type detects IFN- γ , IL-1 beta, IL-8, IL-9, IL-27, IL-29, IL-35, TGF- β and TNF cytokines serum levels. The values obtained can be seen in Figure 1.

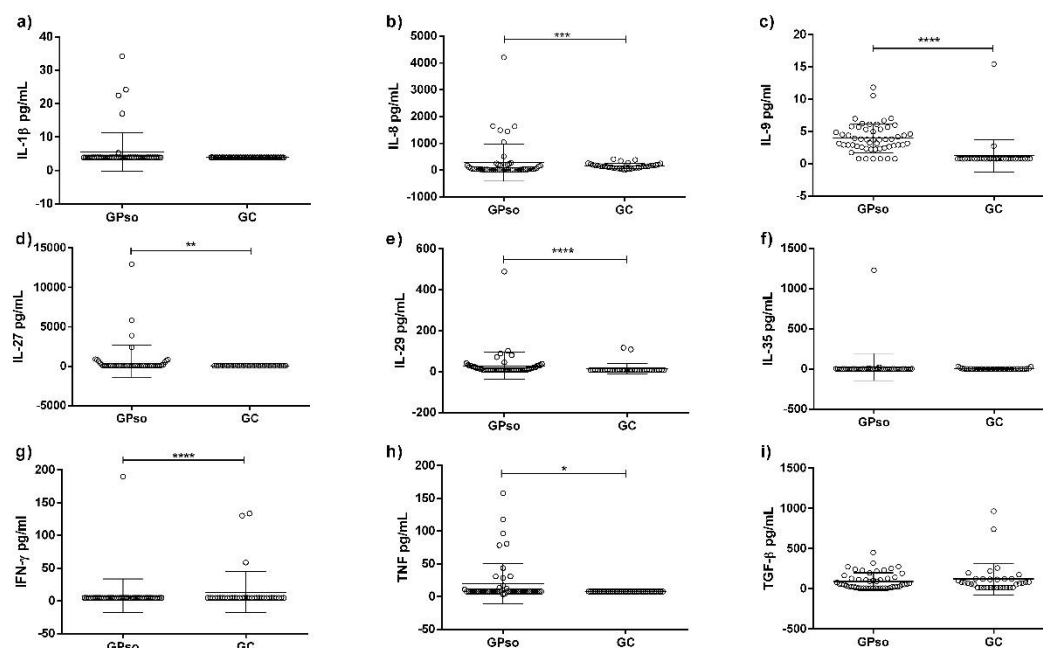


Figure 1. Brazilian Psoriasis Patients Cytokine Profile. In this image it is possible to observe IL-1 β , IL-8, IL-9, IL-27, IL-29, IL-35, IFN- γ , TNF and TGF- β (pg/mL) cytokine dosages in a; b; c; d; e; f; g; h; i; respectively. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001.

Age correlation analysis shows a weak statistical significance with IL-8 and TNF (data not shown). Among all the cytokines, the IL-9 was the most detected one in patients with psoriasis. Forty-seven out of fifty-three have shown positive values for IL-9 ($4 \pm 2,2$ pg/mL). If we compare to control patients, just two out of thirty-five shown positive values for IL-9 ($1,2 \pm 2,5$ pg/mL). With that, we decided to analyze the sensibility and the specificity. This study point IL-9 assay had a high specificity (94%) and a quite good sensitivity (88,6%).

4. Discussion

We have conducted this study to found other cytokines in the serum of psoriasis patients. The result was satisfactory when we found statistical significance in IL-8, IL-9,

IL-27, IL-29 and TNF cytokines. With that we can concluded that these cytokines are present in serum of Brazilian psoriasis patients.

This result shown positive statistical significance of IL-8 levels in patients with psoriasis compared to healthy controls. This cytokine was detected in 51 of 53 patients. A relevant and with much higher concentrations number than in controls patients. Finding the IL-8 at such positive statistical significance levels in patients with active disease may indicate their participation in psoriatic framework (Arican *et al.*, 2005; Abdel-Hamid *et al.*, 2011). Nograles and Kruger (Nograles, Davidovici e Krueger, 2010) made another important study of IL-8 in psoriasis in a review article where they show an improved picture of the disease when IL-8 was blocked in psoriasis patients (Duan *et al.*, 2001). The participation of IL-8 is evident in psoriatic frame. In addition, results show the tendency of the bigger the IL-8 levels are, the greater the IL-27 and TNF. IL-8 would be closely related to inflammation, in this case, when produced by keratinocytes and psoriasis aggravated by Th1 cell activation pathway, in conjunction with IL-27. It could be an important factor in this induction. It appears that IL-27 plays an important role in the relationship of these three cytokines, serving as a pivot of inflammatory Th1 pathway (Pflanz *et al.*, 2002; Cao *et al.*, 2008; Wolk *et al.*, 2009). TNF has been well described in inflammatory diseases such as psoriasis where this cytokine is found in the serum and cells of these patients(Arican *et al.*, 2005; Guilloteau *et al.*, 2010; Kouris *et al.*, 2014) which was not different in this study while we found higher levels of TNF in patients with psoriasis.

IL-27 is a recently discovered cytokine and it is known that it is produced by antigen presenting cells (APCs) (Shibata *et al.*, 2010). Recently it was identified as a key cytokine, although it is an IL-12 family member, in the worsening of inflammatory diseases such as lupus erythematosus and psoriasis because of their potential to activate naïve T cells into Th17 (Spadaro *et al.*, 2002). This results indicate IL-27 present and positive statistical significant in psoriatic patients serum. This indicates that the involvement of IL-27 is likely to be related to the triggering of the disease since it was not detected in the serum of control patients. It is known that IL-27 has pro-inflammatory and anti-function, but in this study, in correlation with IL-8, we believe that IL-27 is pending for the inflammatory side.

IL-29, also known as IFN- λ , was discovered in 2003, and it initially appeared to be involved in the antiviral response, it is believed that this cytokine would then be involved in the Th1 response (Sheppard *et al.*, 2003; Jordan *et al.*, 2007). Eventually IL-29 was classified as an IL-10 family member and their pleiotropic found function (Uzé e Monneron, 2007). A recent study suggested the production of IL-29 Th17 cells in patients with psoriasis (Wolk *et al.*, 2013). Observing the importance of IL-29 in psoriatic framework put this cytokine as one of the objectives of the study. Serum levels of IL-29 were positive statistical significant in patients with psoriasis compared to controls. With the number of patients who have IL-29 levels detected and positive, it suggest that cytokine is involved in the inflammatory stages of the disease and should be study further.

Finally, and with very promising results, the IL-9 was detected in 47 of 53 patients and only in 2 control patients. The present study indicated that patients with plaque psoriasis showed a positive statistical significance of IL-9 serum levels than those in healthy controls. The sensitivity of the ELSA kit used in the experiment was 0,78 pg/ml, which is highly precise. In this context, the detection of IL-9 serum levels in 47 patients amongst 53 individuals in the psoriasis group, compared to only 2 in the healthy control group of 35 patients becomes a very interesting indicative that this cytokine may be of greater importance in the setting of the psoriasis than what was previously thought. This study data point to a sensitivity of 88,6% and a specificity of 94% and this one could be a good serum biomarker for plaque-type psoriasis.

Inflammatory and autoimmune diseases like rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus and psoriasis associated to the Th17 pathway, showed high serum levels of IL-9(Dantas *et al.*, 2015). A recent finding has indicated a link between IL-9, a Th2 and Th9 cytokine, and Th17 pathway in psoriasis, demonstrating a marked higher expression of IL-9R in psoriatic skin lesions. That cytokine also can be expressed by Th17 cells (Friberg *et al.*, 2006; Nowak *et al.*, 2009). In addition, IL-9 associated to IL-6 and TGF- β 1 increased the production of IL-17 by peripheral blood mononuclear cells or CD4⁺ T cells, especially in cells isolated from individuals with psoriasis (Singh *et al.*, 2013). Accordingly, Th17 cells are known to express the receptor for IL-9 and that cytokine can contribute directly to Th17 differentiations, presenting such activity in the context of psoriasis (Elyaman *et al.*, 2009).

Recently, Singh *et al.* demonstrated that IL-9 had no *ex vivo* effects on numbers of IFN- γ secreting CD4⁺ T cells on ELISPOT assay using cells from individuals with psoriasis, suggesting that IL-9 does not contribute to the Th1 component of the disease (Singh *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2013). This observation is consistent with other similar reports (Coimbra *et al.*, 2012). Indeed, the finding that IL-9 pathogenic role in psoriasis was markedly seen in K5.HTGF β 1 transgenic mice, which exhibits a phenotype similar to human psoriasis. Intradermal injection in those animals of IL-9 induced Th-17-associated skin inflammation, including expression of IL-17A. Moreover, when anti-IL-9 antibody was injected, not only it diminished the psoriatic-like morphological changes, including cellular infiltration and neo-vascularization of the skin, but it also reduced the expression of IL-17A (Singh *et al.*, 2013). In addition, the injection of anti-IL-17 in mice decreased skin IL-9 mRNA and serum IL-9 protein levels, suggesting a positive feedback loop between IL-9 and IL-17A (Singh *et al.*, 2013). We have found that the serum levels of IL-9 were increased in patients with plaque psoriasis compared to healthy controls. The specific mechanism of the high expression of IL-9 in psoriasis is still unknown, but with these results from clinical trials hereby presented, it is able to refine our understanding of psoriasis pathogenesis and may provide a new therapeutic approach for patients with psoriasis.

Finally yet importantly, interleukin-35 is the newest family of cytokine IL-12 find out. It was related in Treg cells regulation. Studies indicate that it may reduce the proliferation of CD4⁺ cells, thus being a potential therapeutic target in the treatment of autoimmune diseases (Collison *et al.*, 2007; Niedbala *et al.*, 2007; Collison *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2015). Have no data about IL-35 in psoriasis. We decided to include the IL-35 because this supposed anti-inflammatory characteristics. We did not find IL-35 in Brazilian psoriasis patients serum.

5. Conclusion

The results indicate the cytokines IL-8, IL-9, IL-27, IL-29, IFN- γ and TNF are present in serum of northeast Brazilian plaque-type patients. The findings are important for further studies of diseases mediated by immune cells in this disease.

6. Conflicts of Interest

All authors declare no conflicts of interest.

7. Acknowledgment

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica – INCT_if; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes; Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco – FACEPE; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

8. References

1. Ariza ME, Williams MV, Wong HK. Targeting IL-17 in psoriasis: from cutaneous immunobiology to clinical application. *Clin Immunol.* 2013;146(2):131-9.
2. Griffiths CE, Barker JN. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet.* 2007;370(9583):263-71.
3. Gisondi P, Tessari G, Conti A, Piaserico S, Schianchi S, Peserico A, et al. Prevalence of metabolic syndrome in patients with psoriasis: a hospital-based case-control study. *Br J Dermatol.* 2007;157(1):68-73.
4. Johnston A, Arnadottir S, Gudjonsson JE, Aphale A, Sigmarsdottir AA, Gunnarsson SI, et al. Obesity in psoriasis: leptin and resistin as mediators of cutaneous inflammation. *Br J Dermatol.* 2008;159(2):342-50.
5. Nickoloff BJ, Qin JZ, Nestle FO. Immunopathogenesis of psoriasis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2007;33(1-2):45-56.
6. Killeen ME, Ferris L, Kupetsky EA, Falo L, Mathers AR. Signaling through purinergic receptors for ATP induces human cutaneous innate and adaptive Th17 responses: implications in the pathogenesis of psoriasis. *J Immunol.* 2013;190(8):4324-36.
7. Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA, et al. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol.* 2008;9(12):1347-55.
8. Elloso MM, Gomez-Angelats M, Fourie AM. Targeting the Th17 pathway in psoriasis. *J Leukoc Biol.* 2012;92(6):1187-97.
9. Tokura Y, Mori T, Hino R. Psoriasis and other Th17-mediated skin diseases. *J UOEH.* 2010;32(4):317-28.
10. Kupetsky EA, Mathers AR, Ferris LK. Anti-cytokine therapy in the treatment of psoriasis. *Cytokine.* 2013;61(3):704-12.
11. Mease PJ. Adalimumab: an anti-TNF agent for the treatment of psoriatic arthritis. *Expert Opin Biol Ther.* 2005;5(11):1491-504.
12. Tobin AM, Kirby B. TNF alpha inhibitors in the treatment of psoriasis and psoriatic arthritis. *BioDrugs.* 2005;19(1):47-57.
13. Michalak-Stoma A, Pietrzak A, Szepietowski JC, Zalewska-Janowska A, Paszkowski T, Chodorowska G. Cytokine network in psoriasis revisited. *Eur Cytokine Netw.* 2011;22(4):160-8.
14. Singh TP, Schön MP, Wallbrecht K, Gruber-Wackernagel A, Wang XJ, Wolf P. Involvement of IL-9 in Th17-associated inflammation and angiogenesis of psoriasis. *PLoS One.* 2013;8(1):e51752.
15. Lynde CW, Poulin Y, Vender R, Bourcier M, Khalil S. Interleukin 17A: Toward a new understanding of psoriasis pathogenesis. *J Am Acad Dermatol.* 2014.
16. Arican O, Aral M, Sasmaz S, Ciragil P. Serum levels of TNF-alpha, IFN-gamma, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in patients with active psoriasis and correlation with disease severity. *Mediators Inflamm.* 2005;2005(5):273-9.
17. Takahashi H, Tsuji H, Hashimoto Y, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H. Serum cytokines and growth factor levels in Japanese patients with psoriasis. *Clin Exp Dermatol.* 2010;35(6):645-9.
18. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. *N Engl J Med.* 2009;361(5):496-509.
19. van de Kerkhof PC. The Psoriasis Area and Severity Index and alternative approaches for the assessment of severity: persisting areas of confusion. *Br J Dermatol.* 1997;137(4):661-2.

20. Schmitt J, Wozel G. The psoriasis area and severity index is the adequate criterion to define severity in chronic plaque-type psoriasis. *Dermatology*. 2005;210(3):194-9.
21. Abdel-Hamid MF, Aly DG, Saad NE, Emam HM, Ayoub DF. Serum levels of interleukin-8, tumor necrosis factor- α and γ -interferon in Egyptian psoriatic patients and correlation with disease severity. *J Dermatol*. 2011;38(5):442-6.
22. Nograles KE, Davidovici B, Krueger JG. New insights in the immunologic basis of psoriasis. *Semin Cutan Med Surg*. 2010;29(1):3-9.
23. Duan H, Koga T, Kohda F, Hara H, Urabe K, Furue M. Interleukin-8-positive neutrophils in psoriasis. *J Dermatol Sci*. 2001;26(2):119-24.
24. Pflanz S, Timans JC, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J, et al. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4+ T cells. *Immunity*. 2002;16(6):779-90.
25. Wolk K, Haugen HS, Xu W, Witte E, Waggie K, Anderson M, et al. IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN- γ are not. *J Mol Med (Berl)*. 2009;87(5):523-36.
26. Cao Y, Doodes PD, Glant TT, Finnegan A. IL-27 induces a Th1 immune response and susceptibility to experimental arthritis. *J Immunol*. 2008;180(2):922-30.
27. Guilloteau K, Paris I, Pedretti N, Boniface K, Juchaux F, Huguier V, et al. Skin Inflammation Induced by the Synergistic Action of IL-17A, IL-22, Oncostatin M, IL-1 $\{\alpha\}$, and TNF- $\{\alpha\}$ Recapitulates Some Features of Psoriasis. *J Immunol*. 2010.
28. Kouris A, Pistiki A, Katoulis A, Georgitsi M, Giatrakou S, Papadavid E, et al. Proinflammatory cytokine responses in patients with psoriasis. *Eur Cytokine Netw*. 2014;25(4):63-8.
29. Shibata S, Tada Y, Kanda N, Nashiro K, Kamata M, Karakawa M, et al. Possible roles of IL-27 in the pathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2010;130(4):1034-9.
30. Spadaro A, Scrivo R, Rinaldi T, Ricciari V, Sili Scavalli A, Taccari E, et al. [The role of interleukin-12 in immune-mediated rheumatic diseases]. *Reumatismo*. 2002;54(2):113-21.
31. Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol*. 2003;4(1):63-8.
32. Jordan WJ, Eskdale J, Srinivas S, Pekarek V, Kelner D, Rodia M, et al. Human interferon lambda-1 (IFN-lambda1/IL-29) modulates the Th1/Th2 response. *Genes Immun*. 2007;8(3):254-61.
33. Uzé G, Monneron D. IL-28 and IL-29: newcomers to the interferon family. *Biochimie*. 2007;89(6-7):729-34.
34. Wolk K, Witte K, Witte E, Raftery M, Kokolakis G, Philipp S, et al. IL-29 is produced by T(H)17 cells and mediates the cutaneous antiviral competence in psoriasis. *Sci Transl Med*. 2013;5(204):204ra129.
35. Dantas AT, Marques CD, da Rocha Junior LF, Cavalcanti MB, Gonçalves SM, Cardoso PR, et al. Increased Serum Interleukin-9 Levels in Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus: Pathogenic Role or Just an Epiphenomenon? *Dis Markers*. 2015;2015:519638.
36. Nowak EC, Weaver CT, Turner H, Begum-Haque S, Becher B, Schreiner B, et al. IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease. *J Exp Med*. 2009;206(8):1653-60.
37. Friberg C, Björck K, Nilsson S, Inerot A, Wahlström J, Samuelsson L. Analysis of chromosome 5q31-32 and psoriasis: confirmation of a susceptibility locus but no association with SNPs within SLC22A4 and SLC22A5. *J Invest Dermatol*. 2006;126(5):998-1002.
38. Elyaman W, Bradshaw EM, Uyttenhove C, Dardalhon V, Awasthi A, Imitola J, et al. IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(31):12885-90.
39. Singh TP, Huettnner B, Koefeler H, Mayer G, Bambach I, Wallbrecht K, et al. Platelet-activating factor blockade inhibits the T-helper type 17 cell pathway and suppresses psoriasis-like skin disease in K5.hTGF- β 1 transgenic mice. *Am J Pathol*. 2011;178(2):699-708.

40. Coimbra S, Figueiredo A, Castro E, Rocha-Pereira P, Santos-Silva A. The roles of cells and cytokines in the pathogenesis of psoriasis. *Int J Dermatol*. 2012;51(4):389-95; quiz 95-8.
41. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*. 2007;450(7169):566-9.
42. Niedbala W, Wei XQ, Cai B, Hueber AJ, Leung BP, McInnes IB, et al. IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *Eur J Immunol*. 2007;37(11):3021-9.
43. Collison LW, Chaturvedi V, Henderson AL, Giacomini PR, Guy C, Bankoti J, et al. IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat Immunol*. 2010;11(12):1093-101.
44. Choi J, Leung PS, Bowls C, Gershwin ME. IL-35 and Autoimmunity: a Comprehensive Perspective. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2015.

6.4. Artigo 3: IL-17A, IL-22, IL-6, and IL-21 Serum Levels in Plaque-Type Psoriasis in Brazilian Patients

Aceito em Mediators of Inflammation

Fator de Impacto: 3,326

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 alfa (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 cytokynes 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. Steuden, 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: interrogation 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.
- 38) K. Wolk, H. S. Haugen, W. Xu et al., "IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN- γ are not". *Journal of Molecular Medicine*. vol 87, pp 523–536, 2009.

7. Discussão

Vários estudos foram realizados para examinar os níveis séricos de citocinas em doenças inflamatórias crônicas, como a Pso. Porém, poucos estudos correlacionam a gravidade da doença com o nível de citocinas pró-inflamatórias (Elloso, Gomez-Angelats e Fourie, 2012). A expressão elevada de citocinas está associada com as vias Th1 e Th17 e tem sido observada na Pso (Abdel-Hamid *et al.*, 2011; Elloso, Gomez-Angelats e Fourie, 2012; Killeen *et al.*, 2013; Shibata *et al.*, 2013).

Além disso, resultados de outros estudos associaram os níveis séricos de citocinas em pacientes psoriásicos em relação aos controles saudáveis, logo, citocinas circulantes podem desempenhar um papel importante na indução da proliferação das células da epiderme e derme e no infiltrado inflamatório presente na placa psoriásica (Anderson *et al.*, 2010; Coimbra *et al.*, 2010; Takahashi *et al.*, 2010).

Os resultados indicam que os pacientes com Pso apresentam maiores níveis de IL-8, IL-9, IL-17A, IL-21 e IL-27 em relação aos controles saudáveis. A IL-9 ainda se mostra associada com a gravidade da doença medida pelo PASI em leve, moderado e grave. A IL-8 e a IL-17A se mostram aumentadas nos pacientes mais velhos apresentando uma correlação positiva.

A IL- 8 é relatada como uma citocina pró-inflamatória envolvida em desordens inflamatórias da pele, como Pso. IL - 8 tem sido relatada a um aumento no fluido sinovial de pacientes com artrite reumatóide (Sticherling *et al.*, 1999), e significativamente mais concentrada na artrite e lúpus eritematoso sistêmico (Szabo *et al.*, 2013). Sabe-se que a Pso leva a um distúrbio inflamatório então esperava-se que esta citocina estivesse aumentada nos pacientes do estudo. Tem sido argumentado que a IL-8 tem a função de quimiotaxia, a indução da migração de neutrófilos e desgranulação em locais de inflamação, tal quais placas de psoriásicas. Por estas razões, é entendido o resultado de IL-8 aumentado em comparação com pacientes saudáveis como foi demonstrado.

Os resultados mostram também que a IL-8 aumenta gradualmente com a idade dos pacientes com Pso, provando ser um possível fator agravante, porque quanto mais tempo convivendo com a doença mais IL-8 está sendo produzida. O avanço da idade leva, conseqüentemente, a um aumento nos níveis séricos de IL-8 em pacientes com Pso (Abdel-Hamid *et al.*, 2011).

Doenças autoimunes e inflamatórias como a dermatite atópica, a artrite reumatóide, o lúpus sistêmico e o lúpus eritematoso sistêmico, assim como a Pso, estão envolvidas com as células da via Th17 e esta via pode ser ativada pela IL-9 (Friberg *et al.*, 2006; Nowak *et al.*, 2009).

Recentemente, (Singh *et al.*, 2011) demonstraram que a IL - 9 não tinha efeitos sobre o IFN- γ secretado por células T CD4 +, utilizando as células de indivíduos com Pso, sugerindo que a IL-9 não contribuía no componente Th1 da doença (Singh *et al.*, 2011). No entanto, a descoberta de que a IL-9 possuía papel patogénico no tratamento da Pso foi observado em camundongos transgênicos K5.HTGF β 1, que exibem um fenótipo similar à Pso humana. Uma injeção intradérmica foi aplicada nesses animais com anti-IL-9 o que diminuiu o nível dessa citocina nesses camundongos e foi observado uma diminuição nas alterações morfológicas das lesões semelhantes à Pso como também a infiltração celular, neovascularização da pele e a redução da expressão de IL-17A (Singh *et al.*, 2013).

Os resultados mostram que os níveis séricos de IL-9 foram aumentados em pacientes com Pso em placas comparados com controles saudáveis . Os mecanismos específicos da alta expressão de IL-9 na Pso ainda são desconhecidos, mas, com base em nestes resultados, pode-se inferir que há uma relação direta entre os níveis de IL-9 séricos e gravidade da doença.

A IL-17A está diretamente envolvida em processos inflamatórios em diversas doenças, e na Pso, pois induzem a proliferação dos queratinócitos (Guilloteau *et al.*, 2010), é sugerido ainda que a IL-17A funciona ativando a IL-23, citocina responsável no quadro inicial da Pso (Rizzo *et al.*, 2011). Inclusive, há produção de anticorpo monoclonal anti-IL-17A para o tratamento da Pso e doenças autoimunes em estudo, pois esta citocina é marcada como um novo alvo terapêutico (Brown *et al.*, 2014). Os resultados encontrados mostram níveis elevados de IL-17A no soro dos pacientes com Pso, enquanto que nos pacientes controles não foi detectado IL-17A em nenhum dos voluntários. A IL-17A mostrou ainda correlação com a idade dos pacientes, quanto mais avançada fosse, maiores seriam os níveis da citocina inflamatória.

Um estudo recente ressalva a potente ação da IL-21 na hiperplasia dos queratinócitos e pode ser uma citocina importante no desenvolvimento da Pso, pois foi encontrada elevada na pele dos pacientes psoriásicos (Botti *et al.*, 2012). Porém pouco se sabe sobre o mecanismo da IL-21, esta vem sendo estudada nos últimos cinco anos. Os resultados encontrados mostram resultados inovadores, pois até então não há relatos dos níveis séricos da IL-21 em pacientes com Pso, e foi demonstrado que os níveis de IL-21 estão aumentados nos voluntários testados.

A IL-27 é uma citocina recentemente estudada e foi associada com fatores inflamatórios de doenças respiratórias (Xu *et al.*, 2013), com o Lúpus Eritematoso Sistêmico (Tojo *et al.*, 2012)

e também com a Pso, onde níveis séricos de IL-27 se mostram mais elevados que em controles saudáveis (Shibata *et al.*, 2010; Shibata *et al.*, 2013). Os resultados encontrados mostram os níveis de IL-27 aumentados na Pso em relação aos pacientes saudáveis, o que pode indicar a participação desta citocina na Pso.

Em adição, os novos derivados TZD foram inicialmente utilizados no tratamento da diabetes e posteriormente foi verificada uma possível ação imunomoduladora (Varani *et al.*, 2006). Os TZD atuais possuem riscos de citotoxicidade menores que as drogas antigas, como a troglitazona, a qual foi abolida de alguns países. Na terapêutica há o uso da Pioglitazona e Rosiglitazona, que possuem poucos efeitos colaterais, porém estuda-se uma cardiotoxicidade da Rosiglitazona (Tolman, 2011). Alguns estudos indicam um aumento no risco de fratura óssea quando em uso de TZD, porém esta teoria está sendo discutida, uma vez que outros estudos mostram níveis elevados de Vitamina D em pacientes que fazem a utilização destes (Chakreeyarat *et al.*, 2011).

A Troglitazona e a Rosiglitazona foram testadas em células musculares das vias aéreas, que induzem asma e outras doenças, em cultura, e foi avaliada uma potente ação anti-inflamatória. Estas drogas foram capazes de inibir IL-4, IL-6 and TNF- α (Zhu *et al.*, 2011). Em adição, níveis circulantes de IL-6 são diminuídos quando em presença de TZD (Schernthaler, 2009). Nosso TZD SF-35 foi capaz de inibir a produção de IL-6 na dose de 50 μ M e mostrou-se mais eficiente nesta função do que a droga padrão testada, a Metilprednisolona.

Os derivados TZD são capazes de reduzir a produção de TNF- α , IL-6 e IL-8 em cultura de sinoviócitos, como também fatores inflamatórios como a via NF-kB a partir do seu inibidor Ikk, e marcadores cardíacos como PCR e algumas metaloproteinases de pacientes com Artrite Reumatóide (Consoli and Devangelio, 2005). A Pioglitazona se mostrou capaz também de reduzir níveis de citocinas inflamatórias em experimentos com camundongos com sepse induzida (Kaplan *et al.*, 2013). Os TZD mostram também uma atividade em doenças intestinais como a colite. Em experimentos com camundongos com colite induzida, a Rosiglitazona e a Troglitazona foram capazes de diminuir os efeitos inflamatórios a nível tecidual e também citocinas inflamatórias como a IL-2 e o IFN- γ (Celinski *et al.*, 2013).

Alguns estudos indicam as TZD como tratamento para doenças inflamatórias e autoimunes, como a uveíte. Em modelos murinos estas drogas mostraram capazes de reduzir inflamação e três citocinas inflamatórias, sendo elas IL-6, IL-17 e o IFN- γ (Okunuki *et al.*, 2013). Em modelos experimentos de Artrite, o tratamento com a Pioglitazona mostrou uma redução na destruição óssea na sinóvia dos camundongos testados e uma diminuição da IL-17 presente

nesse meio o que deve ter sido devido a redução da inflamação (Koufany et al., 2013). Além de Artrite e doenças intestinais, tem se estudado um efeito benéfico das TZD em doenças respiratórias como Asma e Rinite Alérgica com resultados promissores (Won et al., 2010). Nossos resultados mostraram uma redução dose dependente da IL-17A nos três novos derivados TZD, o que pode ser um fator importante na redução da inflamação na Psoríase.

Um estudo recente mostrou as TZD como potentes redutores de IL-22 em PBMCs de pacientes portadores de Artrite Reumatoide (Da Rocha Junior *et al.*, 2013). Uma recente publicação do composto derivado TZD TM-17 [5-(5-bromo-2-methoxy-benzylidene)-3-(2-nitro-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione] mostra que este derivado foi capaz de reduzir as citocinas inflamatórias IL-17A, IL-22 e IFN- γ (Da Rocha Junior et al., 2013). Os resultados com os novos derivados TZD mostram semelhanças, pois o LPSF-SF-33 na dose de 100 μ M, LPSF-SF-34 e o LPSF-SF-35 nas doses de 10 e 50 μ M foram capazes de diminuir a produção de IL-22 e ainda se mostram mais eficientes que a droga padrão utilizada, a metilprednisolona, em PBMCs de pacientes portadores de Pso.

Adicionalmente há estudos que sugerem as TZD como potentes redutoras de proliferação de queratinócitos a partir de testes *in vitro*. Pioglitazona e Rosiglitazona foram capazes de diminuir essa proliferação e ainda foram capazes de inibir metaloproteínases envolvidas no processo de desenvolvimento da Psoríase (Varani et al., 2006). Assim, derivados TZD podem ser uma boa opção para o tratamento de doenças inflamatórias de pele, como a Psoríase.

8. Conclusões

Visto o potencial em reduzir citocinas envolvidas no processo inflamatório tanto da via Th1, quanto da via Th17, os novos derivados tiazolidínicos aqui apresentados (LPSF-SF-33, LPSF-SF-34 e LPSF-SF-35) são agentes com potencial imunomodulador, pois foram capazes de diminuir a expressão de IL-17A, IL-22 e IL-6.

9. Perspectivas

Tem-se como perspectivas o entendimento da rota de ação desses novos derivados TZD, e a confirmação dos compostos LPSF-SF-33, LPSF-SF-34 e LPSF-SF-35 como agonistas do PPAR- γ . Avaliar seus efeitos de seletividade para Ciclooxigenase 1 ou 2 e na via NF κ B. Avaliar em sobrenadante de cultura os níveis de todas as citocinas que se mostraram elevadas no soro dos pacientes com Pso, principalmente da IL-9 que mostrou correlação com a gravidade da doença. Selecionar um maior n de pacientes controles e pareá-los para poder representar maior fidedignidade ao trabalho com os níveis séricos das citocinas inflamatórias, bem como aumentar o n dos pacientes portadores de Psoríase.

10. Referências

- ABDEL-HAMID, M. F. et al. Serum levels of interleukin-8, tumor necrosis factor- α and γ -interferon in Egyptian psoriatic patients and correlation with disease severity. **J Dermatol**, v. 38, n. 5, p. 442-6, May 2011. ISSN 1346-8138.
- AGHAEI, S.; MORADI, A.; ARDEKANI, G. S. Impact of psoriasis on quality of life in Iran. **Indian journal of dermatology, venereology and leprology**, v. 75, n. 2, p. 220, Mar-Apr 2009. ISSN 0973-3922 (Electronic) 0378-6323 (Linking).
- AHMADIAN, M. et al. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. **Nat Med**, v. 19, n. 5, p. 557-66, May 2013. ISSN 1546-170X.
- ALARCÓN DE LA LASTRA, C. et al. New pharmacological perspectives and therapeutic potential of PPAR-gamma agonists. **Curr Pharm Des**, v. 10, n. 28, p. 3505-24, 2004. ISSN 1381-6128.
- ALBANESI, C.; DE PITÀ, O.; GIROLOMONI, G. Resident skin cells in psoriasis: a special look at the pathogenetic functions of keratinocytes. **Clin Dermatol**, v. 25, n. 6, p. 581-8, 2007 Nov-Dec 2007. ISSN 0738-081X.
- ALLEN, M. H. et al. The major psoriasis susceptibility locus PSORS1 is not a risk factor for late-onset psoriasis. **J Invest Dermatol**, v. 124, n. 1, p. 103-6, Jan 2005. ISSN 0022-202X.
- ANDERSON, K. S. et al. Elevation of serum epidermal growth factor and interleukin 1 receptor antagonist in active psoriasis vulgaris. **Br J Dermatol**, v. 163, n. 5, p. 1085-9, Nov 2010. ISSN 1365-2133.
- ANGKASEKWINAI, P. et al. Regulation of IL-9 expression by IL-25 signaling. **Nat Immunol**, v. 11, n. 3, p. 250-6, Mar 2010. ISSN 1529-2916.
- ARICAN, O. et al. Serum levels of TNF-alpha, IFN-gamma, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in patients with active psoriasis and correlation with disease severity. **Mediators Inflamm**, v. 2005, n. 5, p. 273-9, Oct 2005. ISSN 0962-9351.
- ARIZA, M. E.; WILLIAMS, M. V.; WONG, H. K. Targeting IL-17 in psoriasis: from cutaneous immunobiology to clinical application. **Clin Immunol**, v. 146, n. 2, p. 131-9, Feb 2013. ISSN 1521-7035.
- AYALA, F. Clinical presentation of psoriasis. **Reumatismo**, v. 59 Suppl 1, p. 40-5, 2007. ISSN 0048-7449.
- BAN, J. O. et al. Troglitazone, a PPAR agonist, inhibits human prostate cancer cell growth through inactivation of NF κ B via suppression of GSK-3 β expression. **Cancer Biol Ther**, v. 12, n. 4, p. 288-96, Aug 2011. ISSN 1555-8576.

BEHNAM, S. M.; BEHNAM, S. E.; KOO, J. Y. Alcohol as a risk factor for plaque-type psoriasis. **Cutis**, v. 76, n. 3, p. 181-5, Sep 2005. ISSN 0011-4162.

BHOSLE, M. J. et al. Quality of life in patients with psoriasis. **Health and quality of life outcomes**, v. 4, p. 35, 2006. ISSN 1477-7525 (Electronic) 1477-7525 (Linking).

BOER, J.; SCHOTHORST, A. A.; SUURMOND, D. UV-B phototherapy of psoriasis. **Dermatologica**, v. 161, n. 4, p. 250-8, 1980. ISSN 0011-9075.

BONGARTZ, T. et al. Treatment of active psoriatic arthritis with the PPARgamma ligand pioglitazone: an open-label pilot study. **Rheumatology (Oxford)**, v. 44, n. 1, p. 126-9, Jan 2005. ISSN 1462-0324.

BOTTI, E. et al. Psoriasis, from pathogenesis to therapeutic strategies: IL-21 as a novel potential therapeutic target. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 13, n. 10, p. 1861-7, Aug 2012. ISSN 1873-4316.

BRAISSANT, O. et al. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. **Endocrinology**, v. 137, n. 1, p. 354-66, Jan 1996. ISSN 0013-7227.

BROWN, G. et al. Anti-IL-17 phase II data for psoriasis: A review. **J Dermatolog Treat**, Feb 2014. ISSN 1471-1753.

BUNCE, M. et al. High resolution HLA-C typing by PCR-SSP: identification of allelic frequencies and linkage disequilibria in 604 unrelated random UK Caucasoids and a comparison with serology. **Tissue Antigens**, v. 48, n. 6, p. 680-91, Dec 1996. ISSN 0001-2815.

CAMISA, C. Treatment of severe psoriasis with systemic drugs. **Dermatol Nurs**, v. 7, n. 2, p. 107-18; quiz 119-20, Apr 1995. ISSN 1060-3441.

CAO, Y. et al. IL-27 induces a Th1 immune response and susceptibility to experimental arthritis. **J Immunol**, v. 180, n. 2, p. 922-30, Jan 2008. ISSN 0022-1767.

CARNEIRO, J. N.; PAULA, A. P.; MARTINS, G. A. Psoriatic arthritis in patients with psoriasis: evaluation of clinical and epidemiological features in 133 patients followed at the University Hospital of Brasília. **An Bras Dermatol**, v. 87, n. 4, p. 539-44, 2012 Jul-Aug 2012. ISSN 1806-4841.

CELINSKI, K. et al. Comparison of anti-inflammatory properties of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists rosiglitazone and troglitazone in prophylactic treatment of experimental colitis. **J Physiol Pharmacol**, v. 64, n. 5, p. 587-95, Oct 2013. ISSN 1899-1505.

CHAKREEYARAT, S. et al. Elevated vitamin D status in postmenopausal women on thiazolidinediones for type 2 diabetes. **Endocrine**, v. 39, n. 3, p. 278-82, Jun 2011. ISSN 1559-0100.

CHAN, J. R. et al. IL-23 stimulates epidermal hyperplasia via TNF and IL-20R2-dependent mechanisms with implications for psoriasis pathogenesis. **J Exp Med**, v. 203, n. 12, p. 2577-87, Nov 2006. ISSN 0022-1007.

CHANDRAN, V.; RAYCHAUDHURI, S. P. Geoepidemiology and environmental factors of psoriasis and psoriatic arthritis. **J Autoimmun**, v. 34, n. 3, p. J314-21, May 2010. ISSN 1095-9157.

CHAWLA, A. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. **Endocrinology**, v. 135, n. 2, p. 798-800, Aug 1994. ISSN 0013-7227.

CHO, K. A. et al. Interleukin-17 and Interleukin-22 Induced Proinflammatory Cytokine Production in Keratinocytes via Inhibitor of Nuclear Factor κ B Kinase- α Expression. **Ann Dermatol**, v. 24, n. 4, p. 398-405, Nov 2012. ISSN 2005-3894.

CHOI, J. et al. IL-35 and Autoimmunity: a Comprehensive Perspective. **Clin Rev Allergy Immunol**, Jan 2015. ISSN 1559-0267.

CHU, C. C.; DI MEGLIO, P.; NESTLE, F. O. Harnessing dendritic cells in inflammatory skin diseases. **Semin Immunol**, v. 23, n. 1, p. 28-41, Feb 2011. ISSN 1096-3618.

CHUA, C. K. et al. Cardiac health diagnosis using higher order spectra and support vector machine. **The open medical informatics journal**, v. 3, p. 1-8, 2009. ISSN 1874-4311 (Electronic).

CHUNG, S. W.; KANG, B. Y.; KIM, T. S. Inhibition of interleukin-4 production in CD4+ T cells by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) ligands: involvement of physical association between PPAR-gamma and the nuclear factor of activated T cells transcription factor. **Mol Pharmacol**, v. 64, n. 5, p. 1169-79, Nov 2003. ISSN 0026-895X.

CLARK, L.; LEBWOHL, M. The effect of weight on the efficacy of biologic therapy in patients with psoriasis. **J Am Acad Dermatol**, v. 58, n. 3, p. 443-6, Mar 2008. ISSN 1097-6787.

CLARK, R. B. et al. The nuclear receptor PPAR gamma and immunoregulation: PPAR gamma mediates inhibition of helper T cell responses. **J Immunol**, v. 164, n. 3, p. 1364-71, Feb 2000. ISSN 0022-1767.

COHEN, A. D. et al. Psoriasis and the metabolic syndrome. **Acta Derm Venereol**, v. 87, n. 6, p. 506-9, 2007. ISSN 0001-5555.

COIMBRA, S. et al. The roles of cells and cytokines in the pathogenesis of psoriasis. **Int J Dermatol**, v. 51, n. 4, p. 389-95; quiz 395-8, Apr 2012. ISSN 1365-4632.

_____. Interleukin (IL)-22, IL-17, IL-23, IL-8, vascular endothelial growth factor and tumour necrosis factor- α levels in patients with psoriasis before, during and after psoralen-ultraviolet A and narrowband ultraviolet B therapy. **Br J Dermatol**, v. 163, n. 6, p. 1282-90, Dec 2010. ISSN 1365-2133.

COLLISON, L. W. et al. IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. **Nat Immunol**, v. 11, n. 12, p. 1093-101, Dec 2010. ISSN 1529-2916.

_____. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. **Nature**, v. 450, n. 7169, p. 566-9, Nov 2007. ISSN 1476-4687.

CONSOLI, A.; DEVANGELIO, E. Thiazolidinediones and inflammation. **Lupus**, v. 14, n. 9, p. 794-7, 2005. ISSN 0961-2033.

CRIBIER, B. [Rare or unusual forms of psoriasis]. **Ann Dermatol Venereol**, v. 139 Suppl 2, p. S39-45, Apr 2012. ISSN 0151-9638.

CUSICK, T. et al. Bone loss in the oestrogen-depleted rat is not exacerbated by sitagliptin, either alone or in combination with a thiazolidinedione. **Diabetes Obes Metab**, v. 15, n. 10, p. 954-7, Oct 2013. ISSN 1463-1326.

DA ROCHA JUNIOR, L. F. et al. Synthesis of a novel thiazolidinedione and evaluation of its modulatory effect on IFN- γ , IL-6, IL-17A, and IL-22 production in PBMCs from rheumatoid arthritis patients. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 926060, 2013. ISSN 2314-6141.

DANTAS, A. T. et al. Increased Serum Interleukin-9 Levels in Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus: Pathogenic Role or Just an Epiphenomenon? **Dis Markers**, v. 2015, p. 519638, 2015. ISSN 1875-8630.

DARDALHON, V. et al. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. **Nat Immunol**, v. 9, n. 12, p. 1347-55, Dec 2008. ISSN 1529-2916.

DI MEGLIO, P.; NESTLE, F. O. The role of IL-23 in the immunopathogenesis of psoriasis. **F1000 Biol Rep**, v. 2, 2010. ISSN 1757-594X.

DISEPIO, D.; CHANDRARATNA, R. A. New drugs in the treatment of psoriasis. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 9, n. 1, p. 79-93, Jan 2000. ISSN 1354-3784.

DUAN, H. et al. Interleukin-8-positive neutrophils in psoriasis. **J Dermatol Sci**, v. 26, n. 2, p. 119-24, Jun 2001. ISSN 0923-1811.

DUARTE, A. A.; CHEHIN, F. B. Moderate to severe psoriasis treated with infliximab - 53 patients: patients profile, efficacy and adverse effects. **An Bras Dermatol**, v. 86, n. 2, p. 257-63, 2011 Mar-Apr 2011. ISSN 1806-4841.

DUFFIN, K. C.; KRUEGER, G. G. Genetic variations in cytokines and cytokine receptors associated with psoriasis found by genome-wide association. **J Invest Dermatol**, v. 129, n. 4, p. 827-33, Apr 2009. ISSN 1523-1747.

ECKES, L.; ANANTHAKRISHNAN, R.; WALTER, H. [The geographic distribution of psoriasis]. **Hautarzt**, v. 26, n. 11, p. 563-7, Nov 1975. ISSN 0017-8470.

ELDER, J. T. et al. Molecular dissection of psoriasis: integrating genetics and biology. **J Invest Dermatol**, v. 130, n. 5, p. 1213-26, May 2010. ISSN 1523-1747.

ELLIS, C. N. et al. Troglitazone improves psoriasis and normalizes models of proliferative skin disease: ligands for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibit keratinocyte proliferation. **Arch Dermatol**, v. 136, n. 5, p. 609-16, May 2000. ISSN 0003-987X.

ELLOSO, M. M.; GOMEZ-ANGELATS, M.; FOURIE, A. M. Targeting the Th17 pathway in psoriasis. **J Leukoc Biol**, v. 92, n. 6, p. 1187-97, Dec 2012. ISSN 1938-3673.

ELYAMAN, W. et al. IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 31, p. 12885-90, Aug 2009. ISSN 1091-6490.

FARBER, E. M.; NALL, M. L. The natural history of psoriasis in 5,600 patients. **Dermatologica**, v. 148, n. 1, p. 1-18, 1974. ISSN 0011-9075.

FARBER, E. M.; PETERSON, J. B. Variations in the natural history of psoriasis. **Calif Med**, v. 95, p. 6-11, Jul 1961. ISSN 0008-1264.

FREDRIKSSON, T.; PETTERSSON, U. Severe psoriasis--oral therapy with a new retinoid. **Dermatologica**, v. 157, n. 4, p. 238-44, 1978. ISSN 0011-9075.

FRIBERG, C. et al. Analysis of chromosome 5q31-32 and psoriasis: confirmation of a susceptibility locus but no association with SNPs within SLC22A4 and SLC22A5. **J Invest Dermatol**, v. 126, n. 5, p. 998-1002, May 2006. ISSN 0022-202X.

FUJISHIMA, S. et al. Involvement of IL-17F via the induction of IL-6 in psoriasis. **Arch Dermatol Res**, v. 302, n. 7, p. 499-505, Sep 2010. ISSN 1432-069X.

GHORESCHI, K.; WEIGERT, C.; RÖCKEN, M. Immunopathogenesis and role of T cells in psoriasis. **Clin Dermatol**, v. 25, n. 6, p. 574-80, 2007 Nov-Dec 2007. ISSN 0738-081X.

GISONDI, P. et al. Prevalence of metabolic syndrome in patients with psoriasis: a hospital-based case-control study. **Br J Dermatol**, v. 157, n. 1, p. 68-73, Jul 2007. ISSN 0007-0963.

GLADYS; AIRES; MARTINS. **Systemic treatment os psoriasis - Part I: Methotrexate and acitretin**. LUCIA e ARRUDA. Rio de Janeiro: An bras Dermatol. 79: 263-278 p. 2004.

GOETZE, S. et al. PPAR gamma-ligands inhibit migration mediated by multiple chemoattractants in vascular smooth muscle cells. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 33, n. 5, p. 798-806, May 1999. ISSN 0160-2446.

GRASLAND, A.; VINCENEUX, P. [Psoriasis. Rheumatologic manifestations]. **Presse Med**, v. 28, n. 23, p. 1251-8, Jun 1999. ISSN 0755-4982.

GRAYSON, M. Psoriasis. **Nature**, v. 492, n. 7429, p. S49, Dec 2012. ISSN 1476-4687.

GRIFFITHS, C. E.; BARKER, J. N. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. **Lancet**, v. 370, n. 9583, p. 263-71, Jul 21 2007. ISSN 1474-547X (Electronic) 0140-6736 (Linking).

GUDJONSSON, J. E.; ELDER, J. T. Psoriasis: epidemiology. **Clinics in dermatology**, v. 25, n. 6, p. 535-46, Nov-Dec 2007. ISSN 0738-081X (Print) 0738-081X (Linking).

GUDJONSSON, J. E. et al. Distinct clinical differences between HLA-Cw*0602 positive and negative psoriasis patients--an analysis of 1019 HLA-C- and HLA-B-typed patients. **J Invest Dermatol**, v. 126, n. 4, p. 740-5, Apr 2006. ISSN 0022-202X.

GUILHOU, J. J. et al. Vitamin D metabolism in psoriasis before and after phototherapy. **Acta Derm Venereol**, v. 70, n. 4, p. 351-4, 1990. ISSN 0001-5555.

GUILLET, G.; STROBEL, M.; PRADINAUD, R. [Brazilian pemphigus in a child in French Guyana. Discussion on the clinical polymorphism and epidemiology of the disease]. **Ann Dermatol Venereol**, v. 111, n. 12, p. 1087-92, 1984. ISSN 0151-9638.

GUILLOTEAU, K. et al. Skin Inflammation Induced by the Synergistic Action of IL-17A, IL-22, Oncostatin M, IL-1{alpha}, and TNF-{alpha} Recapitulates Some Features of Psoriasis. **J Immunol**, Mar 2010. ISSN 1550-6606.

HARIHARAN, P.; KABRHEL, C. Sensitivity of erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein for the exclusion of septic arthritis in emergency department patients. **J Emerg Med**, v. 40, n. 4, p. 428-31, Apr 2011. ISSN 0736-4679.

HARPER, E. G. et al. Th17 cytokines stimulate CCL20 expression in keratinocytes in vitro and in vivo: implications for psoriasis pathogenesis. **J Invest Dermatol**, v. 129, n. 9, p. 2175-83, Sep 2009. ISSN 1523-1747.

HAYES, J.; KOO, J. Psoriasis: depression, anxiety, smoking, and drinking habits. **Dermatol Ther**, v. 23, n. 2, p. 174-80, 2010 Mar-Apr 2010. ISSN 1529-8019.

HELLIWELL, P. S. et al. Cytidine deaminase activity, C reactive protein, histidine, and erythrocyte sedimentation rate as measures of disease activity in psoriatic arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 50, n. 6, p. 362-5, Jun 1991. ISSN 0003-4967.

HIGGINS, E. M.; DUVIVIER, A. W.; PETERS, T. J. Smoking and psoriasis. **BMJ**, v. 308, n. 6943, p. 1572, Jun 1994. ISSN 0959-8138.

HUERTA, C.; RIVERO, E.; RODRÍGUEZ, L. A. Incidence and risk factors for psoriasis in the general population. **Arch Dermatol**, v. 143, n. 12, p. 1559-65, Dec 2007. ISSN 1538-3652.

JEŠE, R. et al. A case of inverse psoriasis successfully treated with adalimumab. **Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat**, v. 23, n. 1, p. 21-3, Mar 2014. ISSN 1581-2979.

Jl, J. D. et al. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) on the expression of inflammatory cytokines and apoptosis induction in rheumatoid synovial fibroblasts and monocytes. **J Autoimmun**, v. 17, n. 3, p. 215-21, Nov 2001. ISSN 0896-8411.

JIANG, C.; TING, A. T.; SEED, B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. **Nature**, v. 391, n. 6662, p. 82-6, Jan 1998. ISSN 0028-0836.

JOHNSTON, A. et al. Obesity in psoriasis: leptin and resistin as mediators of cutaneous inflammation. **Br J Dermatol**, v. 159, n. 2, p. 342-50, Aug 2008. ISSN 1365-2133.

JORDAN, W. J. et al. Human interferon lambda-1 (IFN-lambda1/IL-29) modulates the Th1/Th2 response. **Genes Immun**, v. 8, n. 3, p. 254-61, Apr 2007. ISSN 1466-4879.

KAPLAN, J. et al. Pioglitazone reduces inflammation through inhibition of NF-κB in polymicrobial sepsis. **Innate Immun**, Sep 2013. ISSN 1753-4267.

KATZ, H. I.; WAALEN, J.; LEACH, E. E. Acitretin in psoriasis: an overview of adverse effects. **J Am Acad Dermatol**, v. 41, n. 3 Pt 2, p. S7-S12, Sep 1999. ISSN 0190-9622.

KEMÉNY, L. et al. [The role of biological drugs in the treatment of psoriasis, results from 9 randomized placebo-controlled trials]. **Orv Hetil**, v. 147, n. 21, p. 981-90, May 2006. ISSN 0030-6002.

KILLEEN, M. E. et al. Signaling through purinergic receptors for ATP induces human cutaneous innate and adaptive Th17 responses: implications in the pathogenesis of psoriasis. **J Immunol**, v. 190, n. 8, p. 4324-36, Apr 2013. ISSN 1550-6606.

KLOTZ, L. et al. The nuclear receptor PPAR gamma selectively inhibits Th17 differentiation in a T cell-intrinsic fashion and suppresses CNS autoimmunity. **J Exp Med**, v. 206, n. 10, p. 2079-89, Sep 2009. ISSN 1540-9538.

KOUFANY, M. et al. The peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist pioglitazone preserves bone microarchitecture in experimental arthritis by reducing the interleukin-17-dependent osteoclastogenic pathway. **Arthritis Rheum**, v. 65, n. 12, p. 3084-95, Dec 2013. ISSN 1529-0131.

KOURIS, A. et al. Proinflammatory cytokine responses in patients with psoriasis. **Eur Cytokine Netw**, v. 25, n. 4, p. 63-8, 2014 Oct-Dec 2014. ISSN 1952-4005.

KROMANN, N.; GREEN, A. Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974. **Acta Med Scand**, v. 208, n. 5, p. 401-6, 1980. ISSN 0001-6101.

KUPETSKY, E. A.; MATHERS, A. R.; FERRIS, L. K. Anti-cytokine therapy in the treatment of psoriasis. **Cytokine**, v. 61, n. 3, p. 704-12, Mar 2013. ISSN 1096-0023.

KURILIĆ, M. et al. [Systemic therapy in the treatment of psoriasis: drugs of prebiological era]. **Lijec Vjesn**, v. 132, n. 7-8, p. 246-51, 2010 Jul-Aug 2010. ISSN 0024-3477.

KUTSENKO, N. L.; VESNINA, L. E.; KAĬDASHEV, I. P. [Pioglitazone, an activator of PPAR-gamma, reduces the expression of κB nuclear factor and inhibits apoptosis in mononuclear cells of peripheral blood in vitro]. **Fiziol Zh**, v. 58, n. 2, p. 33-8, 2012.

LAJEVARDI, V. et al. The efficacy of methotrexate plus pioglitazone vs. methotrexate alone in the management of patients with plaque-type psoriasis: a single-blinded randomized controlled trial. **Int J Dermatol**, Sep 2014. ISSN 1365-4632.

LEE, C. S.; LI, K. A review of acitretin for the treatment of psoriasis. **Expert Opin Drug Saf**, v. 8, n. 6, p. 769-79, Nov 2009. ISSN 1744-764X.

LEE, E. et al. Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris. **J Exp Med**, v. 199, n. 1, p. 125-30, Jan 2004. ISSN 0022-1007.

LEE, J. W. et al. Fenofibrate represses interleukin-17 and interferon-gamma expression and improves colitis in interleukin-10-deficient mice. **Gastroenterology**, v. 133, n. 1, p. 108-23, Jul 2007. ISSN 0016-5085.

LEMAN, J.; BURDEN, A. D. Sequential use of biologics in the treatment of moderate-to-severe plaque psoriasis. **Br J Dermatol**, v. 167 Suppl 3, p. 12-20, Nov 2012. ISSN 1365-2133.

LIMA, E. E. A.; LIMA, M. E. A. Reviewing concepts in the immunopathogenesis of psoriasis. **An Bras Dermatol**, v. 86, n. 6, p. 1151-8, 2011 Nov-Dec 2011. ISSN 1806-4841.

LIMA, E. E. A. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists (PPARs): a promising prospect in the treatment of psoriasis and psoriatic arthritis. **An Bras Dermatol**, v. 88, n. 6, p. 1029-35, 2013 Nov-Dec 2013. ISSN 1806-4841.

LOWES, M. A.; SUÁREZ-FARIÑAS, M.; KRUEGER, J. G. Immunology of psoriasis. **Annu Rev Immunol**, v. 32, p. 227-55, Mar 2014. ISSN 1545-3278.

LU, Y. et al. The role of 39 psoriasis risk variants on age of psoriasis onset. **ISRN Dermatol**, v. 2013, p. 203941, 2013. ISSN 2090-4592.

LYNDE, C. W. et al. Interleukin 17A: Toward a new understanding of psoriasis pathogenesis. **J Am Acad Dermatol**, Mar 2014. ISSN 1097-6787.

MA, L. et al. Possible pathogenic role of T helper type 9 cells and interleukin (IL)-9 in atopic dermatitis. **Clin Exp Immunol**, v. 175, n. 1, p. 25-31, Jan 2014. ISSN 1365-2249.

MAK, R. K.; HUNDHAUSEN, C.; NESTLE, F. O. Progress in understanding the immunopathogenesis of psoriasis. **Actas Dermosifiliogr**, v. 100 Suppl 2, p. 2-13, Dec 2009. ISSN 0001-7310.

MALISIEWICZ, B. et al. Eosinophilia during psoriasis treatment with TNF antagonists. **Dermatology**, v. 223, n. 4, p. 311-5, 2011. ISSN 1421-9832.

MARQUES, S. Psoríase: Conceito, epidemiologia, genética e imunopatogênese. In: DERMATOLOGIA, S. B. D. (Ed.). **Consenso Brasileiro sobre Psoríase**. Rio de Janeiro, 2009. cap. 1,

MCKAY, I. A. et al. Nuclear transcription factors: potential targets for new modes of intervention in skin disease. **Br J Dermatol**, v. 131, n. 5, p. 591-7, Nov 1994. ISSN 0007-0963.

MEASE, P. J. Adalimumab: an anti-TNF agent for the treatment of psoriatic arthritis. **Expert Opin Biol Ther**, v. 5, n. 11, p. 1491-504, Nov 2005. ISSN 1744-7682.

_____. Psoriatic arthritis assessment and treatment update. **Curr Opin Rheumatol**, v. 21, n. 4, p. 348-55, Jul 2009. ISSN 1531-6963.

MELGAÇO, S. S. et al. Evaluation of renal function in patients with psoriasis using immunobiologicals. **An Bras Dermatol**, v. 88, n. 4, p. 667-9, 2013 Jul-Aug 2013. ISSN 1806-4841.

MICHALAK-STOMA, A. et al. Cytokine network in psoriasis revisited. **Eur Cytokine Netw**, v. 22, n. 4, p. 160-8, Dec 2011. ISSN 1952-4005.

MILLS, C. M. et al. Smoking habits in psoriasis: a case control study. **Br J Dermatol**, v. 127, n. 1, p. 18-21, Jul 1992. ISSN 0007-0963.

MITRA, A.; FALLEN, R. S.; LIMA, H. C. Cytokine-based therapy in psoriasis. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 44, n. 2, p. 173-82, Apr 2013. ISSN 1559-0267.

MIZUTANI, H. et al. Role of increased production of monocytes TNF-alpha, IL-1beta and IL-6 in psoriasis: relation to focal infection, disease activity and responses to treatments. **J Dermatol Sci**, v. 14, n. 2, p. 145-53, Feb 1997. ISSN 0923-1811.

MUELLER, E. et al. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. **Mol Cell**, v. 1, n. 3, p. 465-70, Feb 1998. ISSN 1097-2765.

MURATA, T. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit choroidal neovascularization. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 41, n. 8, p. 2309-17, Jul 2000. ISSN 0146-0404.

MURPHY, G. J.; HOLDER, J. C. PPAR-gamma agonists: therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer. **Trends Pharmacol Sci**, v. 21, n. 12, p. 469-74, Dec 2000. ISSN 0165-6147.

MÖSSNER, R. et al. Variations in the genes encoding the peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma in psoriasis. **Arch Dermatol Res**, v. 296, n. 1, p. 1-5, Jun 2004. ISSN 0340-3696.

NA, H. K.; SURH, Y. J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) ligands as bifunctional regulators of cell proliferation. **Biochem Pharmacol**, v. 66, n. 8, p. 1381-91, Oct 2003. ISSN 0006-2952.

NALDI, L.; GAMBINI, D. The clinical spectrum of psoriasis. **Clin Dermatol**, v. 25, n. 6, p. 510-8, 2007 Nov-Dec 2007. ISSN 0738-081X.

NESTLE, F. O.; KAPLAN, D. H.; BARKER, J. Psoriasis. **N Engl J Med**, v. 361, n. 5, p. 496-509, Jul 2009. ISSN 1533-4406.

NEUNER, P. et al. Increased IL-6 production by monocytes and keratinocytes in patients with psoriasis. **J Invest Dermatol**, v. 97, n. 1, p. 27-33, Jul 1991. ISSN 0022-202X.

NICKOLOFF, B. J.; QIN, J. Z.; NESTLE, F. O. Immunopathogenesis of psoriasis. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 33, n. 1-2, p. 45-56, Oct 2007. ISSN 1080-0549.

NIEDBALA, W. et al. IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. **Eur J Immunol**, v. 37, n. 11, p. 3021-9, Nov 2007. ISSN 0014-2980.

NOELLE, R. J.; NOWAK, E. C. Cellular sources and immune functions of interleukin-9. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 10, p. 683-7, Oct 2010. ISSN 1474-1741.

NOGRALES, K. E.; DAVIDOVICI, B.; KRUEGER, J. G. New insights in the immunologic basis of psoriasis. **Semin Cutan Med Surg**, v. 29, n. 1, p. 3-9, Mar 2010. ISSN 1558-0768.

NOWAK, E. C. et al. IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease. **J Exp Med**, v. 206, n. 8, p. 1653-60, Aug 2009. ISSN 1540-9538.

OKAMOTO, H.; MOMOHARA, S. Interleukin-12/23 monoclonal antibody for psoriasis. **N Engl J Med**, v. 356, n. 19, p. 2003; author reply 2003, May 2007. ISSN 1533-4406.

OKUNUKI, Y. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist pioglitazone suppresses experimental autoimmune uveitis. **Exp Eye Res**, v. 116, p. 291-7, Nov 2013. ISSN 1096-0007.

ORGANIZATION, W. H. **8**, v. 3, p. 161-163, 1994.

OSMANCEVIC, A. et al. Vitamin D status in psoriasis patients during different treatments with phototherapy. **J Photochem Photobiol B**, v. 101, n. 2, p. 117-23, Nov 2010. ISSN 1873-2682.

OSTERGAARD, M. et al. Quantitative assessment of synovial inflammation by dynamic gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging. A study of the effect of intra-articular methylprednisolone on the rate of early synovial enhancement. **Br J Rheumatol**, v. 35, n. 1, p. 50-9, Jan 1996. ISSN 0263-7103.

PADILLA, J.; LEUNG, E.; PHIPPS, R. P. Human B lymphocytes and B lymphomas express PPAR- γ and are killed by PPAR- γ agonists. **Clin Immunol**, v. 103, n. 1, p. 22-33, Apr 2002. ISSN 1521-6616.

PFLANZ, S. et al. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4⁺ T cells. **Immunity**, v. 16, n. 6, p. 779-90, Jun 2002. ISSN 1074-7613.

POIKOLAINEN, K. et al. Alcohol intake: a risk factor for psoriasis in young and middle aged men? **BMJ**, v. 300, n. 6727, p. 780-3, Mar 1990. ISSN 0959-8138.

PORTO FERREIRA, C. et al. Psoriasis affects individuals of African descent and white Brazilians similarly. **Actas Dermosifiliogr**, v. 101, n. 3, p. 230-4, Apr 2010. ISSN 1578-2190.

PRYSTOWSKY, J. H.; COHEN, P. R. Pustular and erythrodermic psoriasis. **Dermatol Clin**, v. 13, n. 4, p. 757-70, Oct 1995. ISSN 0733-8635.

QUATRESOOZ, P. et al. Ustekinumab in psoriasis immunopathology with emphasis on the Th17-IL23 axis: a primer. **J Biomed Biotechnol**, v. 2012, p. 147413, 2012. ISSN 1110-7251.

QURESHI, A. A. et al. Alcohol intake and risk of incident psoriasis in US women: a prospective study. **Arch Dermatol**, v. 146, n. 12, p. 1364-9, Dec 2010. ISSN 1538-3652.

RAYCHAUDHURI, S. P.; GROSS, J. Psoriasis risk factors: role of lifestyle practices. **Cutis**, v. 66, n. 5, p. 348-52, Nov 2000. ISSN 0011-4162.

REITZENSTEIN, J. E.; YAMAMOTO, L. G.; MAVOORI, H. Similar erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein sensitivities at the onset of septic arthritis, osteomyelitis, acute rheumatic fever. **Pediatr Rep**, v. 2, n. 1, p. e10, 2010. ISSN 2036-7503.

RICHARD, E. G.; HÖNIGSMANN, H. Phototherapy, psoriasis, and the age of biologics. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, v. 30, n. 1, p. 3-7, Feb 2014. ISSN 1600-0781.

RIZZO, H. L. et al. IL-23-mediated psoriasis-like epidermal hyperplasia is dependent on IL-17A. **J Immunol**, v. 186, n. 3, p. 1495-502, Feb 2011. ISSN 1550-6606.

ROSMARIN, D.; STROBER, B. E. The potential of interleukin 12 inhibition in the treatment of psoriasis. **J Drugs Dermatol**, v. 4, n. 3, p. 318-25, 2005 May-Jun 2005. ISSN 1545-9616.

RUZICKA, T. Methylprednisolone aceponate in eczema and other inflammatory skin disorders - a clinical update. **Int J Clin Pract**, v. 60, n. 1, p. 85-92, Jan 2006. ISSN 1368-5031.

SANCHEZ, A. P. Immunopathogenesis of psoriasis. **An Bras Dermatol**, v. 85, n. 5, p. 747-9, 2010 Sep-Oct 2010. ISSN 1806-4841.

SARACENO, R. et al. Adalimumab in the treatment of plaque-type psoriasis and psoriatic arthritis. **Expert Opin Biol Ther**, v. 13, n. 9, p. 1325-34, Sep 2013. ISSN 1744-7682.

SARACENO, R.; MANNHEIMER, R.; CHIMENTI, S. Regional distribution of psoriasis in Italy. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 22, n. 3, p. 324-9, Mar 2008. ISSN 1468-3083.

SCHEINFELD, N. Adalimumab (HUMIRA): a review. **J Drugs Dermatol**, v. 2, n. 4, p. 375-7, Aug 2003. ISSN 1545-9616.

SCHERNTHANER, G. Pleiotropic effects of thiazolidinediones on traditional and non-traditional atherosclerotic risk factors. **Int J Clin Pract**, v. 63, n. 6, p. 912-29, Jun 2009. ISSN 1742-1241.

SCHMID, R. M.; ADLER, G.; LIPTAY, S. Activation of NFkappaB in inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 43, n. 4, p. 587-8, Oct 1998. ISSN 0017-5749.

SCHMIDT, S. et al. Anti-inflammatory and antiproliferative actions of PPAR-gamma agonists on T lymphocytes derived from MS patients. **J Leukoc Biol**, v. 75, n. 3, p. 478-85, Mar 2004. ISSN 0741-5400.

SCHMITT, J.; WOZEL, G. The psoriasis area and severity index is the adequate criterion to define severity in chronic plaque-type psoriasis. **Dermatology**, v. 210, n. 3, p. 194-9, 2005. ISSN 1018-8665.

SCHWARTZ, A. V.; SELLMEYER, D. E. Thiazolidinedione therapy gets complicated: is bone loss the price of improved insulin resistance? **Diabetes Care**, v. 30, n. 6, p. 1670-1, Jun 2007. ISSN 1935-5548.

SCHÖN, M. P.; BOEHNCKE, W. H. Psoriasis. **N Engl J Med**, v. 352, n. 18, p. 1899-912, May 2005. ISSN 1533-4406.

SENESCHAL, J. et al. Psoriasiform drug eruptions under anti-TNF treatment of arthritis are not true psoriasis. **Acta Derm Venereol**, v. 87, n. 1, p. 77-80, 2007. ISSN 0001-5555.

_____. Psoriasiform eruptions during anti TNF-alpha treatment: psoriasis or not? **Arch Dermatol**, v. 143, n. 12, p. 1593-5; author reply 1595, Dec 2007. ISSN 1538-3652.

SHEPPARD, P. et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. **Nat Immunol**, v. 4, n. 1, p. 63-8, Jan 2003. ISSN 1529-2908.

SHIBATA, S. et al. IL-27 activates Th1-mediated responses in imiquimod-induced psoriasis-like skin lesions. **J Invest Dermatol**, v. 133, n. 2, p. 479-88, Feb 2013. ISSN 1523-1747.

_____. Possible roles of IL-27 in the pathogenesis of psoriasis. **J Invest Dermatol**, v. 130, n. 4, p. 1034-9, Apr 2010. ISSN 1523-1747.

SILVA, M. F. et al. Psoriasis: correlation between severity index (PASI) and quality of life index (DLQI) in patients assessed before and after systemic treatment. **An Bras Dermatol**, v. 88, n. 5, p. 760-3, 2013 Sep-Oct 2013. ISSN 1806-4841.

SINGH, T. P. et al. Platelet-activating factor blockade inhibits the T-helper type 17 cell pathway and suppresses psoriasis-like skin disease in K5.hTGF-β1 transgenic mice. **Am J Pathol**, v. 178, n. 2, p. 699-708, Feb 2011. ISSN 1525-2191.

_____. Involvement of IL-9 in Th17-associated inflammation and angiogenesis of psoriasis. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e51752, 2013. ISSN 1932-6203.

SOOD, V.; COLLERAN, K.; BURGE, M. R. Thiazolidinediones: a comparative review of approved uses. **Diabetes Technol Ther**, v. 2, n. 3, p. 429-40, 2000. ISSN 1520-9156.

SPADARO, A. et al. [The role of interleukin-12 in immune-mediated rheumatic diseases]. **Reumatismo**, v. 54, n. 2, p. 113-21, 2002 Apr-Jun 2002. ISSN 0048-7449.

SPIEGELMAN, B. M. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. **Diabetes**, v. 47, n. 4, p. 507-14, Apr 1998. ISSN 0012-1797.

STICHERLING, M. et al. Interleukin-8 plays its role at local level in psoriasis vulgaris. **Acta Derm Venereol**, v. 79, n. 1, p. 4-8, Jan 1999. ISSN 0001-5555.

STRAUS, D. S.; GLASS, C. K. Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms. **Trends Immunol**, v. 28, n. 12, p. 551-8, Dec 2007. ISSN 1471-4906.

STROBER, B. E. The treatment of psoriasis with etanercept. **Semin Cutan Med Surg**, v. 24, n. 1, p. 28-36, Mar 2005. ISSN 1085-5629.

SWANBECK, G. et al. Age at onset and different types of psoriasis. **Br J Dermatol**, v. 133, n. 5, p. 768-73, Nov 1995. ISSN 0007-0963.

SZABO, P. et al. Comparative analysis of IL-8 and CXCL-1 production by normal and cancer stromal fibroblasts. **Folia Biol (Praha)**, v. 59, n. 3, p. 134-7, 2013. ISSN 0015-5500.

TADA, Y. et al. Interleukin 12 production by monocytes from patients with psoriasis and its inhibition by ciclosporin A. **Br J Dermatol**, v. 154, n. 6, p. 1180-3, Jun 2006. ISSN 0007-0963.

TAKAHASHI, H. et al. Serum cytokines and growth factor levels in Japanese patients with psoriasis. **Clin Exp Dermatol**, v. 35, n. 6, p. 645-9, Aug 2010. ISSN 1365-2230.

TOBIN, A. M.; KIRBY, B. TNF alpha inhibitors in the treatment of psoriasis and psoriatic arthritis. **BioDrugs**, v. 19, n. 1, p. 47-57, 2005. ISSN 1173-8804.

TOBIN, A. M. et al. Natural killer cells in psoriasis. **J Innate Immun**, v. 3, n. 4, p. 403-10, 2011. ISSN 1662-8128.

TOICHI, E. et al. An anti-IL-12p40 antibody down-regulates type 1 cytokines, chemokines, and IL-12/IL-23 in psoriasis. **J Immunol**, v. 177, n. 7, p. 4917-26, Oct 2006. ISSN 0022-1767.

TOJO, G. et al. Systemic Lupus Erythematosus Accompanied by Psoriasis Induces IL-27-Producing Cells in Both Affected Areas of the Skin. **Case Rep Dermatol**, v. 4, n. 2, p. 181-5, May 2012. ISSN 1662-6567.

TOKURA, Y.; MORI, T.; HINO, R. Psoriasis and other Th17-mediated skin diseases. **J UOEH**, v. 32, n. 4, p. 317-28, Dec 2010. ISSN 0387-821X.

TOLLEFSON, M. M. et al. Incidence of psoriasis in children: a population-based study. **J Am Acad Dermatol**, v. 62, n. 6, p. 979-87, Jun 2010. ISSN 1097-6787.

TOLMAN, K. G. The safety of thiazolidinediones. **Expert Opin Drug Saf**, v. 10, n. 3, p. 419-28, May 2011. ISSN 1744-764X.

TONEL, G. et al. Cutting edge: A critical functional role for IL-23 in psoriasis. **J Immunol**, v. 185, n. 10, p. 5688-91, Nov 2010. ISSN 1550-6606.

TRAUB, M.; MARSHALL, K. Psoriasis--pathophysiology, conventional, and alternative approaches to treatment. **Altern Med Rev**, v. 12, n. 4, p. 319-30, Dec 2007. ISSN 1089-5159.

TÖRÖK, L.; KÁDÁR, L.; GEIGER, J. M. Acitretin treatment of severe psoriasis. **Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)**, v. 146, p. 104-6, 1989. ISSN 0365-8341.

TEŚIOROWSKI, M. et al. [Methylprednisolone- acute spinal cord injury, benefits or risks?]. **Postepy Hig Med Dosw (Online)**, v. 67, p. 601-9, 2013. ISSN 1732-2693.

UBRIANI, R.; VAN VOORHEES, A. S. Onset of psoriasis during treatment with TNF- α antagonists: a report of 3 cases. **Arch Dermatol**, v. 143, n. 2, p. 270-2, Feb 2007. ISSN 0003-987X.

UZÉ, G.; MONNERON, D. IL-28 and IL-29: newcomers to the interferon family. **Biochimie**, v. 89, n. 6-7, p. 729-34, 2007 Jun-Jul 2007. ISSN 0300-9084.

VAN DE KERKHOF, P. C. The Psoriasis Area and Severity Index and alternative approaches for the assessment of severity: persisting areas of confusion. **Br J Dermatol**, v. 137, n. 4, p. 661-2, Oct 1997. ISSN 0007-0963.

VARANI, J. et al. Thiazolidinediones: potential as therapeutics for psoriasis and perhaps other hyperproliferative skin disease. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 15, n. 11, p. 1453-68, Nov 2006. ISSN 1744-7658.

VARDY, D. et al. Experiences of stigmatization play a role in mediating the impact of disease severity on quality of life in psoriasis patients. **The British journal of dermatology**, v. 147, n. 4, p. 736-42, Oct 2002. ISSN 0007-0963 (Print) 0007-0963 (Linking).

VICTOR, F. C.; GOTTLIEB, A. B. TNF-alpha and apoptosis: implications for the pathogenesis and treatment of psoriasis. **J Drugs Dermatol**, v. 1, n. 3, p. 264-75, Dec 2002. ISSN 1545-9616.

WAHIE, S. et al. Psoriasis occurring after myeloablative therapy and autologous stem cell transplantation. **Br J Dermatol**, v. 154, n. 1, p. 194-5, Jan 2006. ISSN 0007-0963.

WANG, H.; ZHANG, X.; YANG, S. [Study on the risk factors of psoriasis]. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi**, v. 22, n. 3, p. 215-8, Jun 2001. ISSN 0254-6450.

WANG, W. M. et al. PPAR-gamma agonists inhibit TGF-beta1-induced chemokine expression in human tubular epithelial cells. **Acta Pharmacol Sin**, v. 30, n. 1, p. 107-12, Jan 2009. ISSN 1745-7254.

WELLER, P. A. Psoriasis. **Med J Aust**, v. 165, n. 4, p. 216-21, Aug 1996. ISSN 0025-729X.

WOLK, K. et al. IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN-gamma are not. **J Mol Med (Berl)**, v. 87, n. 5, p. 523-36, May 2009. ISSN 1432-1440.

_____. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. **Eur J Immunol**, v. 36, n. 5, p. 1309-23, May 2006. ISSN 0014-2980.

_____. IL-29 is produced by T(H)17 cells and mediates the cutaneous antiviral competence in psoriasis. **Sci Transl Med**, v. 5, n. 204, p. 204ra129, Sep 2013. ISSN 1946-6242.

WON, H. Y. et al. Anti-allergic function and regulatory mechanisms of KR62980 in allergen-induced airway inflammation. **Biochem Pharmacol**, v. 79, n. 6, p. 888-96, Mar 2010. ISSN 1873-2968.

WONG, T.; HSU, L.; LIAO, W. Phototherapy in psoriasis: a review of mechanisms of action. **J Cutan Med Surg**, v. 17, n. 1, p. 6-12, 2013 Jan-Feb 2013. ISSN 1203-4754.

WOOLACOTT, N. et al. Etanercept and efalizumab for the treatment of psoriasis: a systematic review. **Health Technol Assess**, v. 10, n. 46, p. 1-233, i-iv, Nov 2006. ISSN 2046-4924.

XU, F. et al. IL-27 is elevated in acute lung injury and mediates inflammation. **J Clin Immunol**, v. 33, n. 7, p. 1257-68, Oct 2013. ISSN 1573-2592.

YATURU, S.; BRYANT, B.; JAIN, S. K. Thiazolidinedione treatment decreases bone mineral density in type 2 diabetic men. **Diabetes Care**, v. 30, n. 6, p. 1574-6, Jun 2007. ISSN 1935-5548.

YUAN, Z. Y. et al. PPAR-gamma ligands inhibit the expression of inflammatory cytokines and attenuate autoimmune myocarditis. **Chin Med J (Engl)**, v. 117, n. 8, p. 1253-5, Aug 2004. ISSN 0366-6999.

ZACHARIAE, R. et al. Self-reported stress reactivity and psoriasis-related stress of Nordic psoriasis sufferers. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 18, n. 1, p. 27-36, Jan 2004. ISSN 0926-9959.

ZANOLLI, M. Phototherapy arsenal in the treatment of psoriasis. **Dermatol Clin**, v. 22, n. 4, p. 397-406, viii, Oct 2004. ISSN 0733-8635.

ZHENG, H. F. et al. Variants in MHC, LCE and IL12B have epistatic effects on psoriasis risk in Chinese population. **J Dermatol Sci**, v. 61, n. 2, p. 124-8, Feb 2011. ISSN 1873-569X.

ZHU, M. et al. Anti-inflammatory effects of thiazolidinediones in human airway smooth muscle cells. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 45, n. 1, p. 111-9, Jul 2011. ISSN 1535-4989.

ZINDANCI, I. et al. Prevalence of metabolic syndrome in patients with psoriasis. **ScientificWorldJournal**, v. 2012, p. 312463, 2012. ISSN 1537-744X.

11. Anexos

Anexo 1

Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos

O projeto foi aprovado no CEP-CCS-UFPE

Número do CEP: 528/11

12. Apêndices

12.1. Artigo publicado durante o mestrado

Inflamm. Res. (2014) 63:309–315

DOI 10.1007/s00011-013-0702-4

Title: Simvastatin inhibits cytokines in a dose response in patients with rheumatoid arthritis

Michelly Cristiny Pereira, Pablo Ramon Gualberto Cardoso, Laurindo Ferreira Da Rocha Jr, Moacyr Jesus Barreto Melo Rêgo, Sayonara Maria Calado Gonçalves, Flaviana Alves Santos, Marina Galdino da Rocha Pitta, Andréa Tavares Dantas, Ângela Luzia Branco Pinto Duarte and Maira Galdino Da Rocha Pitta

SIMVASTATIN INHIBITS CYTOKINES IN A DOSE RESPONSE IN PATIENTES WITH RHEUMATOID ARTHRITIS ASSOCIATED TO DISEASE ACTIVITY

M.C.Pereira¹, P. R. G. Cardoso¹, L. F. Rocha-Junior^{1,2}, M. J. B. M. Rêgo¹, A. L. B. P. Duarte²,
M.G.R. Pitta^{1*}

¹ Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), Núcleo de Pesquisa em Inovação Suely Galdino (NUPIT-SG);

² Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFPE

* Address correspondence to Dr. M.G.R. Pitta, UFPE, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife – PE, 50670-901, Brazil. E-mail: mgrpitta@gmail.com

ABSTRACT

Objective. To evaluate the effects of simvastatin in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) cytokines profiles of IL-22, IL-17, INF- γ and IL-6 and associate with disease state of the RA patients.

Methods. Peripheral blood mononuclear cells from 22 RA patients were purified and stimulated or not with phorbol myristate acetate (PMA)/ionomycin and were treated with the statin Simvastatin in different doses. Supernatants were collected after 48 hours and cytokine levels were quantified by ELISA. Patients were assessed for clinical and laboratory variables and correlations of cytokine levels with disease activity measures [Clinical Disease Activity Index (CDAI), Disease Activity Score for 28 joints (DAS28)] and Health Assessment Questionnaire (HAQ).

Results. IL-17, IL-6, IL-22 and IFN- γ were significantly reduced in a dose response after simvastatin treatment. IL-17 and IL-6 cytokines were also significantly reduced in lower concentrations and compared to standard drug. Patients with RA with severe disease (DAS28 and CDAI) had worse response to simvastatin in reduce cytokines levels, mainly for IL-17 and IL-22 cytokines ($p < 0.05$).

Conclusion: Our findings suggest that the simvastatin therapy modulate IL-17, IL-6, IL-22 and IFN- γ in dose dependent manner and its effect is associated with stratification of patients according to disease activity. RA patients in clinical remission, mild or moderate had lower levels of all cytokines analyzed after simvastatin treatment, showing that these patients have better response to treatment.

INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune and inflammatory disease characterized with progressive cartilage and bone destruction of affected joints by chronic synovial inflammation (Pisetsky, 2012). Studies demonstrate an increased cardiovascular (CV) risk associated with RA compared with general population, what explicates the increased mortality and comorbidity of RA patients (Liao, 2013). The chronic systemic inflammation characterizing RA may contribute to the atherosclerotic process accelerating to plaque formation and aortic stiffening (Kaisa, 2007).

Statins, inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase, are widely used for lowering cholesterol and the prevention of cardiovascular diseases. In vitro studies and clinical trials have suggested statins to possess an important role in RA mainly mediated by their anti-inflammatory and immunomodulatory properties (Kanda, 2002; McCarey DW, 2004; Shirinsky, 2008). The effect of atorvastatin in patients with RA was assessed for 6 months on TARA (Trial of Atorvastatin in Rheumatoid Arthritis) study that showed a reduction in inflammatory markers as well a reduction of disease activity after treatment with the statin (McCarey DW, 2004). PBMCs and synovial fibroblasts isolated from RA patients after simvastatin stimulation showed significant reduction of proinflammatory cytokine IL-6 and IFN- γ compared to healthy blood donors (Blaschke, 2009). Two recently studies reported that statins were associated with reduced cardiovascular events and mortality in patients with RA (De Vera MA, 2012; Sheng X, 2012). The aim of the present study was evaluate the effects of simvastatin in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) cytokines profiles of IL-22, IL-17, INF- γ and IL-6 and associate with disease state of the RA patients.

Material and Methods

Patients

RA patient blood samples were obtained from the Department of Rheumatology at Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). A total of 22 patients were evaluated by the presence of four or more American College of Rheumatology (ACR) 1987 diagnostic criteria²⁷. Demographic, clinical and laboratory data were collected from hospital records or by questionnaire and reviewed by experienced physicians. Laboratory features of RA patients such as erythrocyte

sedimentation rate (ESR), rheumatoid factor positivity were recorded. Individual disease activity was quantified using the disease activity score (DAS28)²⁸ and the Clinical Activity Index (CDAI)²⁹. The Health Assessment Questionnaire (HAQ) score was also applied in patients (ref HAQ). Radiographs of hands were obtained from RA patients and evaluated for the presence of erosions by an experienced rheumatologist blinded to the clinical data. All subjects gave their written consent to participate. The study was approved by the ethics committee of the UFPE. The patients' baseline characteristics are summarized in Table 1.

PBMCs purification

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from heparinized blood and were isolated via a standard method of density-gradient centrifugation over Ficoll-Hypaque (GE Healthcare). Cells were counted in a Neubauer chamber, and cell viability was determined by the trypan blue exclusion method. Cells were only used when viability was >98%.

PBMCs cultures

PBMCs (1×10^6 cell/well) from 22 RA patients and 8 healthy volunteers were cultured in 24-well plates (TPP) in RPMI 1640 (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco), HEPES 10mM (Gibco) and penicillin/streptomycin 200U/mL (Gibco) and incubated at 37°C in humidified 5% CO₂ incubator. The cells were stimulated or not with PMA 100 ng/ml (Sigma) and Ionomycin 1µg/ml and were treated with Simvastatin (Sigma). The Metilprednisolone (Pfizer) was used as standard drug. Supernatants were collected after 48 hours and cytokine levels were quantified.

Measurement of serum cytokines levels

Cytokines concentrations in culture supernatants were measured by commercial ELISA kits according to the manufacturer's recommendation. The detection limits for IL-6 (BD Biosciences), IL-17 (Ebioscience), IL-22 (Ebioscience), and IFN- γ (BD Biosciences) were 4.68, 3.90, 15.62 and 4.68 pg/ml respectively. ELISA plates were read at 450nm and 570nm (EL808, Biotek, VT, USA).

Statistical analysis

The Student's t-test and one-way ANOVA were used for statistical analysis and p-values <0.05 were considered to be statistically significant. Values are expressed as the mean $\pm$ SD of three or more replicate experiments.

Table 1. Clinical Parameters of RA patients

Characteristic	
Patients	22
Sex, F/M	20/2
Age (years), mean (range)	51.4 (32-75)
Disease duration (years), median (range)	4 (0.08-26.25)
DAS, mean (range)	5.5 (2.48-7.84)
Rheumatoid factor (%)	
Positive	17 (77.27)
Negative	5 (22.72)
Radiological erosions (%)	
Present	11 (57.89)
Absent	8 (42.10)
Treatment (%)	
Nonsteroidal antiinflammatory drugs	1 (4.54)
Steroids	20 (90.90)
Methotrexate	12 (54.54)
Leflunomide	5 (22.72)
Antimalarial agents	1 (4.54)
Biologic therapy	0
Disease activity (%)	
Disease Activity Score 28 joints	
Clinical remission	2 (9.09)
Mild disease	2 (9.09)
Moderate disease	6 (27.27)
Severe disease	12 (54.54)
CDAI	
Clinical remission	1 (4.54)
Mild disease	5 (22.72)
Moderate disease	8 (36.36)
Severe disease	8 (36.36)

Results

PBMCs purified from RA patients following stimulation with PMA and Ionomycin were treated with different Simvastatin doses and with Metilprednisolone as standard drug. Figure 1 shows a decline in cytokines production after treatment with Simvastatin. It was

a significant decrease in IL-17 level concentration dependent of Simvastatin with a great decline at 10 ($p=0.018$) and 50 μM ($p=0.0005$) (Figure 1A). We also observed that the dose of 50 μM had the best effect on the reduction of IL-17 compared to Metilprednisolone ($p=0.007$). Similar results were found for the other cytokines evaluated. We found a significant reduction in IL-6 ($p<0.0001$; Figure 1B), IL-22 ($p<0.02$; Figure 1C) and IFN- γ ($p=0.0005$; Figure 1D) levels after treatment with 50 μM of simvastatin compared to cells only stimulated with PMA and Ionomycin. This reduction was also significant for IL-6 compared to standard drug at 50 μM of simvastatin ($p=0.0001$). We did not find significance compared to Metilprednisolone for IL-22 and INF- γ cytokines.

Next we analyzed the effect of simvastatin at cytokine profile correlating with disease activity. There was significant correlation for IL-17 and IL-22 levels among the scores for DAS28 ($p=0.03$; $p=0.039$, respectively) (Figure 2A and 2E). It was observed that patients with RA with severe disease had worse response to simvastatin in reduce cytokines levels. The same profile was observed for other cytokines, however without significance. Regarding to Clinical Disease Activity Index (CDAI), it was observed that patients with RA in clinical remission, mild or moderate had lower levels of all cytokines analyzed after treatment with simvastatin compared to patients with severity of disease (Figure 2).

We also assessed associations of simvastatin treatment and Health Assessment Questionnaire (HAQ) score. RA patients with higher HAQ score had the largest levels of cytokines after treatment of simvastatin (Figure 3). In fact, these patients with higher HAQ were less responsive to treatment, although no significance was found.

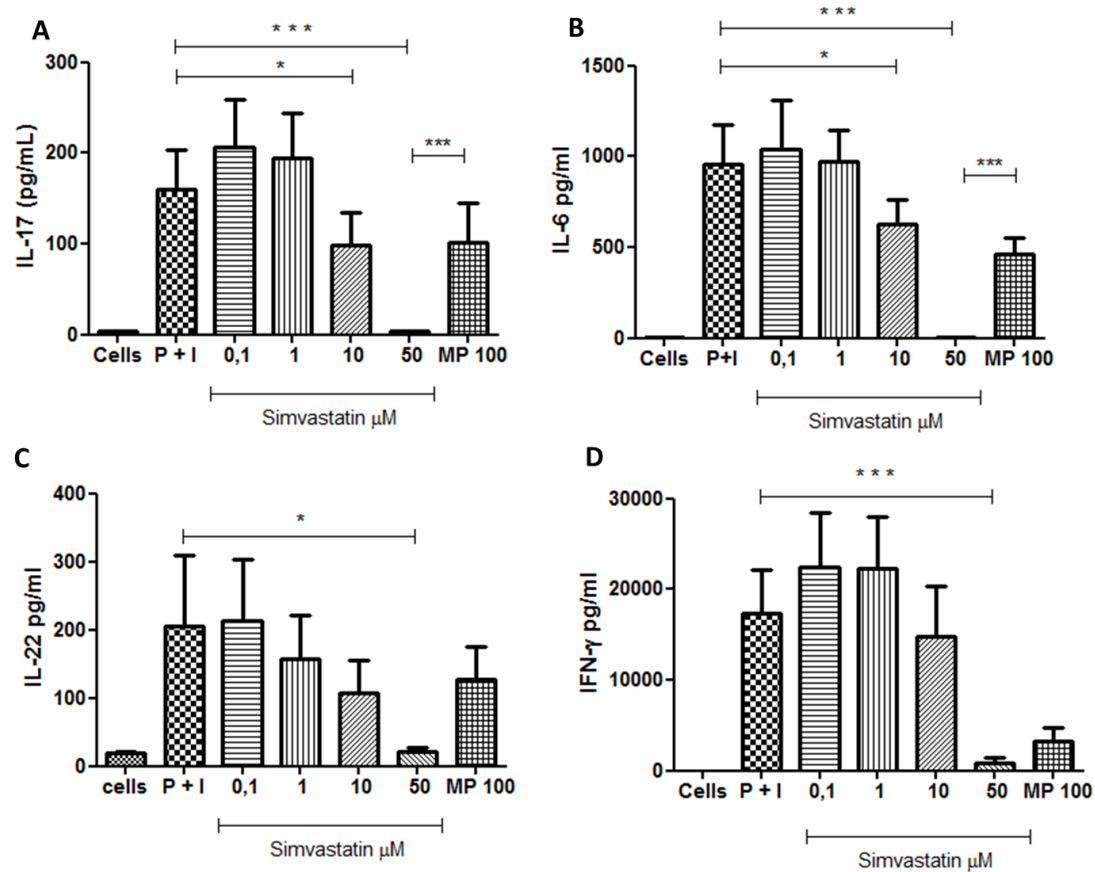


Figure 1. Effects of simvastatin on cytokines profile in AR patients. PBMCs from RA patients following stimulation with PMA and Ionomycin were treated with different Simvastatin doses and with Metilprednisolone as standard drug.

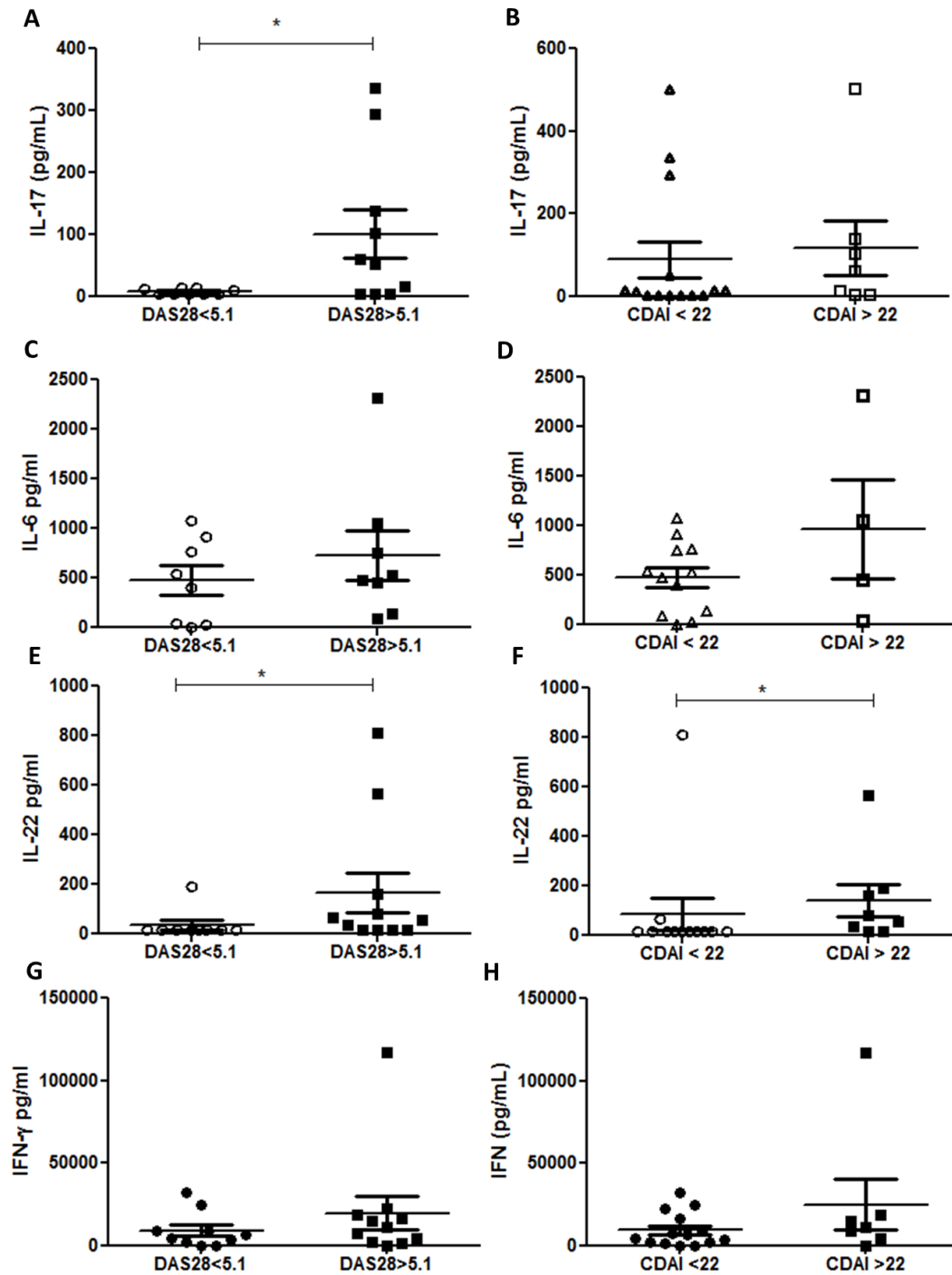


Figure 2. Correlation between cytokine levels from patients with rheumatoid arthritis treated with 10 μ M of Simvastatin and Disease Activity Score for 28 joints (A; C; E; G) and Clinical Disease Activity Index (B; D; F; H).

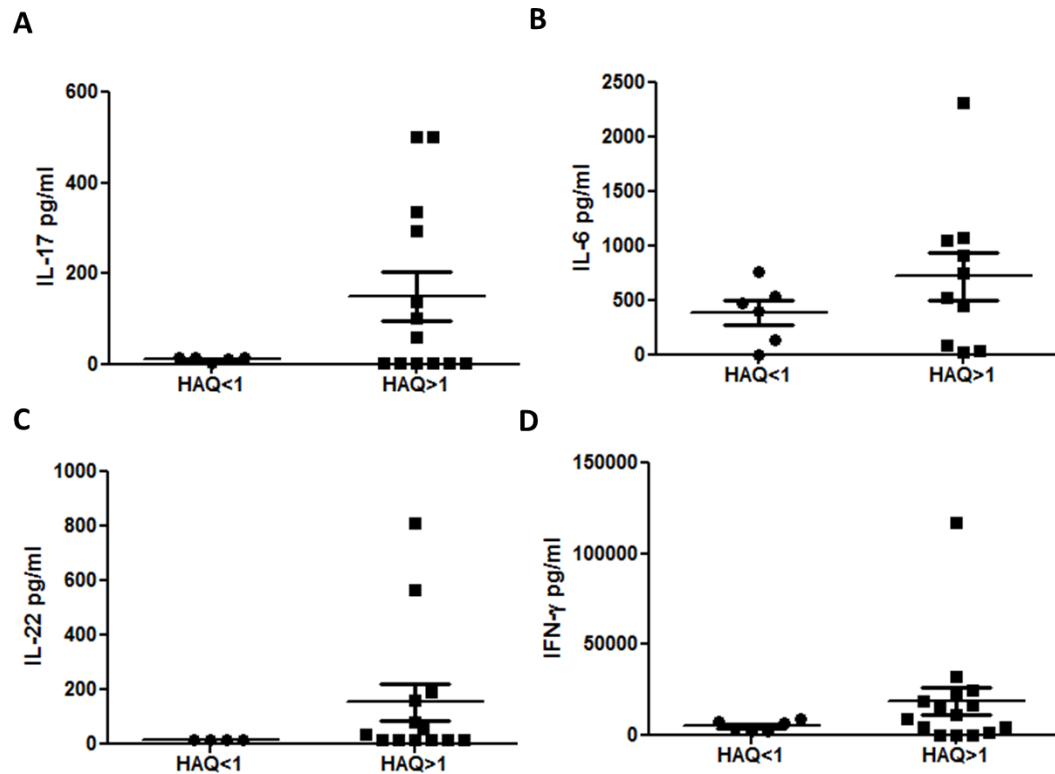


Figure 3. Correlation between cytokine levels from RA patients treated with 10 μ M of Simvastatin with Health Assessment Questionnaire (HAQ) score.

Discussion

In this study the most of patients analyzed has moderate or severe disease based on score analysis for DAS28. Experimental studies and clinical trials have strongly suggested statins to possess an important role in RA mainly mediated by their anti-inflammatory and immunomodulatory properties. However it was not yet demonstrated the predictive value of statins regarding disease activity of rheumatoid arthritis. We decided to investigate the role simvastatin on cytokines immunomodulation in RA patients and correlate to disease activity.

We found that IL-22, IL-6, IL-17 and IFN- γ levels were marked decreased after treatment with simvastatin a dose dependent manner. Our results correspond well with previous studies, which have shown that circulating IL-17 was decreased after simvastatin treatment and IL-6 levels were reduced only in the responder group. No differences were found related to IFN- γ (Shirinsky et al 2008). However this last study had a different approach directly treating patients with simvastatin.

Many others studies have demonstrated the statins effects in rheumatoid arthritis (Blaschke et al., 2009; McCarey et al., 2004; Lazzerini et al., 2007). IL-6 and IL-8 cytokines had a dose dependent reduction by simvastatin in culture supernatants of synoviocytes obtained from RA patients (Yokota et al., 2006; Lazzerini et al., 2007). The findings of the study by Blaschke et al, showed that PBMCs from RA patients treated with Atorvastatin have IFN- γ diminished but no significant changes were detected for IL-10 and IL-4 cytokines. The same work also demonstrated a significant reduction in IL-6 and IL-8 mRNA transcript levels and in cell culture supernatants within Atorvastatin-stimulated synoviocytes cultures. For the first time our findings showed that IL-22 and IL-17 levels were significantly reduced by simvastatin in RA patients with lower disease activity. For all cytokines evaluated we observed that patients with severe activity of disease (DAS28 >5.1 and CDAI >22) respond less to simvastatin treatment. Corroborating this finding we also observed the same trend for patients with higher HAQ. Patients with higher HAQ generally have a worse prognosis and responded less to simvastatin in terms of decreased cytokine. Several studies have shown the effect of simvastatin in disease activity of RA patients. Patients that have received atorvastatin were followed up over 6 months and DAS28 improved significantly compared to placebo group (McCarey et al., 2004). Disease activity also decreased significantly by atorvastatin in another study (Tang, 2011). Recently, Kumar et al (2012) found no difference between rosuvastatin and placebo groups in rheumatoid disease activity.

B cells, T cells, and the orchestrated interaction of pro-inflammatory cytokines play key roles in the pathophysiology of RA. In our study simvastatin at both doses (10 and 50 μ M) significantly inhibited IL-17 and IL-6 cytokines. IL-17 has been suggested to play an important role in the pathogenesis of RA, promoting synovitis (Lubberts, 2008; Choy, 2012). Joint-specific mesenchymal cells contribute to the Th17-mediated augmentation of the inflammatory phase in RA by promoting the migration of Th17 cells to the inflammatory joint and then homeostatic proliferation with increase in IL-17 production (Komatsu, 2012). IL-6 in turn is also one of the key cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, inducing osteoclast-like cell formation, which is responsible for joint destruction (Kotake, 1996). Although preliminary, for the first time we demonstrated that simvastatin reduced IL-22 levels in PBMCs from RA patients. A previous study of our group analyzed IL-22 levels in RA patients and found that this cytokine was increased compared to healthy individuals. Additionally it was shown that

high levels of this cytokine were correlated with DAS28, CDAI and bone destructive disease (Rocha et al., 2012).

In conclusion, our findings suggest that the simvastatin therapy modulate IL-17, IL-6, IL-22 and IFN- γ in dose dependent manner and its effect is associated with stratification of patients according to disease activity. Further studies will be necessary to elucidate the molecular mechanisms.

Acknowledgements

This work was supported by Facepe (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco).

References

Blaschke S, Viereck V, Schwarz G, Klinger HM, Guerluek S, Müller GA. Anti-inflammatory effects of atorvastatin on peripheral blood mononuclear cells and synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*.2009;38(4):235-9.

Pisetsky DS, Ward MM. Advances in the treatment of inflammatory arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2012 Apr;26(2):251-61. doi:10.1016/j.berh.2012.03.001.

Luan Z, Chase AJ, Newby AC. Statins inhibit secretion of metalloproteinases-1,-2, -3, and -9 from vascular smooth muscle cells and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 May 1;23(5):769-75. Epub 2003 Mar 27

Kanda H, Yokota K, Kohno C, Sawada T, Sato K, Yamaguchi M, Komagata Y, Shimada K, Yamamoto K, Mimura T. Effects of low-dosage simvastatin on rheumatoid arthritis through reduction of Th1/Th2 and CD4/CD8 ratios. *Mod Rheumatol*. 2007;17(5):364-8. Epub 2007 Oct 19.

McCarey DW, McInnes IB, Madhok R, Hampson R, Scherbakov O, Ford I, Capell HA, Sattar N. Trial of Atorvastatin in Rheumatoid Arthritis (TARA): double-blind, randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2004 Jun 19;363(9426):2015-21.

McCarey DW, Sattar N, McInnes IB. Do the pleiotropic effects of statins in the vasculature predict a role in inflammatory diseases? *Arthritis Res Ther*.2005;7(2):55-61.

Lazzerini PE, Lorenzini S, Selvi E, Capecchi PL, Chindamo D, Bisogno S, Ghittoni R, Natale MR, Caporali F, Giuntini S, Marcolongo R, Galeazzi M, Laghi-Pasini F. Simvastatin inhibits cytokine production and nuclear factor-K β activation in interleukin 1 β -stimulated synoviocytes from rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol*. 2007 Sep-Oct;25(5):696-700.

Yokota K, Miyazaki T, Hirano M, Akiyama Y, Mimura T. Simvastatin inhibits production of interleukin 6 (IL-6) and IL-8 and cell proliferation induced by tumor necrosis factor- α in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2006 Mar;33(3):463-71.

Sheng X, Murphy MJ, Macdonald TM, Wei L. Effectiveness of statins on totalcholesterol and cardiovascular disease and all-cause mortality in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2012 Jan;39(1):32-40.

De Vera MA, Choi H, Abrahamowicz M, Kopec J, Lacaille D. Impact of statin discontinuation on mortality in patients with rheumatoid arthritis: a population-based study. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2012 Jun;64(6):809-16.

28. Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995; 38:44-8.

29. Aletaha D, Nell VP, Stamm T, Uffmann M, Pflugbeil S, Machold K, et al. Acute phase reactants add little to composite disease activity indices for rheumatoid arthritis: Validation of a clinical activity score. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R796-806.

Kumar P, Kennedy G, Khan F, Pullar T, Belch JJ. Rosuvastatin might have an effect on C-reactive protein but not on rheumatoid disease activity: Tayside randomized controlled study. *Scott Med J*. 2012 May;57(2):80-3.

Tang TT, Song Y, Ding YJ, Liao YH, Yu X, Du R, Xiao H, Yuan J, Zhou ZH, Liao MY, Yao R, Jevall H, Shi GP, Cheng X. Atorvastatin upregulates regulatory T cells and reduces clinical disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *J Lipid Res*. 2011 May;52(5):1023-32.

Choy E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2012 Jul;51 Suppl 5:v3-11.

Komatsu N, Takayanagi H. Autoimmune arthritis: the interface between the immune system and joints. *Adv Immunol*. 2012;115:45-71.

Lubberts E. IL-17/Th17 targeting: on the road to prevent chronic destructive arthritis? *Cytokine*. 2008 Feb;41(2):84-91.

Kotake S, Sato K, Kim KJ, Takahashi N, Udagawa N, Nakamura I, Yamaguchi A, Kishimoto T, Suda T, Kashiwazaki S. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation.

27 Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1988 Mar;31(3):315-24.

12.2. Apêndice 2: Ficha clínica para seleção de pacientes com Pso

Ficha Clínica para recrutamento dos pacientes com Psoríase



Ambulatório de Psoríase e APso
Atendimento inicial

Paciente: _____ Registro: _____
Data de Nascimento: _____ Idade: _____ Sexo: _____
Data: _____
Endereço: _____ -
Telefones: _____

RAÇA: BRANCA (1) NEGRA (2) PARDA (3) INDÍGENA (4) AMARELA (5)

ESCOLARIDADE:

☐ Analfabeto(a) (1) ☐ 1º Grau Completo (2) ☐ 1º Grau Incompleto (3)
☐ 2º Grau Completo (4) ☐ 2º Grau Incompleto (5) ☐ 3º Grau Completo (6) ☐ 3º Grau Incompleto (7)

RENDA FAMILIAR:

☐ até 1 Salário Mínimo (1) ☐ 1-3 Salários Mínimos (2)
☐ 4-10 Salários Mínimos (3) ☐ >10 salários mínimos (4)

HISTÓRIA FAMILIAR DE PSORÍASE?

Primeiro grau:

☐ Sim; Quantos? _____ Qual doença? _____ ☐ Não

Segundo grau:

☐ Sim; Quantos? _____ Qual doença? _____ ☐ Não

Incapacidade laboral?

☐ Não ☐ transitória ☐ parcial ☐ total

Comorbidades:

Hipertensão arterial Sistêmica? ☐ SIM; ☐ NÃO

Se a resposta for SIM:

Faz uso de medicação anti-hipertensiva? ☐ SIM ☐ NÃO

História prévia de Doença cardiovascular?

☐ Sim (1), Qual? _____ ☐ Não

História prévia de Doença cardiovascular na família?

Primeiro grau:

☐ Sim; Quantos? _____ Qual a idade? _____ ☐ Não

Segundo grau:

☐ Sim; Quantos? _____ Qual a idade? _____ ☐ Não

INFECÇÕES DE REPETIÇÃO

☐ NÃO ☐ SIM; Sítio: _____

DIABETES

☐ NÃO ☐ SIM;

TIREOIDOPATIAS
☐ NÃO ☐ SIM;
OUTRAS ENDOCRINOPATIAS _____**TABAGISMO?**
☐ Sim; Cigarros/dia _____ ☐ Não
☐ Ex Cigarros/dia _____ Tempo: _____ anos Inativo: _____ anos
PRATICA ATIVIDADE FÍSICA ATUALMENTE?
☐ Sim; Com que frequência? _____/semana
 Que tipo de atividade (s) física? _____
☐ Não
ETILISMO:
☐ NÃO ☐ SIM; Frequência: _____
MEDICAMENTOS EM USO ATUAL OU ANTERIOR (Olhar também o prontuário)

DROGA	DOSE ATUAL	DATA DE INÍCIO	DATA DE TÉRMINO
1. Prednisona			
2. Metotrexato			
3. Acitretina			
4. Leflunomida			
5. Infliximabe			
6. Adalimumabe			
7. Etanercepte			
8. Sulfassalazina			
9. AINE > OU IGUAL A 50% DO TEMPO? ☐ Sim ☐ Não Por demanda? ☐ Sim ☐ Não			
10. Estatinas			
11. Anti-hipertensivos			
12. CE topico			
13. Outras			

PSORRIASE

Data de início dos sintomas: ____/____/____

Δt = _____ (anos, meses, etc.)

Data do diagnóstico: ____/____/____

Comprometimento Ungueal _____

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							
Descamação							
Área Real (%)	0	1 - 9	10 - 29	30 - 49	50 - 69	70 - 89	90 - 100

