

Sandro Cecílio Furiati

Avaliação imunológica do sangue periférico em
pacientes com Psoríase em Placas Grave sem e
com uso de medicações sistêmicas e
imunobiológicas

Uberaba

2017

Sandro Cecílio Furiati

Avaliação imunológica do sangue periférico em
pacientes com Psoríase em Placas Grave sem e
com uso de medicações sistêmicas e
imunobiológicas

Dissertação apresentada a
Universidade de Uberaba, para a
obtenção de Título de Mestre em
Odontologia, na Área de
Concentração em Biopatologia.

Orientador(a): Denise Bertulucci
Rocha Rodrigues

Uberaba
2017

RESUMO

Introdução: A Psoríase é uma doença inflamatória crônica, imunomediada, recidivante e hiperproliferativa da pele. O papel do sistema imune adaptativo, especialmente dos linfócitos T, sempre foi tido como predominante na imunopatogênese da psoríase. Porém o papel do sistema imune inato tem ganhado destaque, sendo o responsável pelo início do estímulo inflamatório, enquanto o sistema imune adaptativo, pela sua manutenção. Na imunopatogênese da psoríase os queratinócitos lesado, liberam TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IFN γ , citocinas importantes para ativar células do sistema imune inato. Entretanto, quando as células dendríticas entram em contato com os linfócitos T virgens, secretam citocinas como TNF- α , IL-12 e IL-23 que induzem a diferenciação desses linfócitos em Th1 ou Th17. Começa então a fase de atuação do sistema imune adaptativo. Esses linfócitos diferenciados migram para a pele onde o LTh1 libera TNF- α e IFN- γ e o Th17 libera principalmente IL-17A, IL-6, IL-22 e também TNF- α , que são responsáveis pelo processo inflamatório instalado no local. Entretanto, as células Tregs, identificados como CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, tem um papel fundamental na homeostase da imunidade dos tecidos e na auto tolerância e existem teorias a respeito do mal funcionamento dos Tregs na psoríase. O entendimento da imunopatogênese da psoríase permitiu uma revolução no tratamento da doença, sendo possível o desenvolvimento de drogas com alvos bem mais específicos dentro da cascata inflamatória. **Objetivo:** Avaliar o perfil da resposta imune adaptativa em pacientes com psoríase sem e com tratamento com imunobiológico. **Metodologia:** Foram avaliados 32 pacientes com psoríase e 10 do grupo controle. No grupo de pacientes com psoríase 10 estavam em tratamento com imunobiológicos (IB), 14 com uso de metotrexate (MTX) e 8 estavam sem tratamento (ST), no momento da coleta do sangue. Foram analisada IL-17, IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-2 e IL-10 pelo o método do CBA, no sobrenadante de cultura de PBMC por 48 horas sem estímulo, em presença de meio (basal) e com estímulo na presença de anti-CD3/anti-CD28 (anti-CD3/anti-CD28). Os marcadores de ativação celular (CD69⁺CD4⁺) e a expressão de citocinas intracelulares nos linfócitos T foram analisados por citometria de fluxo antes do pulso terapêutico (coleta 1) e no meio do pulso terapêutico (coleta 2). A análise estatística foi realizada por meio do programa *Statview* e os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. **Resultados:** No presente estudo, foi observado que, o estímulo com anti-CD3/anti-CD28, foi capaz de elevar significativamente a produção de IL-17, IFN- γ , TNF- α e IL-10, apenas na primeira coleta realizada antes do pulso terapêutico com Imunobiológico. Observou-se ainda que os linfócitos TCD4⁺/CD69⁺ em condição de estímulo foram significativamente maior antes do pulso com o imunobiológico e houve um aumento significativo no percentual de células produtoras de IFN- γ em condição de estímulo antes do pulso terapêutico. O estímulo também leva a um aumento significativo de linfócitos TCD4⁺ com fenótipo de Tregulador (TCD25^{hi}+FoxP3⁺LAP⁺) antes do paciente iniciar a terapia com o imunobiológico. Células estimuladas de pacientes com psoríase, tratados ou não, produzem níveis significativamente menores de TNF- α . Independente do tratamento, pacientes com psoríase produzem significativamente menos IL-10 após estímulo.

Entretanto, o tratamento com metotrexate e imunobiológico reduzem significativamente a produção estimulada de IL-6. O tratamento com IB diminuiu a produção de IL-2. Ainda, pacientes em tratamento com metotrexate e imunobiológico, quando comparados ao grupo controle saudável reduzem significativamente a ativação de linfócitos T CD4. E o tratamento com metotrexate interfere na geração nas células T com fenótipo Tregulador. **Conclusão:** O tratamento com imunobiológicos e metotrexate modulam a produção de citocinas envolvidas na resposta imune de perfil Th1 e Th17.

ABSTRACT

Introduction: Psoriasis is a chronic, immune-mediated, recurrent, and hyperproliferative inflammatory disease of the skin. The role of the adaptive immune system, especially T lymphocytes, has always been considered as predominant in the immunopathogenesis of psoriasis. However the role of the innate immune system has gained prominence, being responsible for the beginning of the inflammatory stimulus, while the adaptive immune system, for its maintenance. In the immunopathogenesis of psoriasis the injured keratinocytes release TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IFN γ , important cytokines to activate cells of the innate immune system. However, when dendritic cells come in contact with virgin T lymphocytes, they secrete cytokines such as TNF- α , IL-12 and IL-23 that induce the differentiation of these lymphocytes into Th1 or Th17. Then begins the phase of the adaptive immune system. These differentiated lymphocytes migrate to the skin where LTh1 releases TNF- α and IFN- γ and Th17 releases mainly IL-17A, IL-6, IL-22 and also TNF- α , which are responsible for the inflammatory process installed locally. However, Treg cells, identified as CD4 + CD25 + Foxp3⁺, play a key role in the homeostasis of tissue immunity and in self tolerance, and there are theories regarding the malfunction of Tregs in psoriasis. The understanding of the immunopathogenesis of psoriasis allowed a revolution in the treatment of the disease, being possible the development of drugs with much more specific targets within the inflammatory cascade. **Objective:** To evaluate the adaptive immune response profile in psoriasis patients with and without immunobiological treatment. **Methodology:** we evaluated xxx patient with psoriasis and 10 of the control group. In the group of patients with psoriasis 09 who were being treated with immunobiological (IB), 10 with methotrexate (MTX) and 04 were without treatment (ST) at the time of blood collection. IL-17, IFN- γ , TNF- γ , IL-6, IL-2 and IL-10 were analyzed by the CBA method in the PBMC culture supernatant for 48 hours without stimulation in the presence of medium (basal) and with stimulation in the presence of anti-CD3 / anti-CD28 (anti-CD3 / anti-CD28). Cellular activation markers (CD69 + CD4 +) and expression of intracellular cytokines on T lymphocytes were analyzed by flow cytometry before the therapeutic pulse (collection 1) and in the therapeutic pulse medium (collection 2).

Statistical analysis was performed using the Statview program and the results were considered statistically significant when $p < 0.05$. **Results:** In the present study, it was observed that the anti-CD3 / anti-CD28 stimulation was able to significantly increase the production of IL-17, IFN- γ , TNF- α and IL-10, only in the first collection performed before pulse therapy with Immunobiological. It was also observed that the CD4 + / CD69 + lymphocytes in stimulus condition were significantly higher before the pulse with the immunobiological and there was a significant increase in the percentage of IFN-producer producing cells in the stimulation condition before the therapeutic pulse. The stimulation

also leads to a significant increase in TCD4 + lymphocytes with Tregulador phenotype (TCD25hi + FoxP3 + LAP +) before the patient initiates the immunobiological therapy. Stimulated cells from psoriasis patients, treated or not, produce significantly lower levels of TNF- α . I regardless of the treatment, patients with psoriasis produce significantly less IL-10 after stimulation. However, methotrexate and immunobiological treatment significantly reduce the stimulated production of IL-6. Treatment with IB decreased IL-2 production. Furthermore, patients on methotrexate and immunobiological treatment, when compared to the healthy control group, significantly reduce the activation of CD4 T lymphocytes. And treatment with methotrexate interferes in generation in T cells with Tregulador phenotype. **Conclusion:** Treatment with immunobiological and methotrexate modulate the production of cytokines involved in the Th1 and Th17 profile immune response.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	07
1.1 Linfócitos T reguladores (TREGS).....	12
1.2 Critérios de Gravidade.....	12
1.3 Medicções Imunobiológicas ou Biológicas.....	13
1.4 Hipótese.....	15
1.4.1. Objetivo Geral.....	15
1.4.2. Objetivo específico.....	15
2 MATERIAL E MÉTODO.....	16
2.1 Amostra para estudo imunológico.....	16
2.2 População de estudo	16
2.3 Amostra.....	16
2.4 Critérios de inclusão no estudo.....	17
2.5 Critérios de exclusão.....	18
2.6 Metodologia para dosagem de citocinas.....	18
2.6.1 Cultura Celular.....	18
2.6.2 Citometria de fluxo para análise da expressão de moléculas de superfície, citocinas e fatores de transcrição.....	19
2.6.3 Dosagem de citocinas no sobrenadante por CBA.....	20
2.7 Análise estatística.....	21
3 RESULTADOS.....	22
3.1 Legendas.....	26
Figura 1.....	26
Figura 2.....	28
Figura 3.....	30
Figura 4.....	33
4 DISCUSSÃO.....	36
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	42
6 CONCLUSÃO.....	43
7 REFERÊNCIAS.....	44

INTRODUÇÃO

A Psoríase é uma doença inflamatória crônica, imunomediada, recidivante e hiperproliferativa da pele. Tem uma predisposição genética importante e acomete em torno de 2 a 3% da população mundial. (GRINE et al., 2015).

O papel do sistema imune adaptativo, especialmente dos linfócitos T, sempre foi tido como predominante na imunopatogênese da psoríase. Porém hoje, o papel do sistema imune inato tem ganhado destaque sendo tão importante quanto o sistema imune adaptativo. Existe portanto uma interação entre sistema imune inato e adaptativo, entre epiderme e tecido conjuntivo que envolve uma complexa rede de células e mediadores inflamatórios atuando sinergicamente na indução e manutenção do processo inflamatório (SCHÖN, BOEHNCKE, 2005). As lesões cutâneas da psoríase consistem em placas eritemato escamosas, bem delimitadas e endurecidas. Costumam acometer mais comumente superfícies extensoras e couro cabeludo. Possui uma extensão de acometimento corporal variável intercalando períodos de agudizações e remissões (PARISI et al. 2013).

Além dessa forma cutânea, que está presente em torno de 80% das pessoas acometidas, a psoríase também pode acometer as articulações e está associada a várias outras comorbidades como doenças cardiovasculares, obesidade, hipertensão, diabetes, redução na qualidade de vida, depressão entre outras. (GARCIA-DIEZ et al. 2008; MACHADO-PINTO et al., 2016). Os mecanismos exatos de desencadeamento da psoríase ainda são incertos. Porém fatores ambientais como infecções, estresse, alcoolismo e uso de alguns medicamentos são fatores sabidamente desencadeantes naqueles indivíduos com predisposição genética (DIKA et al., 2007)

Aproximadamente um terço dos pacientes com psoríase vulgar possuem um quadro moderado a grave com acometimento de mais de 10% da superfície corpórea. São esses pacientes que precisam, geralmente, de medicações sistêmicas incluindo os imunobiológicos (SATVEER et al., 2016).

A imunopatogênese da psoríase pode ser dividida em duas fases, uma de indução com a iniciação da resposta inflamatória e uma fase de manutenção dessa resposta. Hoje sabe-se que a fase de iniciação da psoríase acontece quando fatores ambientais específicos como, traumas na pele, infecções, uso de algumas medicações, entre outras,

levam ao estresse, injúria ou morte de queratinócitos. Esses queratinócitos lesados liberam moléculas capazes de ativar células do sistema imune inato (células dendríticas mielóides e plasmocitóides, neutrófilos, monócitos, histiócitos e os próprios queratinócitos). (LANDE, 2007; NESTLE et al., 2009). Em indivíduos geneticamente suscetíveis, as células do sistema imune inato, quando ativadas por essas moléculas, liberam citocinas como TNF- α (Fator de Necrose Tumoral alfa), IL-1 β (Interleucina 1 beta), IL-6 (Interleucina 6) e Interferons do tipo I (IFN- α and- β). Essas citocinas por sua vez, atuam diretamente na ativação das células dendríticas mielóides (CDms). Essas células são as responsáveis por fazer a ponte entre sistema imune inato e adaptativo na psoríase. Além de secretarem citocinas importantes na inflamação, são elas que migram para os linfonodos regionais para induzir a diferenciação dos linfócitos T. Quando as CDms entram em contato com os linfócitos T virgens, secretam citocinas como TNF- α , IL-12 e IL-23 que induzem a diferenciação desses linfócitos em Th1 ou Th17. Começa então a fase de atuação do sistema imune adaptativo. (COIMBRA et al., 2012; KHANDPUR; BHARI, 2013). Esses linfócitos diferenciados migram para a pele onde liberam suas citocinas padrões. Th1 liberando TNF- α e IFN- γ e Th17 liberando principalmente IL-17A, IL-6, IL-22 e também TNF- α . Essas citocinas induzem a produção de vasodilatadores e moléculas de adesão em células endoteliais, promovem o recrutamento e ativação de mais células do sistema imune inato e adaptativo para o local da inflamação como neutrófilos, monócitos, células dendríticas plasmocitóides e mielóides, linfócitos TCD4 e CD8. Essas citocinas também induzem a neovascularização, a hiperproliferação, hiperplasia e ativação dos queratinócitos. Esses, por sua vez, liberam mais citocinas inflamatórias e fatores quimiotáticos para recrutamento de mais células do sistema imune inato e adaptativo. Mantem-se assim uma cascata inflamatória sempre ativa. (NESTLE et al., 2009). Em resumo, pode-se dizer que o sistema imune inato é o responsável pelo início do estímulo inflamatório e o sistema imune adaptativo pela manutenção do mesmo. (LOWES et al, 2007; LANDE, 2007; GANGULY et al., 2009; COIMBRA et al., 2012; RONHOLT; IVERSEN, 2017)

É fato, portanto, que os sistemas imunes inato e adaptativo são importantes no desenvolvimento da psoríase. Porém, pelo papel preponderante do sistema imune adaptativo na manutenção do processo inflamatório, considera-se ainda que a psoríase

seja uma doença predominantemente mediada por linfócitos T, em específico as linhagens Th1/Th17. As células Th17 são abundantemente encontradas nas lesões de psoríase seguidas das Th1. Costumava-se pensar que a presença de células Th1 pudessem suprimir as células Th17, mas hoje sabe-se que elas têm papel coadjuvantes nas lesões (KRYCZEK et al., 2008). São as citocinas produzidas por essas duas linhagens que são as grandes orquestradoras do processo inflamatório na doença. Vale dar destaque as principais:

IFN- γ - A principal fonte dessa citocina são os linfócitos Th1, que secretam também TNF- α . Células dendríticas (CDs) e Natural Killers (NK) também são fontes menores dessa citocina (BARKER et al., 2015). O IFN- γ estimula a liberação de IL-1 e IL-23 pelas CDms, e essas citocinas por sua vez, estimulam a ativação e diferenciação de Th17. (KRYCZEK et al., 2008). Além disso, mostrou ter um papel sinérgico junto a IL-17 na estimulação dos queratinócitos na psoríase. Queratinócitos tratados com IL-17 produziram muito mais GM-SCF (Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos) quando associados ao IFN- γ do que quando estimulados com IFN- γ apenas (NESTLE et al, 2005).

IFN tipo I- Os principais membros dessa família são os IFN- α e IFN- β . Já é bem conhecido o papel dessas citocinas na proteção contra agentes virais. É muito usado em tratamentos contra hepatite B e C. Também já é descrito a indução ou exacerbação de lesões de psoríase em pacientes que precisam utilizar IFN tipo I. O papel dessas citocinas na psoríase parece estar relacionado nas fases iniciais da doença. A principal fonte de INF tipo I são as células dendríticas plasmocitóides (CDps), muito abundantes na pele de pacientes psoriásicos. Os CDps são estimuladas a produzir INF tipo I através da liberação de moléculas, como peptídeos antimicrobianos (LL37 pex.), pelos queratinócitos lesados. Os IFN tipo I liberados, auxiliam na maturação das CDms e na diferenciação de células Th1 e Th17, por consequência, importantes também na modulação dos níveis de IFN- γ e IL-17 (NESTLE et al., 2005; SANTINI et al., 2011).

TNF- α - É uma das principais e mais abundantes citocinas inflamatórias. É produzida por quase todas as células do sistema imune tanto inato quanto adaptativo como macrófagos, queratinócitos e linfócitos (Th1, Th17, Th22). Os níveis circulantes de TNF- α , e de outras citocinas como INF-gama e IL-17A, mostram relação direta com a severidade da psoríase (ARICAN et al., 2005). O TNF- α possui vários papéis importantes em todas as fases do processo inflamatório. No sistema imune inato sua principal função é regular a habilidade das células dendríticas, especialmente a mielóide, na ativação dos linfócitos (SUMMERS DE LUCA, GOMMERMAN, 2012). Induz a expressão de inúmeros mediadores inflamatórios, citocinas e quimiocinas capazes de amplificar a inflamação. Esses estímulos, na psoríase, levam, entre outras coisas, a hiperproliferação de queratinócitos, recrutamento de CDms, linfócitos Th17 e neutrófilos para o local da inflamação. O TNF- α também possui efeito quimiotático para monócitos e células T para a pele, o que aumenta a produção de IL-23 pelas CDs elevando-se, por consequência, outras citocinas relevantes na imunopatogênese da psoríase como por exemplo a IL-17A (SATVEER et al., 2016; SUMMERS DE LUCA, GOMMERMAN, 2012). Toda essa engrenagem inflamatória parece estar conectada, pois a supressão do eixo IL-23/Th17 por meio de medicações que bloqueiam essas vias, como os imunobiológicos, levam a diminuição também dos níveis de TNF- α (ZABA et al., 2007).

IL-23 - A descoberta da IL-23 no ano 2000 foi um marco fundamental para o atual entendimento da imunopatogênese da psoríase (OPPMANN et al., 2000). A IL-23 é um heterodímero composto de duas subunidades, uma p40 e outra p19. É uma citocina relacionada ao padrão Th17 de resposta linfocitária. A IL-12, que é uma citocina relacionada ao padrão Th1, compartilha dessa mesma subunidade p40 da IL-23, sendo que sua outra subunidade é chamada de p35. Devido a isso, antes da descoberta da IL-23, pensava-se ser a psoríase uma doença de padrão Th1, pois havia a detecção das moléculas de p40 nas lesões de psoríase (OPPMAN et al., 2000; CUA et al., 2003). A partir da descoberta da subunidade p19 notaram que as subunidades p40 detectadas nas lesões estavam, na verdade, mais associadas a ela e não à p35 como se acreditava. Desde então o novo conceito, aceito até os dias atuais, é que a psoríase seja uma doença de padrão predominantemente Th17. As células do sistema imune inato são as principais fontes de

IL-23, como monócitos ativados e células dendríticas. A IL-23 é fundamental no processo final de maturação dos linfócitos Th17 e também na sua ativação. A liberação de IL-17A pelos linfócitos Th17 é dependente da presença da IL-23, ou seja, sem a IL-23 as células Th17 não secretam a IL-17A (MUDIGONDA et al., 2012; LYNDE et al., 2014).

IL-17A A IL-17 pertence a uma família de citocinas pró inflamatórias composta de 6 membros, IL-17A, B, C, D, E e F. Todos são ativos como homodímeros ou heterodímeros (IWAKURA et al., 2011). Apesar do aumento da expressão da IL-17A, C e F nas lesões de psoríase, é a IL-17A a grande efetora. A IL-17A é aproximadamente 55% homóloga a IL-17C e ambas ativam o mesmo receptor de membrana. Porém a forma homodimérica da IL-17A (IL-17A/A) é de 10 a 30 vezes mais potente que a forma homodimérica da IL-17F (IL-17F/F) na ativação da expressão genica. Já a forma heterodimérica (IL-17A/F) possui uma potência intermediária (LYNDE et al., 2014). As células Th17 são encontradas em abundância na derme de biópsias de lesões de psoríase. A expressão de mRNA de IL-17 das citocinas chaves como IL-17A e IL-17F, que são mais abundantes, aumenta com a atividade da doença e normalizando com tratamento, mostrando assim relação direta com a atividade da doença. (LOWES et al., 2008). A IL-17A é secretada, além das células Th17, por outras células tanto do sistema imune inato como adaptativo. Neutrófilos, mastócitos, linfócitos CD8⁺, linfócitos ROR γ t⁺ e células linfoides inatas T γ δ são as principais produtoras de IL-17. (PANTELYUSHIN ET AL., 2012). A IL-17A tem múltiplos papéis pró inflamatórios. Ela é crucial na manutenção da placa de psoríase pois seu alvo principal é o queratinócito. A IL-17A se liga aos receptores de IL-17 presentes nos queratinócitos e os ativa, fazendo com que os mesmos liberem uma série de quimiocinas que atuam na perpetuação do processo inflamatório. Algumas quimiocinas como CCL20, por exemplo, atrai mais células Th17 e células dendríticas para lesão. Essas células por sua vez secretam mais IL-23, que irá promover ativação de células T17 e portanto a liberação de mais IL-17A. Os queratinócitos ativados também secretam IL-8 que é um fator quimiotático para neutrófilos. Esses neutrófilos que migram para a lesão iram produzir mais IL-17A. A IL-17A também induz a liberação de peptídeos antimicrobianos pelos queratinócitos, como a β -defensina e S100A, que são

ativadores do sistema imune inato. Além disso, a IL-17A age também estimulando a hiperproliferação dos queratinócitos e causando uma diminuição na eficácia da barreira cutânea por reduzir a expressão da filagrina e diminuindo a expressão de genes que regulam a adesão intercelular dos queratinócitos. Portanto a IL-17A, atuando em sinergia com o TNF- α , mantém o processo inflamatório sempre ativo (SATVEER et al., 2016; LYNDE et al., 2014).

1.1 Linfócitos T reguladores (TREGS)

Fato interessante quando se questiona o papel dos linfócitos T reguladores (Tregs). Os Tregs, identificados como CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺, tem um papel fundamental na homeostase da imunidade dos tecidos e na auto tolerância. Eles são capazes de suprimir a ativação e proliferação de células efectoras. Portanto fundamentais para controle de processos inflamatórios no organismo. Na psoríase no entanto, esses linfócitos falharam em conseguir controlar o processo de iniciação e ativação de células efectoras da inflamação, ou seja, não conseguem parar ou diminuir o processo inflamatório nessa doença. Teorias sugerem um mal funcionamento ou diminuição dos Tregs nas lesões de psoríase (MATOZZI et al., 2013). Uma das principais teorias a respeito do mal funcionamento dos Tregs na psoríase alega ser um defeito na via STAT3. A via de sinalização intracelular STAT3 quando ativada (fosforilada) inibe a expressão de Foxp3⁺, inibindo portanto o funcionamento dos Tregs. Por outro lado, a STAT3 quando ativada aumenta a expressão de ROR γ t, importante fator na diferenciação das células Th17. O aumento das citocinas pró inflamatórias na psoríase como IL-6, IL-23, são tidas como as principais responsáveis pela fosforilação dessa via STAT3. Portanto a ativação aberrante dessa via na psoríase, mostra que a própria doença leva ao mau funcionamento dos Tregs (YANG et al., 2016).

1.2 Critérios de Gravidade

O tratamento da psoríase vulgar é baseado na sua gravidade. A utilização de agentes sistêmicos, incluindo-se aí a terapia com imunobiológicos, é reservada para psoríase considerada moderada a grave. Na psoríase leve, é preconizado tratamento apenas com medicações tópicas geralmente. Devido a isso a classificação da psoríase em

leve, moderado e grave é fundamental para a escolha do tratamento. Duas ferramentas são mais comumente utilizadas para a classificação de gravidade da psoríase e são essas que são levadas em consideração quando decide-se optar por terapias sistêmicas. São elas o DLQI (Dermatology Life Quality Index) e o PASI (Psoriasis Area Severity Index). DLQI visa aferir o quanto a doença interfere na qualidade de vida do paciente, portanto é o próprio paciente que pontua a sua condição. Já o PASI deve ser calculado pelo próprio profissional de saúde devidamente treinado levando em conta critérios mais clínicos da doença como o grau de eritema, descamação, espessura das lesões e a porcentagem de superfície corporal acometida. É pontuado numa escala que vai de 0 a 72 pontos. Quando esses índices, PASI e DLQI, estão acima de 10, juntos ou isolados, a psoríase pode ser considerada como moderada a grave. Nesses casos então, a terapia sistêmica já é indicada, incluindo-se também, em alguns casos, o uso dos imunobiológicos. O objetivo ideal dos tratamentos de psoríase é a busca do chamado “PASI100”, que significa uma redução de 100% no PASI calculado, ou seja, um paciente completamente livre de lesões. Por muito tempo, conseguir um “PASI75” era o objetivo ideal das terapias que se tinham disponíveis, sendo que um “PASI50” já era considerado como aceitável. Porém hoje, com o advento dos imunobiológicos, o objetivo ideal como um “PASI90” e um “PASI100” passou a ser a meta mais extensivamente desejada. A medida que as terapias foram se tornando mais eficientes as expectativas dos pacientes também foram aumentando. As evidências sustentam que a resposta como um “PASI90 a 100”, melhora muito mais o DLQI do paciente do quando se comparado a resposta de um “PASI75” (PUIG, 2015; BRIMHALL et al., 2008).

1.3 Medicções Imunobiológicas ou Biológicas

A evolução do entendimento da imunopatogênese da psoríase das últimas três décadas, especialmente após a descoberta da IL-23 e IL-17, permitiu uma revolução no tratamento da doença. Com esse entendimento, foi possível o desenvolvimento das drogas imunobiológicas que são mais eficazes e tem alvos bem específicos dentro da cascata inflamatória. As principais citocinas relacionadas com a gênese da doença, como IL-17A, IL-23 e TNF- α , são os alvos dessas novas drogas, que visam o bloqueio de suas atividades. Com a maior especificidade imunogênica dessas drogas, foi possível obter um

aumento na eficiência do controle da inflamação com menor alteração na resposta imune geral, especialmente a imunidade protetora. Com isso o perfil de segurança dessas drogas tem se mostrado bastante elevado se comparado as tradicionais terapias sistêmicas não biológicas. (CAMPA et al., 2016). Segundo a Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC), órgão responsável pela incorporação de novos tratamentos fornecido pelo SUS (Sistema Único de Saúde) no Brasil, estão disponíveis 5 medicações biológicas para o tratamento da psoríase. Três delas, que foram as primeiras a serem liberadas, são inibidores de TNF- α (Etanercept, o Infliximabe e o Adalimumabe), um inibidor de IL12/23 (Ustequinumabe) e um inibidor de IL-17A (Secuquinumabe). Todas essas medicações são também aprovadas para tratamento de Artrite Psoriásica e algumas outras doenças inflamatórias imunomediadas.

Os inibidores de TNF- α diminuem a produção de citocinas pelas células dendríticas mielóides e das células Th1 e por isso diminuem, indiretamente, a produção das citocinas liberadas pelas células Th17, entre elas a IL-17A (ZABA et al. 2007). O Ustequinumabe é um anticorpo monoclonal que inibe simultaneamente IL-12 e IL-23 bloqueando a subunidade p40, compartilhada pelas duas citocinas. Possui resposta mais rápida e melhor eficácia que os inibidores de TNF- α . Quase 70% dos pacientes atingem uma melhora de pelo menos 75% do PASI até a décima segunda semana de tratamento. A inibição do eixo IL12/23 leva respectivamente ao bloqueio das respostas Th1 e Th17, reduzindo portanto, indiretamente, a produção de TNF- α e IL-17A (HESSELVIG et al., 2017). O TNF- α é uma citocina importante na manutenção de granulomas infecciosos, como na tuberculose por exemplo. Por isso, a reativação de tuberculose latente é um dos efeitos adversos mais temidos nessas medicações que inibem direta ou indiretamente essa citocina. O rastreio dessa doença nos pacientes candidatos ao uso dessas medicações é imperativo (SIVAMANI et al. 2013).

O Secuquinumabe foi a droga biológica mais recente aprovada para tratamento no Brasil. É também um anticorpo monoclonal inibidor de IL-17A. Sua eficácia tem se mostrado surpreendente, com pacientes atingindo melhora de 75 a 90% do PASI já nos primeiros meses de tratamento. (PAPP et al., 2013). Por não inibir diretamente TNF- α e sim a IL-17A, essa medicação tem se mostrado muito segura em relação a tuberculose latente (KAMMÜLLER et al, 2017). Dados mostraram que o bloqueio dessa citocina é

mais eficaz na supressão de genes regulados pelo TNF- α e IL-17A do que as medicações que bloqueiam TNF- α isoladamente (GIROLOMONI et al. 2012). Apesar da comprovada eficácia dos imunobiológicos, aproximadamente um terço dos pacientes não respondem ou perdem resposta a essas medicações devido a formação de anticorpos antidroga. (GUDJONSSON et al. 2012; KALDEN, SCULZE-KOOPS, 2017). Devido a isso esses pacientes acabam tendo que retomar ou associar o uso de medicamentos tanto de uso tópico quanto de terapia convencional não biológica. Esse, fora o alto custo das medicações biológicas, é um dos principais motivos pelo qual essas terapias convencionais ainda não foram completamente substituídas pelos biológicos.

1.4 Hipótese

O uso de imunobiológico no tratamento de psoríase modula a expressão de citocinas envolvidas na regulação do processo inflamatório.

1.4.1. Objetivo Geral

Avaliar o perfil da resposta imune adaptativa em pacientes com psoríase sem e com tratamento com imunobiológico.

1.4.2. Objetivo específico

1. Avaliar os níveis de citocinas (IL-17, IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-2 e IL-10) em sobrenadante de cultura de PBMC, em pacientes com psoríase, em uso de imunobiológico, antes do pulso terapêutico e no meio do pulso terapêutico.
2. Avaliar ativação de Linfócitos TCD4+ sua capacidade de produzir IL-17, IFN- γ , ou a expressão de fenótipo de T regulador em pacientes com psoríase, em uso de imunobiológico, antes do pulso terapêutico e no meio do pulso terapêutico.
3. Comparar os níveis de citocinas (IL-17, IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-2 e IL-10) em sobrenadante de cultura de PBMC, de pacientes com psoríase sem tratamento, tratados com, metotrexate, imunobiológico com o grupo de indivíduos controles saudáveis.
4. Avaliar ativação de Linfócitos TCD4+ sua capacidade de produzir IL-17, IFN- γ , ou a expressão de fenótipo de T regulador, em pacientes com psoríase sem tratamento, tratados com, metotrexate, imunobiológico com o grupo de indivíduos controles saudáveis.

2 MATERIAL E MÉTODO

2.1 Amostra para estudo imunológico

O estudo será realizado na Universidade de Uberaba com parceria com Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, em Uberaba-MG e a Clínica do Dr. Sandro Cecílio Furiati localizada no endereço Avenida Santos Dumont, 2424, Santa Maria, Uberaba-MG.

2.2 População de estudo

Foram avaliados 32 pacientes com psoríase e 10 do grupo controle. O grupo com psoríase foram agrupados a seguir:

- Grupo 1: Serão 10 pacientes com diagnóstico de psoríase em uso de imunobiológico imediatamente antes da aplicação e no meio do ciclo do imunobiológico (IB)
- Grupo 2: 14 pacientes tratados com metotrexate (MTX)
- Grupo 3: 8 pacientes sem terapia (ST)
- Grupo 4: Serão 10 indivíduos controles saudáveis (Ctrl)

2.3 Amostra

Foram coletadas 2 amostras de sangue dos pacientes do grupo dos imunobiológicos. Uma realizada imediatamente antes da aplicação da medicação e outra no meio do ciclo da aplicação. Nos pacientes sem tratamento ou com uso de metotrexate e nos controles foram realizadas apenas uma coleta de sangue. As amostras de sangue foram coletadas, em tubo de coleta a vácuo, por um profissional qualificado, encaminhando-a imediatamente ao laboratório de imunologia da UFTM para centrifugação à 400G e armazenadas para cultura e análises.

2.4 Critérios de inclusão no estudo

a) Grupo de pacientes com diagnóstico de psoríase em uso de imunobiológicos:

- O paciente deve estar em uso de alguma medicação imunobiológica (anti-TNF, anti-IL12/ anti-IL-23 ou anti- IL-17A);
- Tenha diagnóstico de psoríase em placas, associada ou não a artrite psoriásica ou outras comorbidades;
- A doença pode estar ativa ou já ter sofrido remissão pelo uso da droga;
- Deve ter passado o período fase de indução, feito no início dos tratamentos de alguns imunobiológicos;
- Aqueles que já estiverem em uso, devem estar em uso regular da medicação após fase de indução;
- Deve ter lido e concordado em assinar o TCLE.

b) Grupo dos pacientes com diagnóstico de psoríase sem uso de imunobiológicos:

- Deve apresentar diagnóstico clínico de psoríase em placas, associado ou não a outras comorbidades como artrite psoriásica, por exemplo;
- Deve apresentar uma psoríase em placas de grau moderado a grave, calculado pelo “Psoriasis Area Severity Index – PASI”;
- Deve apresentar valor de score medido pelo PASI maior que 10 para ser considerada uma psoríase moderada a grave;
- Não pode estar em uso de nenhuma medicação imunobiológica;
- Pode ter usado a medicação imunobiológica previamente, porém deve estar com período mínimo de 6 meses sem o uso das mesmas;
- Pode estar fazendo uso de qualquer outra medicação sistêmica não imunobiológica para psoríase, como metotrexate por exemplo;
- Deve ter lido e concordado em assinar o TCLE.

2.5 Critérios de exclusão

a) Pacientes com diagnóstico de psoríase em uso de imunobiológicos:

- Pacientes que ainda estiverem em fase de indução da droga;
- Pacientes que não estejam fazendo uso regular da medicação;
- Pacientes que estejam em uso de imunobiológicos para outras doenças que não psoríase em placas;
 - Pacientes que não queiram assinar o termo de consentimento.
 -

b) Critérios de exclusão pacientes com psoríase em placas:

- Pacientes com psoríase em placas, mas com PASI<10;
- Pacientes com outros de tipo de psoríase que não de placas;
- Pacientes que não queiram assinar o termo de consentimento.

2.6 Metodologia para dosagem de citocinas

2.6.1 *Cultura Celular*

- **Obtenção de células mononucleares do sangue periférico**

As células mononucleares do sangue periférico – PBMCs – foram separadas por gradiente de densidade utilizando-se Ficoll-Hypaque (PHARMACIA-SUÉCIA), onde cerca de 30 mL de sangue foram colocados sobre 10 mL dessa em tubos plásticos cônicos de 50 mL tipo Falcon. Os tubos foram centrifugados a 400xg por 30 minutos, a 21°C e ao final da centrifugação foi coletado cerca de 2 mL de plasma, armazenado a -90°C para análises posteriores. O anel de células formado entre o Ficoll e o plasma foi coletado, lavando-se as células por três vezes, com meio RPMI incompleto, 400xg, 4°C, 10 minutos. A quantidade de células foi determinada através de contagem em câmara de Neubauer e a amostra foi ajustada com meio RPMI completo, contendo 50mM de HEPES, 5% de soro fetal bovino inativado, 2mM de L-glutamina, 40mg/mL de gentamicina a fim

de se obter uma concentração final de 2×10^6 /mL. Todos os procedimentos foram realizados em condições estéreis, utilizando-se de capela de fluxo laminar.

▪ **Cultura de células mononucleares do sangue periférico – 48 horas**

Em placa de cultura de 24 poços foram adicionados 1 mL da ressuspensão de PBMC contendo 2×10^6 células/mL. As células foram distribuídas para as seguintes condições:

- Sem estímulo - 2×10^6 células/mL
- Anti-CD3 e Anti-CD28 - 2×10^6 células/ml + 1µl de Anti-CD3+0,5µl de Anti-CD28

As células foram mantidas a 37°C, 5% de CO₂, por 48 horas. Após, os sobrenadantes foram recolhidos e armazenados a -90°C para posterior dosagem de citocinas. As células das culturas de 48 horas estimuladas com anti-CD3 e anti-CD28 foram ressuspensas em HANKS e utilizadas para análise por citometria de fluxo de moléculas de superfície, citocinas e fatores de transcrição.

2.6.2 Citometria de fluxo para análise da expressão de moléculas de superfície, citocinas e fatores de transcrição

Para análise de moléculas de superfície, citocinas e fatores de transcrição nas células derivadas da cultura de 48 horas foram lavadas (400xg, 4°C, 10 min) em meio Hanks, suplementado com 10% de soro humano AB+, previamente submetido à inativação do sistema complemento, e incubadas por 30 minutos. Após, as células foram marcadas com anticorpos direcionados às moléculas de superfície, anti-CD4-PE-Cy5, anti-CD69-PE, anti-CD25-FITC, anti-H/Mlap APC e mantidas por 30 minutos, 4°C. Após, as células foram lavadas 3 vezes para remover o excesso de anticorpos (400 x g, 4°C, 10 min), fixadas e permeabilizadas com 250µL de Cytofix/Cytoperm (BD BIOSCIENCES), por 30 minutos, 4°C. Em seguida, foram lavadas 3 vezes em Permwash (BD BIOSCIENCE) contendo 10% de soro fetal bovino (SIGMA), sendo então adicionados os anticorpos direcionados às moléculas intracelulares, específicos para citocinas e fatores de transcrição e combinados conforme a conveniência da análise a ser realizada posteriormente, e mantidas por 30 minutos, 4°C. Ao final deste período as

células foram novamente lavadas em Permashield por 3 vezes (400 x g, 4°C, 10 min) e ressuspensas em 200 mL de Paraformolaldeído 0,5% e armazenadas no escuro, à 4°C, até o momento da análise no citômetro de fluxo. Paralelamente aos tubos marcados serão mantidos para cada amostra um tubo sem adição de anticorpos e outro contendo isótopos controles compatíveis com as fluorescências utilizadas. A aquisição dos eventos foi realizada em citômetro FACSCalibur utilizando o programa Cell Quest. A análise dos dados será realizada utilizando o programa FlowJo 10.0.6 a partir da individualização da população de leucócitos através de “Gates” estabelecidos de acordo com os padrões de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) compatíveis com a população de linfócitos.

2.6.3 Dosagem de citocinas no sobrenadante por CBA

Nas amostras do sobrenadante foram dosadas IL-8 e IL-6 pela técnica de Cytometric Bead Array (CBA), utilizando BD Human Inflammatory Cytokine CBA Kit, Cat: 551811, conforme instruções do fabricante. As amostras e as citocinas/quimiocina recombinantes foram incubadas com microesferas com distintas intensidades de fluorescência conjugadas com um anticorpo de captura específico para cada citocinas/quimiocina. Em seguida, foram adicionados anticorpos específicos para cada citocinas/quimiocina conjugados com ficoeritrina (PE). Após incubação, as microesferas foram lavadas com solução própria do kit do fabricante e analisadas em citômetro FACSCalibur (BD BIOSCIENCES) utilizando o programa Cell Quest (BD BIOSCIENCES). As microesferas específicas para cada citocinas/quimiocina foram separadas por emitirem intensidades diferentes de fluorescência emitida à 660nm e a quantidade de citocina conjugada a cada uma delas pela intensidade de fluorescência emitida à 585nm. Após aquisição dos dados das amostras e citocinas/quimiocina recombinantes, estes foram levados ao software FCAP Array 2.0 (SoftFlow-EUA) e as concentrações das citocinas/quimiocina calculadas a partir da curva padrão.

2.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio do programa Statview (Abaccus - EUA). A verificação da distribuição normal das variáveis quantitativas foi feita pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis apresentaram distribuição não normal e foram expressas em mediana com valores mínimo e máximo e percentis. As variáveis apresentaram distribuição normal com variância não homogênea ou distribuição não normal foram analisadas pelos testes de Mann-Whitney. Para comparar duas variáveis contínuas nos mesmos pacientes foi aplicado o teste de Wilcoxon (U). As variáveis qualitativas foram expressas através da média e desvio padrão. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando a probabilidade foi menor 5% ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

No presente estudo foram 32 pacientes com psoríase e 10 do grupo controle. No grupo de pacientes com psoríase 10 estavam em tratamento com imunobiológicos (IB), 14 com uso de metotrexate (MTX) e 8 estavam sem tratamento (ST), no momento da coleta do sangue.

As análises de citocinas dos pacientes com psoríase em uso de imunobiológicos foram realizadas em dois momentos, antes do pulso terapêutico (coleta 1) e no meio do pulso terapêutico (coleta 2). Foram analisada IL-17, IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-2 e IL-10 pelo método do CBA, no sobrenadante de cultura de PBMC por 48 horas em presença de meio (basal) sem estímulo e com estímulo na presença de anti-CD3/anti-CD28 (anti-CD3/anti-CD28).

Ao observar os níveis de IL-17 no sobrenadante de PBMC, verificou-se que, o estímulo com anti-CD3/anti-CD28 foi capaz de elevar significativamente a produção de IL-17 apenas antes do pulso terapêutico (coleta 1), quando comparadas ao sobrenadante em presença de meio (Wilcoxon; $p=0,031$; Figura 1A). Não houve aumento significativo na produção de IL-17, após estímulo com anti-CD3/anti-CD28, no sobrenadante dos pacientes que estavam no meio do pulso terapêutico (coleta 2) (Wilcoxon; $p> 0,05$; Figura 1A).

Da mesma forma, o estímulo com anti-CD3/anti-CD28, foi capaz de elevar significativamente a produção de IFN- γ apenas antes do pulso terapêutico (coleta 1) quando comparadas sobrenadante em presença de meio (coleta 1) (Wilcoxon; $p= 0,0078$; Figura 1B). Não houve aumento significativo na produção de IFN- γ , após estímulo com anti-CD3/anti-CD28, no sobrenadante dos pacientes que estavam no meio do pulso terapêutico (coleta 2) (Wilcoxon; $p> 0,05$; Figura 1B).

Semelhante ao IFN- γ , o estímulo com anti-CD3/anti-CD28, foi capaz de elevar significativamente a produção de TNF- α apenas antes do pulso terapêutico (coleta 1) quando comparadas sobrenadante em presença de meio (coleta 1) (Wilcoxon; $p<0,005$; Figura 1B). Já, ao observar os níveis de TNF- α sob estímulo de anti-CD3/anti-CD28 não houve diferença significativa no sobrenadante dos pacientes que estavam no meio do pulso terapêutico (Wilcoxon; $p> 0,05$; Figura 1C).

Ao avaliar os níveis de IL-10, o estímulo com anti-CD3/anti-CD28 foi capaz de elevar significativamente a produção de IL-10 no sobrenadante dos pacientes que não haviam feito o pulso terapêutico (coleta 1D), quando comparadas ao sobrenadante em presença de meio (coleta 1) (Wilcoxon; $p < 0,0078$; Figura 1D). Não houve aumento significativo na produção de IL-10 após estímulo com anti-CD3/anti-CD28, no sobrenadante dos pacientes que estavam no meio do pulso terapêutico (coleta 2) (Wilcoxon; $p > 0,05$; Figura 1D). Não foram observadas diferenças significativas para os níveis de IL-6 e IL-2 nos sobrenadantes (Wilcoxon; $p > 0,05$; Figura 1E) (Wilcoxon; $p > 0,05$; Figura 1F) respectivamente.

Foram analisados, por citometria de fluxo, os marcadores de ativação celular ($CD69^+CD4^+$) e a expressão de citocinas intracelulares nos linfócitos T obtidos de PBMC, após 48 horas de cultura, antes do pulso terapêutico (coleta 1) e no meio do pulso terapêutico (coleta 2). Observou-se que, em relação aos marcadores de ativação celular, a expressão de $CD69^+$ em linfócitos $TCD4^+$ estimulados com anti-CD3/anti-CD28, foi significativamente maior antes dos pacientes iniciarem o pulso terapêutico (coleta 1) quando comparados com as células dos mesmos pacientes, porém, sem estímulo (meio) (Wilcoxon; $p < 0,05$; Figura 2A). Ao comparar as células $TCD4^+$ produtoras de IL-17 ($IL-17^+$ e não produtoras de $IFN-\gamma$ ($IFN-\gamma^-$) e não estimuladas ou estimuladas com anti-CD3/anti-CD28, não houve diferença significativa (Wilcoxon; $p > 0,05$; Figura 2B).

Entretanto, ao comparar as células $TCD4^+$ produtoras de $IFN-\gamma$ ($IFN-\gamma^+$) mas não produtoras de IL-17 ($IL-17^-$), estimuladas com anti-CD3/anti-CD28, antes do pulso terapêutico (coleta 1), observou-se um aumento significativo no percentual de células produtoras de $IFN-\gamma$ quando comparados com as células do mesmo porém sem estímulo (meio- coleta 1) (Wilcoxon; $p < 0,05$; Figura 2C). Por outro lado, ao comparar as células $TCD4^+$ $IFN-\gamma^+$ e produtoras de $IL-17^+$ com ou sem estímulo, não houve diferença significativa (Wilcoxon: $p > 0,05$; Figura 2D).

Ao avaliar células $TCD25^{hi}+FoxP3^+$ LAP^+ estimuladas com anti-CD3/anti-CD28 antes do pulso terapêutico (coleta 1), observou-se um aumento significativo no percentual de células T reguladoras (Treg) quando comparados com percentual de células do mesmo paciente, porém sem estímulo (meio – coleta 1) (Wilcoxon: $p < 0,05$; Figura 2E).

A produção de citocinas, também foi avaliada por CBA, entre os grupos de pacientes com psoríase e indivíduos controle saudáveis (Ctrl), no sobrenadante de cultura de PBMC por 48 horas em presença de meio (sem estímulo) e na presença de anti-CD3/anti-CD28 (estímulo). Os pacientes com psoríase foram agrupados em: pacientes sem qualquer terapia (ST), pacientes tratados com Metotrexate (MTX) e pacientes tratados com imunobiológicos (IB). Esses últimos pacientes estavam em pleno tratamento do imunobiológico. Ao avaliar a produção de TNF- α após estímulo com anti-CD3/CD28 observou-se uma diminuição significativa de TNF- α nos pacientes com psoríase sem tratamento (ST) quando comparados ao controle saudáveis (Ctrl) (Mann Whitney; $p < 0,05$; Figura 3A). Da mesma forma, os níveis de TNF- α após estímulo com anti-CD3/CD28 foi significativamente menor nos pacientes tratados com metotrexate (MTX) quando comparados aos indivíduos controle saudáveis (Ctrl) (Mann Whitney; $p < 0,05$; Figura 3A).

E ainda, os pacientes com tratamento de imunobiológico (IB) também apresentaram níveis significativamente menores quando comparados aos indivíduos controle saudáveis (Ctrl) (Mann Whitney; $p < 0,05$; Figura 3A). Ao avaliar os níveis de IL-10, observou-se que após estímulo com anti-CD3/CD28 foi significativamente menor nos pacientes com psoríase tratados com metotrexate (MTX) quando comparados aos indivíduos controle saudáveis (Ctrl) (Mann Whitney; $p < 0,05$; Figura 3B). E da mesma forma os pacientes em tratamento com imunobiológico (IB) os níveis de IL-10 foram significativamente menores quando comparados aos indivíduos controle saudáveis (Ctrl) (Mann Whitney; $p < 0,05$; Figura 3B). Em relação aos níveis de IL-6, observou-se que os pacientes em tratamento com metotrexate (MTX) reduziu significativamente a produção basal (sem estímulo) de IL-6 quando comparados aos indivíduos controles saudáveis (Ctrl) (Mann Whitney; $p < 0,05$; Figura 3C). Da mesma forma, houve uma redução significativa, após estímulo com anti-CD3/CD28, tanto nos pacientes com uso de metotrexate (MTX) quanto nos pacientes com tratamento de imunobiológico (IB) quando comparados aos indivíduos controles saudáveis (Ctrl) (Mann Whitney; $p < 0,05$; Figura 3C). A produção basal da IL-2 foi significativamente maior nos pacientes em tratamento com imunobiológico (IB) quando comparados aos indivíduos controles saudáveis (Ctrl) (Mann Whitney; $p < 0,05$; Figura 3D). Da mesma forma os níveis de IL-2, após estímulo

com anti-CD3/CD28, foram significativamente maior no grupo com imunobiológico quando comparado ao grupo controle saudável (Ctrl) (Mann Whitney; $p < 0,05$; Figura 3D). Não foram observadas diferenças significativas quando esta estratégia foi usada nas comparações dos níveis de IFN- γ e de IL-17 nos sobrenadantes desses grupos de pacientes (Mann Whitney; $p > 0,05$; Figura 3E e Figura 3F).

Foram analisados, por citometria de fluxo, os marcadores de ativação celular (CD69⁺CD4⁺) e a expressão de citocinas intracelulares nos linfócitos T obtidos de PBMC, após 48 horas de cultura, em presença de meio (sem estímulo) e anti-CD3/anti-CD28 (estímulo). Os pacientes foram agrupados em indivíduos controle saudáveis (Ctrl) e pacientes com psoríase sem qualquer terapia (ST), tratados com metotrexate (MTX) ou tratados com imunobiológicos (IB), considerando aqui os resultados da metade do ciclo. Observou-se que a expressão de CD69⁺ (marcador de ativação) em linfócitos T CD4⁺, após estímulo com anti-CD3/anti-CD28, foi significativa menor nos pacientes em tratamento com metotrexato (MTX) e imunobiológico (IB), quando comparados ao grupo controle saudável (Ctrl) (Wilcoxon; $p < 0,05$ Figura 4A). Observa-se, que não houve diferença significativa nos percentuais de células T auxiliares produtoras de IL-17⁺, bem como nas células produtoras de IFN- γ , e da mesma forma nas células duplo positivas (IL-17⁺ IFN- γ ⁺) (Wilcoxon: $p > 0,05$; Figura 4B, C e D). Por outro lado, observa-se que após estímulo com anti-CD3/anti-CD28 há um aumento significativo de linfócitos T CD4⁺ com fenótipo de Tregulador (TCD25^{hi}+FoxP3⁺ LAP⁺) nos pacientes com psoríase sem tratamento quando comparados com o grupo tratado com metotrexate (Wilcoxon; $p < 0,05$; Figura 4F).

3.1 Legendas

Figura 1

- A. Níveis de IL-17, dosadas por CBA, no sobrenadante de cultura de PBMC por 48 horas em presença de meio (basal) e com estímulo na presença de anti-CD3/anti-CD28 (anti-CD3/anti-CD28) de pacientes com psoríase em uso de imunobiológicos antes do pulso terapêutico (coleta 1) e no meio do pulso terapêutico (coleta 2). (Teste: Wilcoxon).
- B. Níveis de IFN- γ , dosadas por CBA, no sobrenadante de cultura de PBMC por 48 horas em presença de meio (basal) e com estímulo na presença de anti-CD3/anti-CD28 (anti-CD3/anti-CD28) de pacientes com psoríase em uso de imunobiológicos antes do pulso terapêutico (coleta 1) e no meio do pulso terapêutico (coleta 2). (Teste: Wilcoxon).
- C. Níveis de TNF- α , dosadas por CBA, no sobrenadante de cultura de PBMC por 48 horas em presença de meio (basal) e com estímulo na presença de anti-CD3/anti-CD28 (anti-CD3/anti-CD28) de pacientes com psoríase em uso de imunobiológicos antes do pulso terapêutico (coleta 1) e no meio do pulso terapêutico (coleta 2). (Teste: Wilcoxon).
- D. Níveis de IL-6, dosadas por CBA, no sobrenadante de cultura de PBMC por 48 horas em presença de meio (basal) e com estímulo na presença de anti-CD3/anti-CD28 (anti-CD3/anti-CD28) de pacientes com psoríase em uso de imunobiológicos antes do pulso terapêutico (coleta 1) e no meio do pulso terapêutico (coleta 2). (Teste: Wilcoxon).
- E. Níveis de IL-2, dosadas por CBA, no sobrenadante de cultura de PBMC por 48 horas em presença de meio (basal) e com estímulo na presença de anti-CD3/anti-CD28 (anti-CD3/anti-CD28) de pacientes com psoríase em uso de imunobiológicos antes do pulso terapêutico (coleta 1) e no meio do pulso terapêutico (coleta 2). (Teste: Wilcoxon).
- F. Níveis de L-10, dosadas por CBA, no sobrenadante de cultura de PBMC por 48 horas em presença de meio (basal) e com estímulo na presença de anti-CD3/anti-CD28 (anti-CD3/anti-CD28) de pacientes com psoríase em uso de imunobiológicos antes do pulso terapêutico (coleta 1) e no meio do pulso terapêutico (coleta 2). (Teste: Wilcoxon).

Figura 2

- A. Análise, por citometria de fluxo, dos marcadores de ativação celular (CD69+CD4+) obtidas após 48 horas de cultura, de PBMC em presença de meio (basal) e com estímulo na presença de anti-CD3/anti-CD28 (anti-CD3/anti-CD28) de pacientes com psoríase em uso de imunobiológicos antes do pulso terapêutico (coleta 1) e no meio do pulso terapêutico (coleta 2). (Teste: Wilcoxon).
- B. Análise, por citometria de fluxo, de IL-17⁺ INF- γ ⁻ e marcadores de ativação celular (CD69+CD4+) obtidas após 48 horas de cultura, de PBMC em presença de meio (basal) e com estímulo na presença de anti-CD3/anti-CD28 (anti-CD3/anti-CD28) de pacientes com psoríase em uso de imunobiológicos antes do pulso terapêutico (coleta 1) e no meio do pulso terapêutico (coleta 2). (Teste: Wilcoxon).
- C. Análise, por citometria de fluxo, de IL-17⁺ INF- γ ⁻ e marcadores de ativação celular (CD69+CD4+) obtidas após 48 horas de cultura, de PBMC em presença de meio (basal) e com estímulo na presença de anti-CD3/anti-CD28 (anti-CD3/anti-CD28) de pacientes com psoríase em uso de imunobiológicos antes do pulso terapêutico (coleta 1) e no meio do pulso terapêutico (coleta 2). (Teste: Wilcoxon).
- D. Análise, por citometria de fluxo, de IL-17⁻ INF- γ ⁺ e marcadores de ativação celular (CD69+CD4+) obtidas após 48 horas de cultura, de PBMC em presença de meio (basal) e com estímulo na presença de anti-CD3/anti-CD28 (anti-CD3/anti-CD28) de pacientes com psoríase em uso de imunobiológicos antes do pulso terapêutico (coleta 1) e no meio do pulso terapêutico (coleta 2). (Teste: Wilcoxon).
- E. Análise, por citometria de fluxo, de IL-17⁺ INF- γ ⁺ e marcadores de ativação celular (CD69+CD4+) obtidas após 48 horas de cultura, de PBMC em presença de meio (basal) e com estímulo na presença de anti-CD3/anti-CD28 (anti-CD3/anti-CD28) de pacientes com psoríase em uso de imunobiológicos antes do pulso terapêutico (coleta 1) e no meio do pulso terapêutico (coleta 2). (Teste: Wilcoxon).
- F. Análise, por citometria de fluxo, de TCD25^{hi}+FoxP3⁺LAP⁺ e marcadores de ativação celular (CD69+CD4+) obtidas após 48 horas de cultura, de PBMC em presença de meio (basal) e com estímulo na presença de anti-CD3/anti-CD28 (anti-CD3/anti-CD28) de pacientes com psoríase em uso de imunobiológicos antes do pulso terapêutico (coleta 1) e no meio do pulso terapêutico (coleta 2). (Teste: Wilcoxon).

FIGURA 2

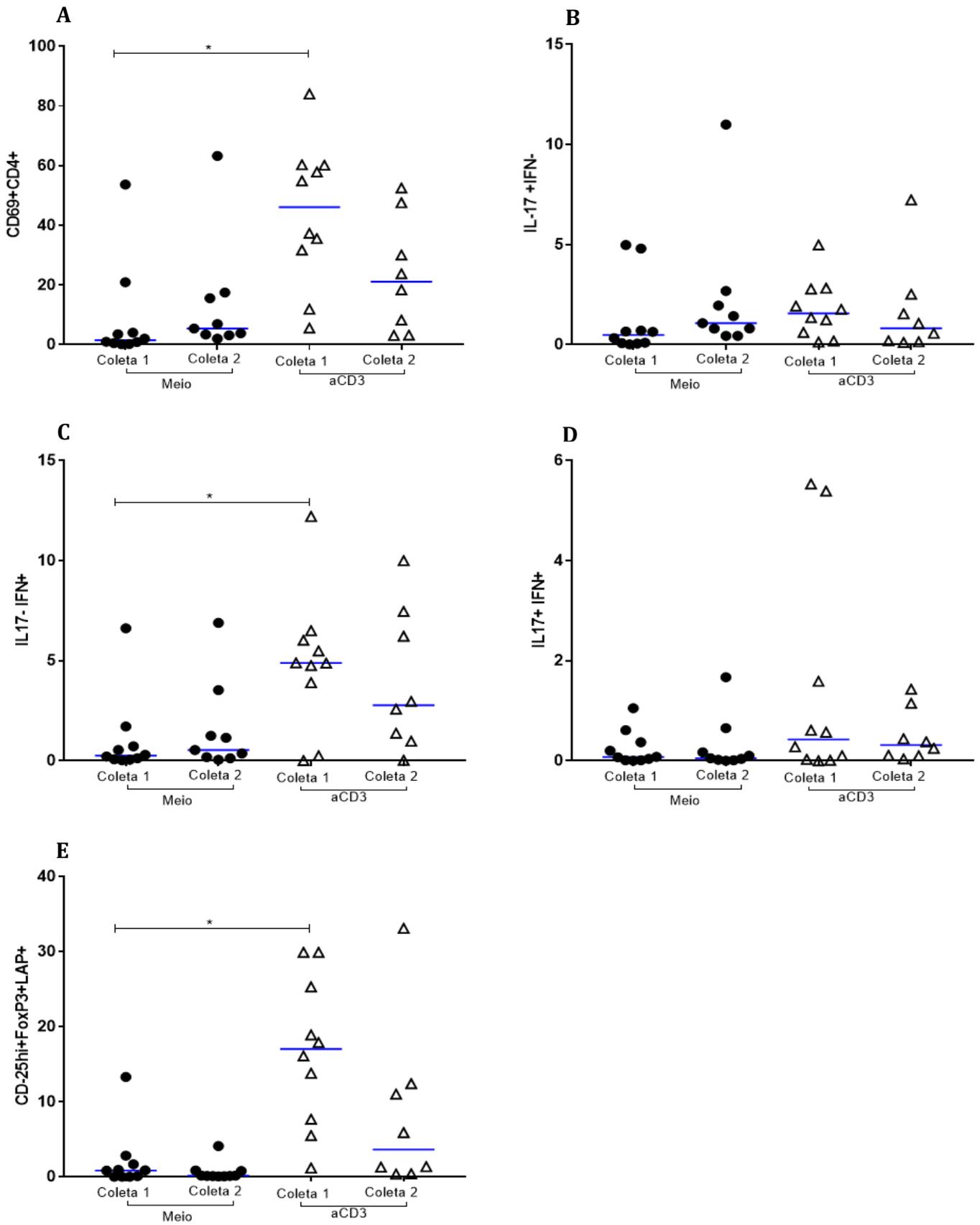


Figura 3

- A. Análise de IFN- γ , por CBA, entre os grupos de pacientes com psoríase e indivíduos controle saudáveis (Ctrl), no sobrenadante de cultura de PBMC por 48 horas em presença de meio (sem estímulo) e na presença de anti-CD3/anti-CD28 (estímulo). Os pacientes com psoríase foram agrupados em: pacientes sem qualquer terapia (ST), pacientes tratados com Metotrexate (MTX) e pacientes tratados com imunobiológicos (IB). (Teste: Mann Whitney).
- B. Análise de IL-17, por CBA, entre os grupos de pacientes com psoríase e indivíduos controle saudáveis (Ctrl), no sobrenadante de cultura de PBMC por 48 horas em presença de meio (sem estímulo) e na presença de anti-CD3/anti-CD28 (estímulo). Os pacientes com psoríase foram agrupados em: pacientes sem qualquer terapia (ST), pacientes tratados com Metotrexate (MTX) e pacientes tratados com imunobiológicos (IB). (Teste: Mann Whitney).
- C. Análise de TNF- α , por CBA, entre os grupos de pacientes com psoríase e indivíduos controle saudáveis (Ctrl), no sobrenadante de cultura de PBMC por 48 horas em presença de meio (sem estímulo) e na presença de anti-CD3/anti-CD28 (estímulo). Os pacientes com psoríase foram agrupados em: pacientes sem qualquer terapia (ST), pacientes tratados com Metotrexate (MTX) e pacientes tratados com imunobiológicos (IB). (Teste: Mann Whitney).
- D. Análise de IL-10, por CBA, entre os grupos de pacientes com psoríase e indivíduos controle saudáveis (Ctrl), no sobrenadante de cultura de PBMC por 48 horas em presença de meio (sem estímulo) e na presença de anti-CD3/anti-CD28 (estímulo). Os pacientes com psoríase foram agrupados em: pacientes sem qualquer terapia (ST), pacientes tratados com Metotrexate (MTX) e pacientes tratados com imunobiológicos (IB). (Teste: Mann Whitney).
- E. Análise de IL-6, por CBA, entre os grupos de pacientes com psoríase e indivíduos controle saudáveis (Ctrl), no sobrenadante de cultura de PBMC por 48 horas em presença de meio (sem estímulo) e na presença de anti-CD3/anti-CD28 (estímulo). Os pacientes com psoríase foram agrupados em: pacientes sem qualquer terapia (ST), pacientes tratados com Metotrexate (MTX) e pacientes tratados com imunobiológicos (IB). (Teste: Mann Whitney).
- F. Análise de IL-2, por CBA, entre os grupos de pacientes com psoríase e indivíduos controle saudáveis (Ctrl), no sobrenadante de cultura de PBMC por 48 horas em presença de meio (sem estímulo) e na presença de anti-CD3/anti-CD28 (estímulo). Os pacientes

com psoríase foram agrupados em: pacientes sem qualquer terapia (ST), pacientes tratados com Metotrexate (MTX) e pacientes tratados com imunobiológicos (IB). (Teste: Mann Whitney).

FIGURA 3

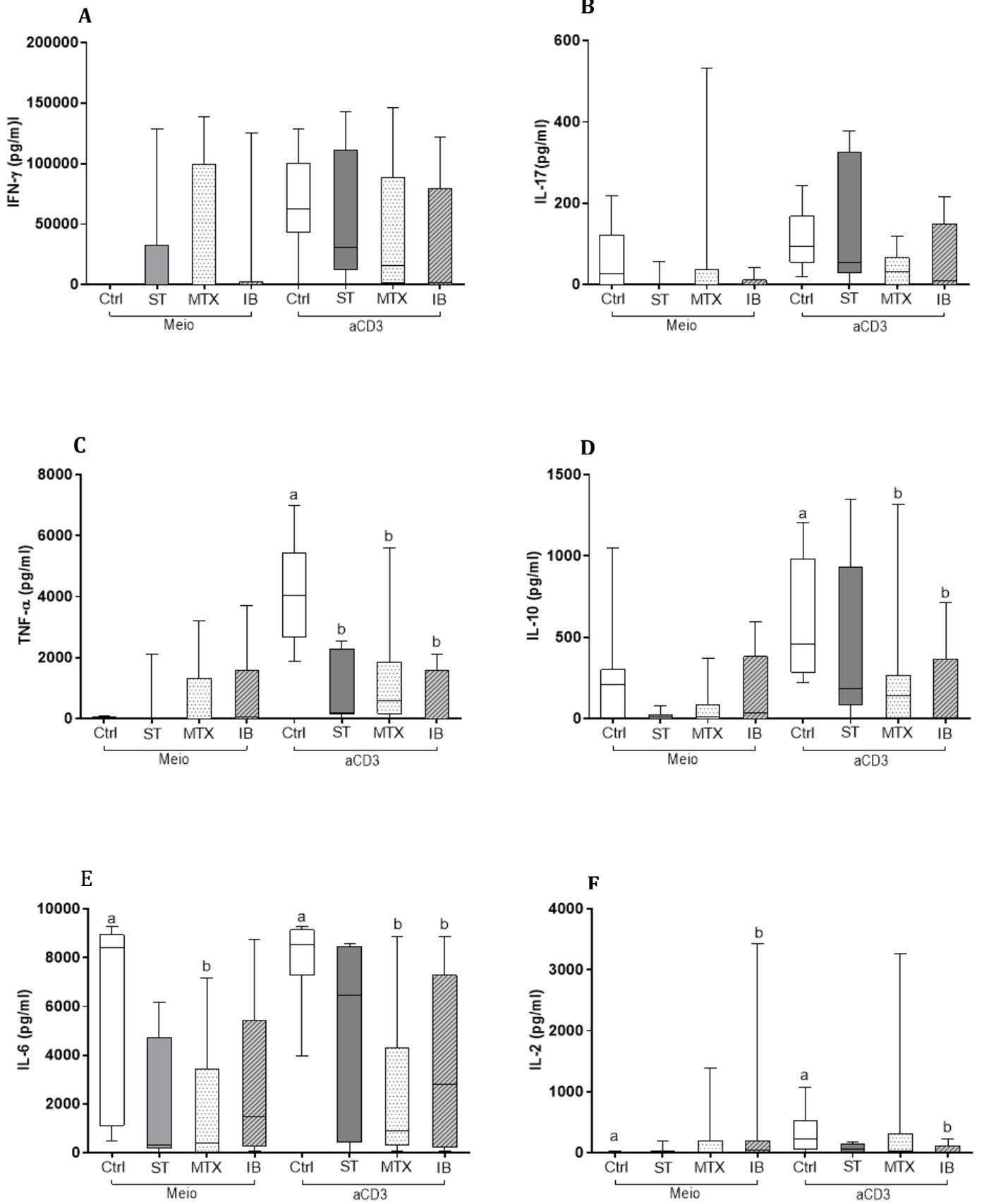
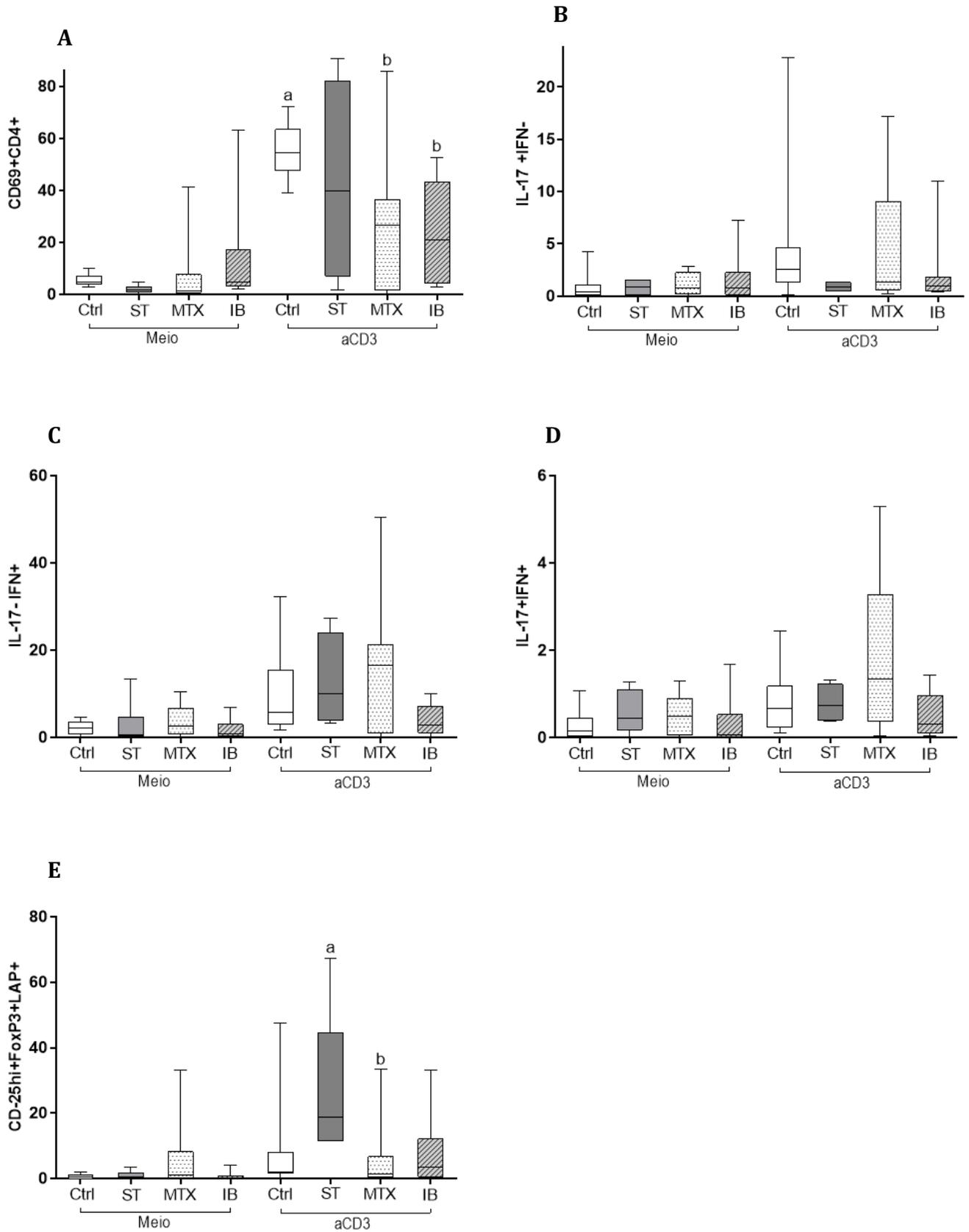


Figura 4

- A. Análise, por citometria de fluxo, os marcadores de ativação celular (CD69+CD4+) após 48 horas de cultura, em presença de meio (sem estímulo) e anti-CD3/anti-CD28 (estímulo). Os pacientes foram agrupados em indivíduos controle saudáveis (Ctrl) e pacientes com psoríase sem qualquer terapia (ST), tratados com Metrotrexato (MTX) ou tratados com imunobiológicos (IB), considerando aqui os resultados da metade do ciclo.
- B. Análise por citometria de fluxo, a expressão de IL-17⁺IFN γ intra-celulares nos linfócitos T obtidos de PBMC, após 48 horas de cultura, em presença de meio (sem estímulo) e anti-CD3/anti-CD28 (estímulo). Os pacientes foram agrupados em indivíduos controle saudáveis (Ctrl) e pacientes com psoríase sem qualquer terapia (ST), tratados com Metrotrexato (MTX) ou tratados com imunobiológicos (IB), considerando aqui os resultados da metade do ciclo.
- C. Análise por citometria de fluxo, a expressão de IL-17⁺IFN γ ⁺ intra-celulares nos linfócitos T obtidos de PBMC, após 48 horas de cultura, em presença de meio (sem estímulo) e anti-CD3/anti-CD28 (estímulo). Os pacientes foram agrupados em indivíduos controle saudáveis (Ctrl) e pacientes com psoríase sem qualquer terapia (ST), tratados com Metrotrexato (MTX) ou tratados com imunobiológicos (IB), considerando aqui os resultados da metade do ciclo.
- D. Análise por citometria de fluxo, a expressão de IL-17⁺IFN γ ⁺ intra-celulares nos linfócitos T obtidos de PBMC, após 48 horas de cultura, em presença de meio (sem estímulo) e anti-CD3/anti-CD28 (estímulo). Os pacientes foram agrupados em indivíduos controle saudáveis (Ctrl) e pacientes com psoríase sem qualquer terapia (ST), tratados com Metrotrexato (MTX) ou tratados com imunobiológicos (IB), considerando aqui os resultados da metade do ciclo.
- E. Análise por citometria de fluxo, a expressão de IL-17⁺IFN γ intra-celulares nos linfócitos T obtidos de PBMC, após 48 horas de cultura, em presença de meio (sem estímulo) e anti-CD3/anti-CD28 (estímulo). Os pacientes foram agrupados em indivíduos controle saudáveis (Ctrl) e pacientes com psoríase sem qualquer terapia (ST), tratados com Metrotrexato (MTX) ou tratados com imunobiológicos (IB), considerando aqui os resultados da metade do ciclo.
- F. Análise por citometria de fluxo, a expressão de TCD25^{hi}FoxP3⁺LAP⁺ intra-celulares nos linfócitos T obtidos de PBMC, após 48 horas de cultura, em presença de meio (sem estímulo) e anti-CD3/anti-CD28 (estímulo). Os pacientes foram agrupados em indivíduos controle saudáveis (Ctrl) e pacientes com psoríase sem qualquer terapia (ST), tratados

com Metotrexato (MTX) ou tratados com imunobiológicos (IB), considerando aqui os resultados da metade do ciclo.

FIGURA 4



4 DISCUSSÃO

No presente estudo foram analisadas IL-17A, IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-2 e IL-10 em sobrenadante de pacientes com psoríase em uso de imunobiológicos, antes do pulso terapêutico e no meio do pulso terapêutico.

A IL-17A é considerada a citocina chave no processo inflamatório da psoríase pois ela tem influência direta na ativação e hiperproliferação dos queratinócitos (LYNDE et al., 2014; CAMPA et al., 2016). As medicações imunobiológicas utilizadas no tratamento dessa doença diminuem os níveis dessa citocina por bloqueá-la diretamente como os inibidores de IL-17A ou por bloquear sua produção. O inibidor de IL-12/23 é capaz de bloquear a sua produção pelos linfócitos Th17 através do bloqueio da IL-23, e o bloqueio da IL-12, inibe a produção de TNF- α pelos linfócitos Th1. Com isso, diminui a produção de citocinas pelas células dendríticas mielóides e das células Th1 diminuindo assim, indiretamente, a produção de IL-17A (ZABA et al., 2007; CAMPA et al., 2016). No presente estudo, foi observado que, o estímulo com anti-CD3/anti-CD28, foi capaz de elevar significativamente a produção de IL-17 apenas na primeira coleta realizada antes do pulso terapêutico com Imunobiológico. Entretanto, mesmo com estímulo com anti-CD3/ anti-CD28, após a terapia com o imunobiológico, não houve aumento nos níveis de IL-17.

Nossos resultados, estão de acordo com a literatura, em que os imunobiológicos, tanto os inibidores de TNF- α , quanto inibidores de citocinas (Anti-IL12/23 e anti-IL-17A), demonstraram uma redução na produção direta ou indireta das IL-17A (ZABA et al. 2007). Desta forma sugerimos que a terapia com imunobiológico inibe a produção de IL-17A.

Uma outra citocina envolvida na patogênese da psoríase é o IFN- γ e esta citocina também tem papel importante no processo inflamatório, pois parece estar ligada a perpetuação do processo inflamatório, com papel sinérgico junto a IL-17A na ativação dos queratinócitos. Células Th1, células dendríticas e natural killers são as principais produtoras dessa citocina (BARKER et al., 2015). Estudos demonstram que os níveis séricos aumentados de IFN- γ tem relação direta com a doença ativa (ARICAN et al, 2005). O uso das medicações imunobiológicas também tem-se mostrado eficiente na

redução dos níveis de INF- γ , pois reduzem a atividade das células Th1 produtoras de TNF- α e conseqüentemente de INF- γ (NOGRALES, KRUEGER, 2011). Em nosso estudo, o estímulo com anti-CD3/anti-CD28, foi capaz de elevar significativamente a produção de INF- γ apenas na primeira coleta, que corresponde à situação imediatamente antes do pulso terapêutico com Imunobiológico. Entretanto, mesmo com estímulo após a terapia com o imunobiológico não houve aumento nos níveis de INF- γ . Assim, nossos resultados sugerem, que a terapia com imunobiológico inibe a produção de INF- γ em condição de estímulo.

O TNF- α é uma citocina crucial no processo inflamatório e é produzida por quase todas as células do sistema imune tanto inato e adaptativo. Os níveis circulantes de TNF- α e de outras citocinas como INF- γ e IL-17A, mostram relação direta com a severidade da psoríase (JACOB et al., 2003). A maioria dos estudos mostra uma redução dos níveis de TNF- α com a terapia imunobiológica. As medicações anti-TNF- α bloqueiam a fração livre solúvel e a fração de membrana dessas citocinas (LUCKA et al, 2012). Em nosso estudo, o estímulo com anti-CD3/anti-CD28, foi capaz de elevar significativamente a produção de TNF- α apenas na primeira coleta, que corresponde à situação imediatamente antes do pulso terapêutico com Imunobiológico. Tal achado se mostra de acordo com a literatura que evidencia que as medicações imunossupressoras como o metotrexate e os imunobiológicos são capazes de reduzir os níveis dessa interleucina durante o tratamento (GOTTLIEB et al, 2015).

A IL-10 é considerada a principal citocina antiinflamatória. Tem papel crítico na proteção contra danos teciduais em processos inflamatórios agudos. Ela age suprimindo a expressão de citocinas inflamatórias produzidas por células efectoras (ROJAS et al, 2017). São os linfócitos Foxp3⁺ a sua principal fonte de produção nos tecidos (OUYANG et al., 2011). Existe pouca literatura a respeito da ação dessa citocina na psoríase. Um estudo revelou que os níveis séricos de IL-10 estão reduzidos em pacientes com psoríase ativa (SOBHAN et al., 2016). Em nosso estudo, observamos que em condições de estímulo com anti-CD3/ anti-CD28 a IL-10 também aumenta significativamente antes do pulso terapêutico com Imunobiológico, sugerindo aqui, que estes pacientes tentam fazer uma resposta imune reguladora, mas não o bastante para bloquear a citocinas pro-inflamatórias.

Assim concluímos que o imunobiológico inibe a produção de IL-17, IFN- α , TNF- α e IL-10.

No presente estudo observou-se os linfócitos TCD4⁺/CD69⁺ em condição de estímulo foram significativamente maior antes do pulso com o imunobiológico, sugerindo que no meio do pulso terapêutico, onde paciente estava em pleno efeito da terapia, o estímulo com anti-CD3/anti-CD28 não induziu de maneira significativa a ativação de linfócitos T auxiliares. Estes resultados apontam que a terapia com Imunobiológico controla a ativação de LTCD4⁺. Ainda, no presente estudo, houve um aumento significativo no percentual de células produtoras de IFN- γ em condição de estímulo antes do pulso terapêutico. O IFN- γ é uma citocina pró inflamatória que atua sinergicamente com a IL17A na ativação de queratinócitos e induzindo a liberação de IL-8 que é um fator de quimiotaxia de neutrófilos muito importante (TEUNISSEN et al, 1998). O uso de imunobiológicos tem efeito supressor nessas citocina como TNF- α , IFN- γ e IL-17A. Curiosamente o uso de bloqueadores de TNF- α tem ação mais rápida na população Th17 do que Th1. Citocinas produzidas pelas células Th17 são controladas em até 2 semanas do uso dessas medicações, sendo que os níveis de IFN- γ costumam reduzir por volta de 12 semanas de tratamento (ZABA et al., 2007).

Entretanto, mesmo em condição de estímulo não houve aumento nas células produtoras de IL-17 e tão pouco nas células duplo positivas (IL-17⁺ IFN- γ ⁺). Estes dados sugerem que a terapia com imunobiológico modula a ativação de células TCD4⁺ e a produção de IFN- γ por estas células. Por outro lado, observa-se que o estímulo leva a um aumento significativo de linfócitos TCD4⁺ com fenótipo de Tregulador (TCD25^{hi+}FoxP3⁺LAP⁺) antes do paciente iniciar a terapia com o imunobiológico.

Estes resultados sugerem que esses pacientes tem a capacidade preservada de manter e expandir as células Treg. Todos esses achados são compatíveis com estudos sobre a eficácia dos imunobiológicos no combate a inflamação, controlando linfócitos T efetores como Th1 e Th17. E curiosamente, os inibidores de TNF- α tem efeito mais rápido no controle de populações Th17 do que as células Th1, as quais são controladas em estágios mais tardios da gênese inflamatória. (ZABA et al., 2007). Apesar de vários estudos mostrarem que existe uma diminuição no número e na função dos Tregs na psoríase (MATTOZZI et al, 2012), alguns estudos evidenciaram não haver significância estatística

entre o número de linfócitos Treg em sangue periférico de pacientes com psoríase e pacientes saudáveis. Mostrou até haver um aumento no número de linfócitos Treg em sangue periférico (ZHANG et al, 2010). Talvez esses achados um pouco conflitantes sejam justificados pela diferença nas fases da psoríase, como por exemplo uma doença que esteja ativa e em fase de aumento de lesões em relação a uma doença mais estável com placas já estáveis e formadas e considerando ainda a severidade da doença.

Imunobiológicos controlam ativação linfócitos T auxiliares (LTCD4+), incluindo aqueles produtores de IFN- γ e os linfócitos T com fenótipo regulador (Treg). No presente estudo, também foram avaliados, os pacientes com psoríase sem qualquer terapia (ST), os tratados com Metotrexato (MTX) e os tratados com imunobiológicos (IB), e comparados com os indivíduos controles saudáveis (Ctrl). Observou-se que células estimuladas de pacientes com psoríase, tratados ou não, produzem níveis significativamente menores de TNF- α . O papel da redução dos níveis de TNF- α pelos imunobiológicos já é bem documentada. O metotrexate é um agente imunossupressor antagonista do ácido fólico, tem é capaz de inibir a função de linfócitos B e macrófagos, modulando a IL-1 e inibindo a quimiotaxia de neutrófilos, que também são produtores de IL-17A (SEITZ et al., 1995). Estudos recentes evidenciaram que o uso de metotrexate também é capaz de bloquear a produção de TNF- α por linfócitos e macrófagos (NEURATH et al., 1999). Curiosamente notou-se que pacientes os pacientes sem tratamento também estavam com baixos níveis de TNF- α . Mais uma vez, uma justificativa plausível para esse achado seria o fato de que grande parte desses pacientes por terem seus quadros estáveis, sem períodos de agudização possam estar produzindo níveis basais dessas citocina. Outro fator, seria o fato de que alguns desses paciente, já realizaram tratamentos prévios com metotrexate em períodos não tão distantes da coleta, períodos de pelo menos 30 dias de diferença. Esses resultados sugerem que tanto o IB como o MTX estão conseguindo bloquear os níveis de TNF.

Em nossos resultados, verificamos que, independente do tratamento, pacientes com psoríase produzem significativamente menos IL-10 após estímulo. Tal achado parece estar de acordo com os estudos que evidenciam o mal funcionamento dos linfócitos Treg, em pacientes com psoríase que são os principais produtores dessa interleucina (VALENCIA et al., 2006). Isso sugere os efeitos benéficos do tratamento não

está associado a maior capacidade de produção de IL-10, mas sim, aos efeitos direto da droga MTX e dos imunobiológicos no bloqueio das outras citocinas inflamatórias como o TBF- α e IL-17A. A IL-6 é também uma citocina pró inflamatória. Ela é importante na diferenciação de linfócitos Th17 e na ativação das células dendríticas mielóides (HANLEY, YIU, 2017). Estudos mostram a relação dos níveis dessa citocina com a atividade da doença e sua regulação com os tratamentos imunossupressores (PARK et al, 2017). Nosso estudo mostrou que tanto o tratamento com metotrexate quanto com imunobiológico reduzem significativamente a produção estimulada de IL-6.

Apesar da IL-2 não ter um papel relevante descrito na psoríase ela modula a expressão de receptores de outras citocinas e fatores de transcrição, promovendo ou inibindo a cascata de citocinas relacionadas com a diferenciação de linfócitos T helpers. Dessa forma a IL-2 pode ser responsável por manter a diferenciação de linfócitos Th1 e Th2 como também pode inibir ou estimular a diferenciação de células Th17 (LIAO et al., 2012). Em nosso estudo houve produção basal maior no grupo com imunobiológico, enquanto nas células estimuladas os níveis de IL-2 foi significativamente menor quando comparado ao grupo controle saudável. Assim, acreditamos que o tratamento com imunobiológico pode também estar diminuindo a produção de IL-2. A diminuição de IL-2 corrobora com os achados de um número significativamente menor de LTCD4 ativados (CD69+) encontrados nesses pacientes. Tal fato se mostra de acordo com estudos que demonstram a eficácia dessas medicações no controle da população dessas células (HAWKES ET AL., 2017).

No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de IFN- γ e de IL-17, ou seja, independente do tratamento os níveis de IFN- γ e IL17 não se alteram. Células TH1 e INF- γ estão aumentadas tanto nas lesões quanto no sangue periférico de pacientes com psoríase. O IFN- γ estimula as células dendríticas mielóides a induzir a ativação de células produtoras de IL-17 via liberação de IL-1 e IL-23. Essa também citocina m induz a liberação de fatores quimiotáticos como a CCL20 pelas células dendríticas e queratinócitos o que leva a um aumento na migração de mais células produtoras de IL-17, justificando assim a abundância de células Th17 nas lesões de psoríase (KRYCZEK et al., 2008). Apesar de já ser demonstrado que os níveis de IL-17A tem correspondência direta com a da doença, aumentando com atividade e normalizando

com o tratamento, poucos dados se tem sobre os níveis de sangue periférico dessa citocina (HANLEY, YIU, 2017).

No presente estudo foram avaliadas a expressão de marcadores de ativação celular e expressão intracelular de citocinas nos linfócitos T nos tratados, não tratados e comparados ao grupo controle, e foi observado que pacientes em tratamento com metotrexate e imunobiológico, quando comparados ao grupo controle saudável reduzem significativamente a ativação de linfócitos T CD4. Nossos resultados sugerem que tanto o tratamento com metotrexate ou inibidor do anti-TNF não interfere na capacidade dos LTCD4 produzir IL-17 ou IFN-g. Tal fato já foi demonstrado em outro estudo que mostrou que o uso de imunobiológicos reduz a infiltração inflamatória das lesões mas mantém intacta a população linfocitária na periferia (MAHIQUES et al., 2007). Por outro lado, observa-se que após estímulo há um significativo aumento de linfócitos TCD4+ com fenótipo de Tregulador nos pacientes com psoríase sem tratamento comparados com os pacientes tratados com metotrexate. Isso nos sugere que o talvez que o esteja faltando para um melhor funcionamento dos Tregs nos paciente com psoríase, seria um estímulo adequado. O meio inflamatório em que esses linfócitos se encontram acabam por impedir que esse estímulo aconteça. Por outro lado o uso de imunossupressores como o metotrexate, que tem atividade reguladora sobre linfócitos, pode estar interferindo também nas funções dos linfócitos Tregs. Sugere-se assim que o tratamento com metotrexate interfere na geração das células T com fenótipo Tregulador.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O imunobiológico inibe a produção de IL-17, IFN- γ , TNF- α e IL-10 ;
- O Imunobiológico controla a ativação linfócitos T auxiliares (LTCD4+), incluindo aqueles produtores de IFN- γ e os linfócitos T com fenótipo regulador (Treg);
- Tanto o Imunobiológico como o Metotrexate conseguem inibir a produção TNF α
- Independente do tratamento, pacientes com psoríase produzem significativamente menos IL-10 após estímulo;
- O tratamento com metotrexate ou inibidor do anti-TNF não interfere a capacidade dos LTCD4⁺ produzir IL-17A ou IFN- γ ;
- O tratamento com metotrexate interfere na geração nas células T com fenótipo Tregulador.

6 CONCLUSÃO

O tratamento com imunobiológicos e com metotrexato modulam a produção de citocinas envolvidas na resposta imune de perfil Th1 e Th17.

7 REFERÊNCIAS

1. 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 of Inflammation**, Oxford, v. 2005, n. 5, p. 273-279, oct. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1533889/>>. Acesso em: 18 out. 2017.
2. BRIMHALL, A. K. et al. Safety and efficacy of alefacept, efalizumab, etanercept and infliximab in treating moderate to severe plaque psoriasis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *The British Journal of Dermatology*, Oxford, v. 159, n. 2, p. 274-285, aug. 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18547300>>. Acesso em: 28 out. 2017.
3. CAMPA, M. et al. A Review of Biologic Therapies Targeting IL-23 and IL-17 for Use in Moderate-to-Severe Plaque Psoriasis. *Dermatol Ther (Heidelb)*, v. 6, n. 1, p. 1-12, Mar 2016. ISSN 2193-8210. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26714681>>.
4. COIMBRA, S. et al. The roles of cells and cytokines in the pathogenesis of psoriasis. **International Journal of Dermatology**, Philadelphia, v. 51, n. 4, p. 389-395, apr. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22435425/>>. Acesso em: 21 out. 2017.
5. CUA, D. J. et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*, v. 421, n. 6924, p. 744-8, Feb 2003. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12610626>>.
6. DI MEGLIO, P.; VILLANOVA, F.; NESTLE, F. O. Psoriasis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, v. 4, n. 8, Aug 2014. ISSN 2157-1422. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25085957>>.
7. DIKA, E. et al. Environmental factors and psoriasis. **Current Problems in Dermatology**, Basel, v. 35, p. 118-135, 2007. Disponível em: <<https://www.karger.com/?DOI=10.1159/000106419>>. Acesso em: 18 out. 2017.
8. GANGULY, D. et al. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 206, n. 9, p. 1983-1994, aug. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2737167/>>. Acesso em: 25 out. 2017.
9. GARCIA-DIEZ, A. et al. What characterizes the severity of psoriasis? Results from an epidemiological study of over 3,300 patients in the Iberian region. **Dermatology**, Basel, v. 216, n. 2, p. 137-151, 2008. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/Pdf/111511>>. Acesso em: 18 out. 2017.
10. GIROLOMONI, G.; MROWIETZ, U.; PAUL, C. Psoriasis: rationale for targeting interleukin-17. *Br J Dermatol*, v. 167, n. 4, p. 717-24, Oct 2012. ISSN 1365-2133. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22716185>>.
11. GOTTLIEB, A. B. et al. TNF inhibition rapidly down-regulates multiple proinflammatory pathways in psoriasis plaques. *J Immunol*, v. 175, n. 4, p. 2721-9, Aug 2005. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16081850>>.

12. GRINE, L. et al. An inflammatory triangle in psoriasis: TNF, type I IFNs and IL-17. *Cytokine Growth Factor Rev*, v. 26, n. 1, p. 25-33, Feb 2015. ISSN 1879-0305. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25434285> >.
13. GUDJONSSON, J. E.; JOHNSTON, A.; ELLIS, C. N. Novel systemic drugs under investigation for the treatment of psoriasis. *J Am Acad Dermatol*, v. 67, n. 1, p. 139-47, Jul 2012. ISSN 1097-6787. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22305044> >.
14. HANLEY, T. L.; YIU, Z. Z. Role of IL-17 in plaque psoriasis: therapeutic potential of ixekizumab. *Ther Clin Risk Manag*, v. 13, p. 315-323, 2017. ISSN 1176-6336. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28352182> >.
15. HAWKES, J. E.; CHAN, T. C.; KRUEGER, J. G. Psoriasis pathogenesis and the development of novel targeted immune therapies. *J Allergy Clin Immunol*, v. 140, n. 3, p. 645-653, Sep 2017. ISSN 1097-6825. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28887948> >.
16. HESSELVIG, J. H. et al. Correlation Between Dermatology Life Quality Index and Psoriasis Area and Severity Index in Patients with Psoriasis Treated with Ustekinumab. *Acta Derm Venereol*, Nov 2017. ISSN 1651-2057. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29110019> >.
17. JACOB, S. E. et al. Simultaneous measurement of multiple Th1 and Th2 serum cytokines in psoriasis and correlation with disease severity. *Mediators Inflamm*, v. 12, n. 5, p. 309-13, Oct 2003. ISSN 0962-9351. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14760939> >.
18. IWAKURA, Y. et al. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity*, v. 34, n. 2, p. 149-62, Feb 2011. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21349428> >.
19. KALDEN, J. R.; SCHULZE-KOOPS, H. Immunogenicity and loss of response to TNF inhibitors: implications for rheumatoid arthritis treatment. *Nat Rev Rheumatol*, v. 13, n. 12, p. 707-718, Nov 2017. ISSN 1759-4804. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29158574> >.
20. KAMMÜLLER, M. et al. Inhibition of IL-17A by secukinumab shows no evidence of increased Mycobacterium tuberculosis infections. *Clin Transl Immunology*, v. 6, n. 8, p. e152, Aug 2017. ISSN 2050-0068. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28868144> >.
21. KHANDPUR, S.; BHARI, N. Newer targeted therapies in psoriasis. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, Vellore, v. 79, suppl. 7, p. s47-52, jul. 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23974694> >. Acesso em: 28 out. 2017.
22. KRYCZEK, I. et al. Induction of IL-17⁺ T cell trafficking and development by IFN- γ : Mechanism and pathological relevance in psoriasis. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 181, n. 7, p. 4733-4741, oct. 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2677162/pdf/nihms105193.pdf> >. Acesso em: 25 out. 2017.
23. LANDE, R. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. **Nature**, London, v. 449, n. 7162, p. 564-569, oct. 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17873860> >. Acesso em : 25 out. 2017.

24. LIAO, W.; LIN, J. X.; LEONARD, W. J. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Curr Opin Immunol*, v. 23, n. 5, p. 598-604, Oct 2011. ISSN 1879-0372. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21889323> >.
25. LOWES, M. A.; BOWCOCK, A. M.; KRUEGER, J. G. Pathogenesis and therapy of psoriasis. **Nature**, London, v. 445, n. 7130, p. 866-873, feb. 2007. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17314973/>>. Acesso em: 15 out. 2017.
26. LOWES, M. A. et al. Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *J Invest Dermatol*, v. 128, n. 5, p. 1207-11, May 2008. ISSN 1523-1747. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18200064> >.
27. LUCKA, T. C. et al. Efficacy of systemic therapies for moderate-to-severe psoriasis: a systematic review and meta-analysis of long-term treatment. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, v. 26, n. 11, p. 1331-44, Nov 2012. ISSN 1468-3083. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22404617> >.
28. LYNDE, C. W. et al. Interleukin 17A: toward a new understanding of psoriasis pathogenesis. *J Am Acad Dermatol*, v. 71, n. 1, p. 141-50, Jul 2014. ISSN 1097-6787. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24655820> >.
29. MACHADO-PINTO, J.; DINIZ, M. S.; BAVOSO, N. C. Psoriasis: new comorbidities. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 91, n. 1, p. 8-14, jan./fev. 2016. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4782640/pdf/abd-91-01-0008.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2017.
30. MAHIL, S. K.; CAPON, F.; BARKER, J. N. Update on psoriasis immunopathogenesis and targeted immunotherapy. **Seminars in Immunopathology**, Berlin, v. 38, p. 11-27, 2016. Disponível em:< https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4706579/pdf/281_2015_Article_539.pdf>.
31. MAHIQUES, L. et al. [Analysis of lymphocyte populations in psoriatic plaques following inhibition of tumor necrosis factor alpha with etanercept]. *Actas Dermosifiliogr*, v. 98, n. 8, p. 539-44, Oct 2007. ISSN 0001-7310. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17919428> >.
32. MATTOZZI, C. et al. Importance of regulatory T cells in the pathogenesis of psoriasis: review of the literature. *Dermatology*, v. 227, n. 2, p. 134-45, 2013. ISSN 1421-9832. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24051528> >
33. MENON, R.; DAVID, B. G. Itolizumab – a humanized anti-CD6 monoclonal antibody with a better side effects profile for the treatment of psoriasis. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, Auckland, v. 8, p. 215-222, 2015. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4407739/pdf/ccid-8-215.pdf>>. Acesso em: 18 out. 2017.
34. MUDIGONDA, P. et al. Interleukin-23 and interleukin-17: importance in pathogenesis and therapy of psoriasis. **Dermatology Online Journal**, Davis, v. 18, n. 10, p. 1, oct. 2012. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=mudigonda++IL-23>>. Acesso em: 29 out. 2017.

35. NESTLE, F. O. et al. Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 202, n. 1, p. 135-143, jul. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2212894/pdf/20050500.pdf>>. Acesso em: 19 out. 2017.
36. NESTLE, F. O. et al. Skin immune sentinels in health and disease. **Nature reviews. Immunology**, London, v. 9, n. 10, p. 679-691, oct. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2947825/pdf/nihms-236747.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2017.
37. NEURATH, M. F. et al. Methotrexate specifically modulates cytokine production by T cells and macrophages in murine collagen-induced arthritis (CIA): a mechanism for methotrexate-mediated immunosuppression. *Clin Exp Immunol*, v. 115, n. 1, p. 42-55, Jan 1999. ISSN 0009-9104. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9933419>>.
38. NOGRALES, K. E.; KRUEGER, J. G. Anti-cytokine therapies for psoriasis. *Exp Cell Res*, v. 317, n. 9, p. 1293-300, May 2011. ISSN 1090-2422. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21300061>>.
39. OPPMANN, B. et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*, v. 13, n. 5, p. 715-25, Nov 2000. ISSN 1074-7613. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11114383>>.
40. OUYANG, W. et al. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol*, v. 29, p. 71-109, 2011. ISSN 1545-3278. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21166540>>.
41. PANTELYUSHIN, S. et al. Ror γ t⁺ innate lymphocytes and $\gamma\delta$ T cells initiate psoriasiform plaque formation in mice. *J Clin Invest*, v. 122, n. 6, p. 2252-6, Jun 2012. ISSN 1558-8238. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22546855>>.
42. PAPP, K. A. et al. Efficacy and safety of secukinumab in the treatment of moderate-to-severe plaque psoriasis: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase II dose-ranging study. *Br J Dermatol*, v. 168, n. 2, p. 412-21, Feb 2013. ISSN 1365-2133. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23106107>>.
43. PARISI, R. et al. Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence. **The Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 133, n. 2, p. 377-385, feb. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23014338>>. Acesso em: 16 out. 2017
44. PARK, G. et al. Altered TNF- α response by Aconibal[®] and methotrexate in a lipopolysaccharide-induced setting of inflammatory conditions: Potential on a synergistic combination. *J Ethnopharmacol*, v. 213, p. 191-197, Nov 2017. ISSN 1872-7573. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29166574>>.
45. PUIG, L. PASI90 response: the new standard in therapeutic efficacy for psoriasis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, Amsterdam, v. 29, n. 4, p. 645-648, apr. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25370811>>. Acesso em: 18 out. 2017.

46. ROJAS, J. M. et al. IL-10: A Multifunctional Cytokine in Viral Infections. *J Immunol Res*, v. 2017, p. 6104054, 2017. ISSN 2314-7156. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28316998> >.
47. RONHOLT, K.; IVERSEN, L. Old and New Biological Therapies for Psoriasis. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 18, n. 11, p. 2297, 2017. Disponível em:< <http://www.mdpi.com/1422-0067/18/11/2297/htm>>. Acesso em: 12 out. 2017.
48. SANTINI, S. M. et al. Interferon- α -conditioned human monocytes combine a Th1-orienting attitude with the induction of autologous Th17 responses: role of IL-23 and IL-12. **PloS One**, San Francisco, v. 6, n. 2, p. e17364, feb. 2011. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3046151/>>. Acesso em: 19 nov. 2017.
49. SATVEER, K. M.; CAPON, F.; BARKER, J. N. Update on psoriasis immunopathogenesis and targeted immunotherapy. **Seminars in Immunopathology**, Berlin, v. 38, p. 1-27, 2016. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4706579/>>. Acesso em: 26 out. 2017.
50. SCHÖN, M. P.; BOEHNCKE, W. H. Psoriasis. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 352, n. 18, p. 1899-1912, maio 2005. Disponível em:< <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra041320>>. Disponível em: 18 out. 2017.
51. SEITZ, M. et al. Methotrexate action in rheumatoid arthritis: stimulation of cytokine inhibitor and inhibition of chemokine production by peripheral blood mononuclear cells. *Br J Rheumatol*, v. 34, n. 7, p. 602-9, Jul 1995. ISSN 0263-7103. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7670776> >.
52. SIVAMANI, R. K. et al. Biologic therapies in the treatment of psoriasis: a comprehensive evidence-based basic science and clinical review and a practical guide to tuberculosis monitoring. *Clin Rev Allergy Immunol*, v. 44, n. 2, p. 121-40, Apr 2013. ISSN 1559-0267. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22311162> >.
53. SOBHAN, M. R. et al. Serum Levels of IL-10 and IL-22 Cytokines in Patients with Psoriasis. *Iran J Immunol*, v. 13, n. 4, p. 317-323, Dec 2016. ISSN 1735-367X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27999243> >.
54. SUMMERS DE LUCA, L.; GOMMERMAN, J. L. Fine-tuning of dendritic cell biology by the TNF superfamily. **Nature Reviews. Immunology**, London, v. 12, n. 5, p. 339-351, apr. 2012. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22487654/>>. Acesso em: 20 out. 2017.
55. TEUNISSEN, M. B. et al. Interleukin-17 and interferon-gamma synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes. **J Invest Dermatol**, v. 111, n. 4, p. 645-9, Oct 1998. ISSN 0022-202X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9764847> >.
56. VALENCIA, X. et al. TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood*, v. 108, n. 1, p. 253-61, Jul 2006. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16537805> >.
57. YANG, L. et al. Impaired function of regulatory T cells in patients with psoriasis is mediated by phosphorylation of STAT3. *J Dermatol Sci*, v. 81, n. 2, p. 85-92, Feb 2016. ISSN 1873-569X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26627723> >.

58. ZABA, L. C. et al. Amelioration of epidermal hyperplasia by TNF inhibition is associated with reduced Th17 responses. *J Exp Med*, v. 204, n. 13, p. 3183-94, Dec 2007. ISSN 1540-9538. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18039949> >.
59. ZHANG, L. et al. Increased Th17 cells are accompanied by FoxP3(+) Treg cell accumulation and correlated with psoriasis disease severity. *Clin Immunol*, v. 135, n. 1, p. 108-17, Apr 2010. ISSN 1521-7035. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20006553> >.