

Abstract

Psoriasis is a chronic inflammatory skin disease that affects about 2-3% of the world population. Psoriatic lesions seem to result from the interaction of several different cell types, and a close interdependence between them and their activation products seems to occur.

Previous studies in our lab contributed to characterise the physiopathology of psoriasis, and to establish differences between the mild and the severe form of psoriasis *vulgaris*. By comparing them a proposal of an analytical panel with potential prognostic value was raised. Our aim was to validate the prognostic significance of inflammation and oxidative stress markers in psoriasis *vulgaris*, to contribute to a better understanding of the physiopathology of the disease, to establish the differences between the mild, moderate and severe forms, to study the analytical changes imposed by common psoriatic therapies, to evaluate the association with cardiovascular disease, and the social and psychological impact of the disease and used therapy.

A cross-sectional (n=73) and a longitudinal study (n=47) (before, at 3, 6 and 12 weeks of commencing therapy) in Portuguese psoriasis *vulgaris* patients were performed. Psoriasis therapies studied were narrow-band ultraviolet light B (NBUVB), psoralen plus UVA (PUVA) and topical treatment. Psoriasis severity was defined by Psoriasis Area and Severity Index (PASI). A control group included 40 healthy volunteers. Patients and controls were matched for age, gender and smoking habits. Patients and controls presenting other skin diseases, diabetes *mellitus*, anaemia, inflammatory or infectious diseases, cardiovascular, liver or kidney diseases, were excluded from the study. None of the patients received any treatment for at least 1 month prior to be included.

We analysed haematological data, products of neutrophil activation (elastase and lactoferrin), neutrophil inhibitors (α_1 -antitrypsin and α_2 -macroglobulin), C-reactive protein (CRP), markers of redox status (total antioxidant status and lipid peroxidation), traditional lipid profile, oxidized low-density lipoprotein, markers of red blood cell (RBC) damage (erythrocyte membrane-bound haemoglobin and the erythrocyte band 3 profile) and removal (total bilirubin), cytokines related with visceral adipose tissue (adiponectin, resistin, leptin, tumour necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-6). We also evaluated the circulating levels of IL-8, vascular endothelial growth factor (VEGF), IL-22 and IL-23. The health related quality of life (HRQOL) was evaluated by the Medical Outcome Survey Short Form 36 and the Dermatology Life Quality Index.

It is accepted that several acute phase reactants, cytokines and growth factors play an important role in the pathogenesis of psoriasis *vulgaris*. We found that patients presented significantly higher plasma levels of several cytokines, namely T-helper

(Th)1/Th17 cytokines. Our data suggest that the cytokines studied may, actually, play an important role in the pathogenesis of psoriasis, as they seem to be important in triggering and mediating the immuno-inflammatory response in psoriasis. Moreover, we found that inflammation appears to be strongly linked to angiogenesis, and reflects the extent of psoriatic skin involvement.

During treatment with NBUVB and PUVA, a decrease in IL-23 and TNF- α was observed at the 3rd week, followed by a decrease in IL-22 at the 6th week, and only at the 12th week a decrease in VEGF and in IL-8 were observed. Therefore, we propose an immuno-inflammatory pathway for psoriasis that involves the production of TNF- α and IL-23 from dendritic cells, which causes activation and proliferation of Th1 cells, Th17 cells and monocytes/macrophages. Subsequently, Th17 cells induce the expression of IL-17 and IL-22. IL-22 induces keratinocyte hyperplasia and mediates IL-23-induced dermal inflammation and achantosis. It has been proposed that IL-23 dysregulation might be a causative independent factor in the pathogenesis of psoriasis, as it sets in motion several pathways leading to neutrophil recruitment, and to stimulation for the production of other cytokines, which may directly act on keratinocytes in a TNF-regulated way, resulting in epidermal hyperplasia and/or altered keratinocyte differentiation. Our results support this hypothesis, as the reduction in IL-23 (the first change observed with treatment of the disease) seems to be crucial for the following changes observed for the other cytokines. Activation of keratinocytes is associated with IL-8 secretion, resulting in neutrophil mobilization and activation, and in induction of angiogenesis, as they also produce VEGF. Moreover, as a consequence of neutrophil activation, their degranulation occurs, which results in releasing of activation products, such as elastase and lactoferrin. The release of these neutrophil activation products has to be counterbalanced by endogenous systems, to reduce or to avoid the inflammatory process, resulting, for instance, in higher levels of α_1 -antitrypsin. TNF- α is known to induce IL-6 expression, and increased levels of both cytokines results in CRP release, confirming psoriasis as a condition in which inflammatory response is marked. Neutrophil activation also results in ROS release which increases the oxidative stress. As a consequence, oxidative modifications in plasma constituents, as shown by the increased lipid peroxidation levels, and in RBCs, shown by an enhancement in the oxidative lesions within the erythrocyte and damage or senescence of the circulating RBCs, occurs.

We found that increasing psoriasis severity was associated to an increasing in CRP. We also observed a trend towards higher values of neutrophil activation products, suggesting that worsening of psoriasis is linked to the activation of these cells. In addition, IL-6 and CRP were correlated positively and significantly with PASI, and the latter correlated also with total leukocytes, with neutrophils and with elastase and lactoferrin, as

well as, with the specific inhibitor of elastase, α_1 -antitrypsin. TNF- α and IL-8 also correlated positively and significantly with psoriasis severity, as defined by PASI. These results further strengthen the linkage between the severity of psoriasis with and an enhancement in inflammatory response. Therefore, we propose PASI, together with CRP, IL-6, elastase, TNF- α and IL-8 as useful markers of psoriasis severity.

About 70% of our group of patients presented overweight or obesity, as defined by body mass index. This, probably, underlie the altered levels of cytokines that usually associate with visceral adipose tissue, namely, adiponectin, leptin, resistin, IL-6 and TNF- α . Our data confirms psoriasis as a pro-atherogenic condition, as it is associated with dislipidaemia, inflammation, oxidative stress, overweight/obesity and high adiposity with enhanced adipokine secretion. Therefore, it is reasonable to assume that the association of several risk factors, as we observed, may explain the high rates of morbidity and mortality due to cardiovascular disease events reported in psoriasis.

Psoriasis is known to have a profound impact on patient's HRQOL. We found that the improvement in clinical severity and symptoms associates with an improvement in HRQOL of patients, resulting in a positive effect in their physical, mental and social well-being. Concerning the effect of therapies in HRQOL, PUVA and NBUVB treatments were both effective, mainly NBUVB, contributing to a significant improvement of HRQOL. Furthermore, we found that PASI relates with HRQOL and, under treatment, reduction of PASI correlates well with improvement in HRQOL.

Key-words: psoriasis *vulgaris*; inflammatory response; oxidative stress; psoriasis therapy; psoriasis comorbidities

Resumo

A psoríase é uma doença inflamatória crónica que afecta aproximadamente 2-3% da população mundial. As lesões psoriáticas parecem resultar da interacção de diferentes tipos de células, e de uma significativa interdependência entre essas células e os seus produtos de activação.

Em estudos anteriores contribuímos para a caracterização da fisiopatologia da psoríase, avaliando as diferenças entre a forma ligeira e grave da psoríase *vulgaris*. Esses estudos permitiram-nos propor um painel analítico com potencial valor prognóstico na psoríase. O presente estudo teve como objectivos validar o significado prognóstico de marcadores inflamatórios e de “stress” oxidativo na psoríase *vulgaris*, contribuir para o conhecimento da sua fisiopatologia, estabelecer diferenças entre as formas ligeiras, moderadas e severas, estudar as alterações analíticas impostas pelas terapêuticas mais usadas, avaliar a sua associação com a doença cardiovascular, e o impacto social e psicológico da doença e da terapêutica.

Procedeu-se a um estudo transversal (n=73) e a um estudo longitudinal (n=47) (antes do tratamento e 3, 6 e 12 semanas após o seu início) em doentes Portugueses com psoríase *vulgaris*. No tratamento foi usada a radiação ultravioleta B de banda-estreita (NBUVB), a associação de psoraleno com radiação ultravioleta A (PUVA) e agentes tópicos. A avaliação do PASI (Psoriasis Area and Severity Index) permitiu definir a severidade da psoríase. O grupo controlo incluiu 40 voluntários saudáveis. Os grupos de doentes e de controlos foram equilibrados para a idade, sexo e hábitos tabágicos. Doentes e controlos com outras doenças cutâneas, diabetes *mellitus*, anemia, doença inflamatória ou infecciosa, doença cardiovascular, hepática ou renal, foram excluídos do estudo. Nenhum dos doentes recebeu qualquer tipo de tratamento 1 mês antes do início do estudo.

Avaliou-se o hemograma, o valor de reticulócitos, a concentração sanguínea de produtos de activação do neutrófilo (elastase e lactoferrina), de inibidores do neutrófilo (α_1 -antitripsina e α_2 - macroglobulina), de proteína C reactiva (PCR), de marcadores de “status redox” (“total antioxidant status” e os níveis de peroxidação lipídica); avaliou-se, ainda, o perfil lipídico, o valor de lipoproteína de baixa densidade oxidada, de marcadores de lesão (hemoglobina ligada à membrana e perfil eritrocitário da banda 3) e de remoção (bilirrubina total) de eritrócitos; a concentração de citoquinas produzidas pelo tecido adiposo visceral (adiponectina, resistina, leptina, factor de necrose tumoral (TNF)- α e interleuquina (IL)-6); os níveis plasmáticos de IL-8, do factor de crescimento endotelial vascular (VEGF), de IL-22 e de IL-23 foram também avaliados. Para o estudo da

qualidade de vida dos doentes foram aplicados formulários validados, o SF-36 (Medical Outcome Survey Short Form 36) e o DLQI (Dermatology Life Quality Index).

É aceite que vários indicadores de fase aguda, citoquinas e factores de crescimento desempenham um papel importante na patogénese da psoríase. Verificámos que os doentes estudados apresentavam níveis plasmáticos de citoquinas elevados, nomeadamente, citoquinas do tipo Th1 e Th17. Estes resultados sugerem que as citoquinas estudadas podem, de facto, desempenhar um papel importante na patogénese psoriática, pois, parecem ser cruciais na mediação e activação da resposta imuno-inflamatória. Além disso, verificámos que a inflamação parece estar fortemente relacionada com a angiogéneses, reflectindo a extensão de envolvimento cutâneo psoriático.

Durante o tratamento com NBUVB e com PUVA, observou-se uma diminuição dos níveis de IL-23 e de TNF- α na 3^a semana, seguida por uma diminuição de IL-22 na 6^a semana, e apenas às 12 semanas de tratamento se observou uma diminuição nos níveis de IL-8 e VEGF. Assim, propomos um mecanismo imuno-inflamatório para a psoríase que envolve a produção de TNF- α e IL-23 pelas células dendríticas, que determinam a activação e proliferação das células Th1, das células Th17 e dos monócitos/macrófagos. As células Th17 induzem de seguida a expressão de IL-17 e de IL-22. Esta induz hiperplasia dos queratinócitos e medeia a inflamação dérmica e a acantose induzida pela IL-23. A desregulação da IL-23 foi proposta como um factor independente e importante na patogénese da psoríase, já que desencadeia vários mecanismos que conduzem ao recrutamento de neutrófilos, e à estimulação da produção de outros citoquinas, que podem actuar directamente nos queratinócitos via regulação do TNF, desencadeando hiperplasia da epiderme e/ou alteração da diferenciação dos queratinócitos. Os nossos resultados reforçam esta hipótese, pois, diminuição de IL-23 (a primeira alteração observada com o tratamento) parece ser crucial para as alterações que se seguiram nas outras citoquinas. A activação dos queratinócitos está associada com a secreção de IL-8, que irá mobilizar e activar os neutrófilos, e com a indução de angiogéneses, uma vez que também produzem VEGF. Como resultado da activação dos neutrófilos, há desgranulação, com libertação do seu conteúdo, nomeadamente em elastase e a lactoferrina. A libertação destes produtos de activação deve ser contrabalançada por sistemas endógenos, de forma a reduzir ou inibir o processo inflamatório, desencadeando, por exemplo, um aumento de α_1 -antitripsina, o inibidor específico da elastase. O TNF- α induz a expressão de IL-6, e ambos estimulam a produção de PCR, o que confirma a psoríase como uma condição em que a resposta inflamatória é acentuada, uma vez que todos estavam aumentados nos doentes. A activação dos

neutrófilos é também acompanhada pela libertação de metabolitos de oxigénio, que podem contribuir para o desenvolvimento de “stress” oxidativo. De facto, observámos modificações oxidativas no plasma, nomeadamente, níveis aumentados de peroxidação lipídica, e também nos eritrócitos, que evidenciavam lesões oxidativas e de envelhecimento, determinantes de uma remoção mais acentuada.

Observámos uma relação da severidade da psoríase com um aumento da PCR e uma tendência para o aumento dos produtos de activação neutrofílica, sugestiva de uma relação com a activação dos neutrófilos. A IL-6 e a PCR correlacionavam-se também com o PASI. Verificámos, ainda, que a PCR se correlacionava com o valor de leucócitos e de neutrófilos, com a elastase e lactoferrina e, ainda, com a α_1 -antitripsina. O TNF- α e a IL-8 também se correlacionavam com severidade da doença, definida pelo PASI. Estes resultados reforçam a associação entre severidade da psoríase e o valor da resposta inflamatória. Assim, propomos como marcadores de severidade da psoríase o PASI, a PCR, a IL-6, a elastase, o TNF- α e a IL-8.

Cerca de 70% dos doentes apresentavam excesso de peso ou obesidade, definido pelo índice de massa corporal, o que poderá explicar os níveis alterados das citoquinas produzidas pelo tecido adiposo visceral, nomeadamente, a adiponectina, a leptina, a resistina, a IL-6 e o TNF- α . Os resultados obtidos confirmam a psoríase como uma condição pro-aterogénica, uma vez os doentes associam dislipidemia com inflamação, “stress” oxidativo, excesso de peso/obesidade e secreção elevada de adipocinas pró-inflamatórias. A associação de diversos factores de risco nestes doentes, poderá explicar a elevada morbilidade e mortalidade por eventos relacionados com doença cardiovascular, observada nos doentes com psoríase.

A psoríase é uma doença com impacto significativo na qualidade de vida dos doentes. Neste estudo, observámos que uma melhoria na severidade das lesões e nos sintomas clínicos se associavam a uma melhoria da qualidade de vida dos doentes, com um efeito positivo no seu bem-estar físico, mental e social. O tratamento com PUVA e NBUVB, ambos eficazes, contribuíam para uma melhoria significativa da qualidade de vida e, durante o tratamento, a redução do PASI correlacionava-se com a melhoria na qualidade de vida. Observou-se, ainda, que o PASI se relaciona com a qualidade de vida.

Palavras-chave: psoríase *vulgaris*; resposta inflamatória; “stress” oxidativo; tratamento da psoríase; comorbidades associadas à psoríase