



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Centro de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

Rafaela Silva Guimarães Gonçalves

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DE ESTATINAS EM
PACIENTES PORTADORES DE ESCLEROSE SISTÊMICA

Recife
2017

Rafaela Silva Guimarães Gonçalves

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DE ESTATINAS EM
PACIENTES PORTADORES DE ESCLEROSE SISTÊMICA**

Defesa da Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Inovação
Terapêutica da Universidade Federal de
Pernambuco, para a obtenção do Título de Doutor
em Inovação Terapêutica

Orientadora:

**Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha
Pitta**

Co-orientadoras:

**Profa. Dra. Michelly Cristiny Pereira
Profa. Dra. Angela Luzia Branco Pinto
Duarte**

Recife

2017

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Gonçalves, Rafaela Silva Guimarães

Avaliação da atividade imunomoduladora de estatinas em pacientes portadores de Esclerose Sistêmica/ Rafaela Silva Guimarães Gonçalves- 2015.

147 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Maira Galdino da Rocha Pitta

Coorientadoras: Michelly Cristiny Pereira e Angela Luzia Branco
Pinto Duarte

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação
Terapêutica. Recife, 2015.

Inclui referências, apêndices e anexos

1. Escleroderma Sistêmico 2. Estatinas (agentes cardiovasculares) 3.
Citocinas I. Maira Galdino da Rocha Pitta (orient.) II. Pereira, Michelly
Cristiny (coorient.) III. Duarte, Angela Luzia Branco Pinto (coorient.) IV.
Título

616.723

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-164

Rafaela Silva Guimarães Gonçalves

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DE ESTATINAS EM PACIENTES PORTADORES DE ESCLEROSE SISTÊMICA

Defesa da Tese de Doutorado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Inovação Terapêutica da
Universidade Federal de Pernambuco,
para a obtenção do Título de Doutor em
Inovação Terapêutica

Aprovada em: 12/12/2017

Banca Examinadora

Prof(a). Dra. ANDREA TAVARES DANTAS

Instituição:

Assinatura: _____

Prof(a). Dra CLAUDIA DINIZ LOPES MARQUES

Instituição:

Assinatura: _____

Prof(a). Dr. MAIRA GALDINO DA ROCHA PITTA

Instituição:

Assinatura: _____

Prof(a). Dr. VIRGÍNIA MARIA BARROS DE LORENA

Instituição:

Assinatura: _____

Prof(a). Dr. VALÉRIA REGO ALVES PEREIRA

Instituição:

Assinatura: _____

Dedico este trabalho a todos pacientes portadores de Esclerose Sistêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família: meu marido, meus pais, por todo o suporte emocional e físico dispensados a mim e às minhas filhas; sem isso nada seria possível.

Agradeço a equipe do laboratório LINAT e a equipe do Hospital das Clínicas, pois sem eles, seria muito mais árdua a minha jornada.

Anderson agradeço seu companheirismo, tão importante nos momentos que precisei de apoio moral, em meio a tantos experimentos, sua presença foi essencial para o meu desenvolvimento.

Moacyr suas idéias sempre geniais me incentivaram muito, e sua perspicácia em ver sempre a outra face, foi extremamente relevante para o desfecho deste trabalho.

Maíra com toda a sabedoria e experiência científica foi de ímpar importância para direcionar este projeto. Obrigada.

Duas pessoas merecem meu atencioso carinho e minha eterna gratidão. Foram minhas guias nesta empreitada desde o início, lá no mestrado... e que de formas diferentes mas com intensidades semelhantes, Michelly e Andréa: meu muito obrigada!

Agradeço de forma especial à minha mentora intelectual, que influencia meu intelecto desde muito antes deste projeto, aquela que me incentivou e abriu o meu caminho até chegar aqui, hoje: Dra Angela.

Tenho muito a agradecer, e a muitas pessoas... Definitivamente, sem o auxílio de todos, de cada opinião, de cada gesto de solidariedade, de cada experiência a mim repassada, de cada crítica, de cada incentivo e palavras de estímulo, eu não teria conseguido executar e finalizar este trabalho.

RESUMO

A Esclerose Sistêmica (ES) é uma doença do tecido conjuntivo rara, multissistêmica, e sem tratamento específico. A doença é definida por três importantes pilares: comprometimento vascular, produção de auto-anticorpos e inflamação, e a fibrose. Apesar das estatinas já serem administrada com sucesso no tratamento da hipercolesterolemia e da doença cardiovascular, devido a sua ação hipolipemiante e anti-aterosclerótica, têm mostrado efeitos imunomoduladores em diversos estudos em outras doenças com Artrite Reumatóide e Esclerose Múltipla. Os objetivos deste estudo foram investigar os efeitos do tratamento das estatinas sobre a produção de citocinas Th1, Th2 e Th17 em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) estimuladas com anti-CD3/CD28 obtidas de pacientes com ES. Foram recrutados 21 pacientes classificados de acordo com os critérios do *American College of Rheumatology* para ES para a análise da cultura de PBMCs. Os níveis de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN γ , IL-17A e IL-17F) foram quantificados por ELISA ou CBA, e os pacientes foram avaliados quanto às variáveis clínicas e de exames. Como resultados observamos que a sinvastatina e atorvastatina na dose de 50 μ M promoveram redução em todos os níveis de citocinas com significância estatística, com exceção da IL-6, que teve sua redução apenas induzida pelo uso de sinvastatina. Não houve diferença entre os subgrupos clínicos ou em função do tratamento já utilizado para a doença de base. Concluimos, então, que as estatinas, em particular a sinvastatina, parecem ter efeito imunossupressor, uma vez que reduziram todos os níveis de secreção de citocinas de PBMCs de forma dependente da dose.

Palavras-chave: Estatina. Esclerose sistêmica. Citocinas. Th1. Th2. Th17.

ABSTRACT

Systemic Sclerosis (SSc) is a rare, multisystemic, connective tissue disease without specific treatment. The disease is defined by three important pillars: vascular involvement, autoantibody production and inflammation, and fibrosis. Although statins have been successfully administered in the treatment of hypercholesterolemia and cardiovascular disease due to their lipid-lowering and anti-atherosclerotic action, they have shown immunomodulatory effects in several studies in other diseases with Rheumatoid Arthritis and Multiple Sclerosis. The objectives of this study were to investigate the effects of statin treatment on the production of Th1, Th2 and Th17 cytokines in stimulated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from SSc patients. We recruited 21 patients classified according to the American College of Rheumatology criteria for SSc to analyse culture of PBMCs. The levels of cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN γ , IL-17A and IL-17F) were quantified by ELISA or CBA, and patients were evaluated for clinical and of exams. As a result, we observed that simvastatin and atorvastatin at the dose of 50 μ M promoted a reduction in all levels of cytokines with statistical significance, except for IL-6, which was only induced by simvastatin. We conclude, therefore, that statins, particularly simvastatin, appear to have an immunosuppressive effect, since they have reduced all levels of cytokine secretion of PBMCs in a dose-dependent manner.

Key words: *Statin. Systemic sclerosis. Cytokines. Th1. Th2. Th17.*

Divagações

Pra quê
Pra onde e pra quando...
Caminhos sinuosos
Estreitos e pontes
Alguém ao norte espia
O que ainda reflete no sul
Placa torta
Tudo importa
Quando não há desatenção
Atento se tenta
Pras variáveis divagações da vida
Versejo aparentemente abrupto
Mas com direção
Endereço certo
Papel apertado na mão
A busca
A conquista
Tudo no rumo
Em direções
Que só se sabe
Pondo o pé pra caminhar
As horas nos sopram rugas na cara
Mastiga o presente
Cospe passado
E cozinha o futuro
Tudo é céu
Que tem nuvens
Que trazem chuvas
Ou sombras
Mas que passa
Como tudo passa
Incrível!... como tudo passa

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fenômeno de Raynaud	21
Figura 2 - Leucomelanodermia	23
Figura 3 - Etiopatogênese da ES	30
Figura 4 - Desenho esquemático do delineamento do estudo	40
Figura 5 - Avaliação da atividade imunomoduladora das estatinas em culturas de PBMC de pacientes com ES (Níveis de IL-2).	45
Figura 6 - Avaliação da atividade imunomoduladora das estatinas em culturas de PBMC de pacientes com ES (Níveis de IL-4).	45
Figura 7 - Avaliação da atividade imunomoduladora das estatinas em culturas de PBMC de pacientes com ES (Níveis de IL-10).	46
Figura 8 - Avaliação da atividade imunomoduladora das estatinas em culturas de PBMC de pacientes com ES (Níveis de IL-17A).	47
Figura 9 - Avaliação da atividade imunomoduladora das estatinas em culturas de PBMC de pacientes com ES (Níveis de INF γ).	47
Figura 10 - Avaliação da atividade imunomoduladora das estatinas em culturas de PBMC de pacientes com ES (Níveis de TNF).	48
Figura 11 - Avaliação da atividade imunomoduladora das estatinas em culturas de PBMC de pacientes com ES (Níveis de IL-6).	48
Figura 12 - Avaliação da atividade imunomoduladora das estatinas em culturas de PBMC de pacientes com ES (Níveis de IL-17F).	49
Figura 13 - Avaliação da resposta ao tratamento de sinvastatina 10 μ M em culturas PBMC de pacientes com sa formas difusa e limitada.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Moléculas de sinalização implicadas na patogênese da fibrose na Esclerose Sistêmica	29
Tabela 2 - Citocinas avaliadas pela técnica ELISA, fabricantes e limites de detecção	41
Tabela 3 - Citocinas do <i>Kit CBA Human</i> Th1/Th2/Th17 e limites de detecção	42
Tabela 4 - Comparação das características clínicas entre as formas cutânea difusa e limitada de pacientes com Esclerose Sistêmica coletados (n=21)	43

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ALK 5	Receptor de linfoma anaplásico tirosina-quinase, do inglês: <i>anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase</i>
ACR	Colégio Americano de Reumatologia, do inglês: <i>American College Rheumatology</i>
CCL3	Quimiocina (C-C motif) ligante 3, do inglês: <i>chemokine (C-C motif) ligand 3</i>
CTGF/CCN2	Fator de crescimento do tecido conectivo, do inglês: <i>connective tissue growth factor</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar, do inglês: <i>deoxyribonucleic acid complementary</i>
DNase	Desoxirribonuclease do inglês: <i>deoxyribonuclease</i>
Erg	Vírus eritroblastose aviário, do inglês: <i>v-ets avian erythroblastosis virus</i>
ERK	Quinase MAP regular extracelular, do inglês: <i>extracellular regulated MAP kinase</i>
ET	Endotelina
ES	Esclerose Sistêmica
ESd	Esclerose Sistêmica difusa
ESl	Esclerose Sistêmica limitada
FAN	Fator Anti-Nuclear
Fry	Fenômeno de Raynaud
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HC	Hospital das Clínicas
HLA	Antígeno Leucocitário Humano do inglês: <i>Human leukocyte antigen</i>
ICAM	Molécula de adesão intercelular do inglês: <i>intercellular adhesion molecule</i>
IL	Interleucina
INF γ	Interferon gama

IRF5	Fator regulatório do interferon 5, do inglês: <i>interferon regulatory factor 5</i>
MAP <i>kinases</i>	Quinase proteína mitógeno- ativada, do inglês: <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1	Proteína quimioatratante de monócito 1Do inglês: <i>monocyte chemoattractant protein 1</i>
MEC	Matriz extra-celular
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade, do inglês: <i>major histocompatibility complex</i>
MIP1	Proteína Inflamatória de Macrófago, do inglês: <i>Macrophage Inflammatory Proteins</i>
miRNA	Micro-Ácido Ribonucleico
MMPs	Metaloproteinases egradantes da matriz
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
PDGF	Fator de crescimento de plaquetas, do inglês: <i>platelet-derived growth factor</i>
PPAR γ	Receptor Ativado de Proliferação Nuclear do Peroxissoma gama, do inglês: <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
SCF	Fatores de células-tronco, do inglês: <i>stem cell factor</i>
SCID	Imunodeficiência combinada severa, do inglês: <i>Severe combined immunodeficiency</i>
sHAQ	Questionário de Avaliação de Saúde da Esclerodermia, do inglês: <i>Scleroderma Health Assessment Questionnaire</i>
SMA α	Actina de músculo liso alpha do inglês: <i>Alpha-Smooth Muscle Actin</i>
SPARC	Proteína secretada, ácido, rico em cisteína, do inglês: <i>secreted protein, acidic, cysteine-rich</i>
SCR	Oncogene de sarcoma Rous, do inglês: <i>Rous sarcoma oncogene</i>
STAT	Transdutor e ativador da transcrição do sinal, do inglês: <i>signal transducer and activator of transcription</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TAC	Tomografia de alta resolução

TGF	Fator de crescimento de transformação, do inglês: <i>transforming growth fator</i>
Th	T auxiliar, do inglês: <i>T-helper</i>
TNF	Fator de necrose tumoral do inglês: <i>tumor necrosis fator</i>
TLR	Receptores do tipo toll, do inglês: <i>toll like-receptor</i>
Treg	Células T regulatórias
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VAS	Escala analógica visual, do inglês: <i>visual analogue scale</i>
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular, do inglês: <i>vascular endothelial growth factor</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alpha
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Celsius
Ct	Limiar de ciclo, do inglês: <i>Cycle of threshold</i>
Δ	Delta
γ	Gama
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	
2.1 Geral	18
2.2 Específicos	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	
3.1 Definição	19
3.2 Epidemiologia	19
3.3 Etiologia	19
3.4 Aspectos Clínicos e Critérios de Classificação	20
3.4.1 <i>Sintomas iniciais</i>	22
3.4.2 <i>Aspectos cutâneos</i>	22
3.4.3 <i>Sintomas vasculares</i>	24
3.4.4 <i>Envolvimento musculoesquelético</i>	24
3.4.5 <i>Envolvimento pulmonar</i>	24
3.4.6 <i>Envolvimento cardíaco</i>	25
3.4.7 <i>Envolvimento gastrointestinal</i>	25
3.4.8 <i>Envolvimento renal</i>	26
3.5 Fisiopatologia da ES	26
3.5.1 <i>TNF</i>	31
3.5.2 <i>IL-10</i>	32
3.5.3 <i>IFNγ e IL-2 (Th1)</i>	32
3.5.4 <i>Citocinas da via Th17</i>	33
3.5.5 <i>IL-4 e IL-13 (Th2)</i>	34
3.5.6 <i>IL-6</i>	35
3.6 Tratamento e as Estatinas	36
4 METODOLOGIA	40
4.1 Recrutamento de pacientes portadores de Esclerose Sistêmica	40
4.2 Coleta de sangue e cultura de células mononucleadas de sangue periférico	41
4.3 Determinação de citocinas	42
4.3.1 <i>Dosagem de citocinas por ELISA</i>	42

4.3.2 Dosagem de citocinas por CBA	42
4.4 Análise dos resultados	43
5 RESULTADOS	44
5.1 Determinação do perfil clínico dos pacientes com esclerose sistêmica	44
5.2 Avaliação do efeito das Estatinas em cultura de PBMC em pacientes com ES	44
5.3 Avaliação do efeito das estatinas nos subgrupos da ES separados de acordo com as formas de doença: difusa e limitada	49
5.4 Efeito das estatinas no perfil da citocina correlacionada com medidas clínicas	51
6 DISCUSSÃO	53
7 CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	58
APÊNDICE A - FICHA CLÍNICA Nº 1	72
APÊNDICE B - FICHA CLÍNICA Nº 2	80
APÊNDICE C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO	85
APÊNDICE D - ARTIGO DOS RESULTADOS SUBMETIDO NA <i>MEDIATORS OF INFLAMMATION</i>: STATINS INHIBIT CYTOKINES IN A DOSE-DEPENDENT RESPONSE IN PATIENTS WITH SYSTEMIC SCLEROSIS; E AS INSTRUÇÕES PARA SUBMISSÃO DO ARTIGO NA <i>REVISTA CITADA</i>	88
APÊNDICE E - ARTIGO DE REVISÃO SUBMETIDO NA <i>AUTOIMMUNITY</i>: IL-17 AND RELATED CYTOKINES INVOLVED IN SYSTEMIC SCLEROSIS: PRESENT AND FUTURE PERSPECTIVES; ACEITO, E AS INSTRUÇÕES PARA SUBMISSÃO DO ARTIGO NA <i>REVISTA CITADA</i>	108
ANEXO A - CRITÉRIOS DO <i>AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY</i> (ACR)	141
ANEXO B - PARECER DO CEP	142

1 INTRODUÇÃO

A Esclerose Sistêmica (ES) é uma doença reumatológica que faz parte do grupo das collagenoses. É definida por três características principais: comprometimento vascular, produção de auto-anticorpos e inflamação, e a fibrose. Apesar de rara, é considerada de extrema importância na Reumatologia, em virtude de seu importante impacto na qualidade de vida do indivíduo acometido e seu prognóstico reservado, sendo considerada a mais grave das collagenoses.

A fibrose caracteriza-se por deposição excessiva de matriz extracelular (MEC). Este processo ocorre fisiologicamente no organismo como o resultado final de inflamação ou dano ao tecido, resultando em tecido cicatricial. Na ES há desregulação deste processo culminando em fibrose patológica de forma multissistêmica, podendo acometer qualquer órgão do corpo, e desta forma interfere diretamente no aumento da mortalidade destes pacientes. A gravidade da doença baseia-se exatamente no fato de não existir tratamento específico para a doença.

As estatinas têm sido administradas com sucesso no tratamento da hipercolesterolemia e da doença cardiovascular, devido a sua ação hipolipemiante e anti-aterosclerótica. Apesar de não estar bem elucidada a relação entre comprometimento macro e microvascular na ES, diversos ensaios clínicos têm demonstrado benefício das estatinas no tratamento da vasculopatia, evidenciando diminuição dos níveis de endotelina-1, ICAM-1 (Molécula de adesão intercelular) e CCL-2 e redução do risco de desenvolvimento de úlceras digitais (1). Estatinas também promoveram diminuição da expressão de TGF β 1 (fator de crescimento tecidual) e CTGF (fator de crescimento do tecido conectivo) por células mesangiais renais, fibroblastos renais e fibroblastos pulmonares (2-4), sugerindo um potencial efeito antifibrótico dos inibidores da HMG-CoA redutase. Entretanto, estudos adicionais são necessários para comprovar esse efeito e definir o mecanismo de ação envolvido. Neste contexto, sugere-se a possibilidade do uso de estatinas como agentes imunomoduladores e antifibróticos no tratamento da ES. Este trabalho visa investigar a atividade imunomoduladora de estatinas em sobrenadante de células mononucleadas do sangue periférico de pacientes com Esclerose Sistêmica, através da avaliação *in vitro* do efeito da sinvastatina e atorvastatina na secreção de moléculas envolvidas na patogênese da doença (IL-4, IL-6, IL-17 A e F, TNF, IFN γ , IL-2 e IL-10), uma vez que não há fármacos específicos eficazes para o tratamento desta doença.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo geral desta proposta é avaliar a atividade imunomoduladora de estatinas em células mononucleadas do sangue periférico de pacientes com Esclerose Sistêmica.

2.2 Específicos

- Avaliar o efeito *in vitro* da sinvastatina e atorvastatina na secreção das citocinas: IL-4, IL-13, IL-6, IFN γ , IL-2, IL-10, TNF, IL-17 A e F, em PBMCs de pacientes com ES
- Descrever o perfil clínico dos pacientes portadores de Esclerose Sistêmica e correlacioná-los com o resultado da resposta da secreção das citocinas após o tratamento com a sinvastatina e atorvastatina.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Definição

Esclerose sistêmica (ES) é uma doença do tecido conjuntivo complexa, multissistêmica, rara, de patogênese pouco conhecida, que abrange três vertentes: (A) auto-imunidade, com ativação de linfócitos, produção de auto-anticorpos, liberação de citocinas e quimiocinas e alteração do sistema imune inato, (B) vasculopatia, caracterizada por disfunção da microvasculatura periférica e vasoespasmos, e (C) fibrose, que representa a via final comum. A contribuição de cada um desses três mecanismos refletem a heterogeneidade clínica da doença (5, 6). Suscintamente, o dano microvascular parece ser o gatilho responsável por estimular as células do sistema imunológico a produzirem anticorpos, citocinas pró-inflamatórias e pró-fibróticas, além de quimiocinas. A fibrose é resultado da produção excessiva de colágeno por fibroblastos e miofibroblastos ativados, mediados por fatores de crescimento e citocinas, implicando em acúmulo do colágeno na pele e órgãos internos (7, 8).

3.2 Epidemiologia

A ES predomina no sexo feminino (4:1 a 6:1) (9). As razões para o predomínio no sexo feminino ainda não são bem explicadas. O pico de incidência ocorre dos 30 aos 50 anos de idade e sua incidência é de 3,7 a 22 casos/10⁶ pessoas/ano, variando em função da região geográfica e grupo étnico (10, 11). Ainda não há dados nacionais sobre a prevalência da ES no Brasil, mas há um estudo realizado em Mato Grosso cuja incidência é 11,9 casos/10⁶ pessoas/ano e a prevalência é de 105,6/milhão de habitantes (12). Afeta cerca de 250 pessoas por milhão de habitantes (13). Afeta aproximadamente 100.000 pessoas nos Estados Unidos da América (14).

A taxa de sobrevida varia de 55,1% (15) a 76,8%, em dez anos (16). Devido ao seu prognóstico reservado com taxas altas de morbimortalidade, torna-se uma doença de notável relevância, sendo considerada, a mais grave doença do tecido conjuntivo (17).

3.3 Etiologia

A etiologia permanece desconhecida. Alguns gatilhos para a fibrose são sugeridos, como lesão persistente, infecção e inflamação (18). Para tanto, dados têm mostrado uma maior incidência de positividade para anticorpos contra parvovírus B19, citomegalovírus humano, *Helicobacter pylori*, vírus da hepatite B e toxoplasmose em

pacientes com ES (7). Fatores ambientais, como sílica e cloreto de polivinila, são conhecidamente agentes passíveis de induzir fibrose. Doenças esclerodermia-like, como a síndrome do óleo tóxico após exposição ao óleo de *colza*, a fascíte devido ao uso de L-triptofano e a fibrose nefrogênica após o uso do gadolínio, têm sido relatados (7).

Estudos genéticos de associação sugerem relação da doença com o antígeno leucocitário humano (HLA) II no cromossomo 6. As mutações dos alelos particulares têm sido relacionados à suscetibilidade da doença e características clínicas, como os dos genes para o fator de crescimento de transformação beta (TGF- β), da proteína de monócitos-1 (MCP-1), da interleucina-1 *alfa* (IL-1 α), fator de necrose tumoral (TNF), do fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF), entre outros (19). Moléculas de superfície, por exemplo, CD45, CD19 (20, 21); fatores de transcrição, tais como STAT4 (*signal transducer and activator of transcription*) (22); bem como componentes de tecido conjuntivo como por exemplo, SPARC (*secreted protein, acidic, cysteine-rich*) e fibrilina (23, 24), também vêm sendo implicados.

Herança familiar também parece ter o seu papel etiológico, haja vista a ocorrência de ES em pacientes que tenham história familiar da doença (1,6%) em maior frequência que na população geral (0,026%). Parentes de primeiro grau de pacientes com ES têm maior incidência de doenças auto-imunes (25).

3.4 Aspectos clínicos e critérios de classificação

A primeira descrição de esclerodermia foi realizada por Curzio em 1753, onde um indivíduo de 17 anos de idade apresentou tensão extensa e dureza da pele por todo o corpo (26). No entanto apenas em meados do século XIX, a ES foi reconhecida como entidade clínica. Maurice Raynaud descreveu as mudanças tricolores do vasoespasma em 1865, e para tanto o fenômeno recebeu o seu nome: Fenômeno de Raynaud. Em 1883, Jonathan Hutchinson relatou um paciente com fenômeno de Raynaud e aspectos clínicos da esclerodermia (27). Apenas em 1942, Klemperer, Pollack e Baehr, propuseram que a esclerodermia deveria ser considerada como “doença sistêmica do tecido conectivo” (28).

Na maioria dos casos a manifestação inicial é representada pelo Fenômeno de Raynaud (FRy) (figura 1), podendo este preceder em anos as demais manifestações

clínicas. A manifestação mais característica, todavia, consiste no comprometimento cutâneo, caracterizado principalmente por um endurecimento progressivo da pele (29).

Figura 1 - Fênomeno de Raynaud



(retirado de <http://www.physiomaxwellness.ca/conditions-we-treat/raynauds-disease/>)

Alguns critérios de classificação para a doença foram propostos, e o mais antigo e mais utilizado na prática clínica é o do Colégio Americano de Reumatologia (30) (Anexo A). O intuito destes critérios de classificação remete à distinção da ES de outras formas de doenças auto-imunes, como o lúpus eritematoso sistêmico.

No entanto, estes critérios não são capazes de distinguir as formas da ES em limitada (ESl) e ES difusa (ESd). Estas formas são clinicamente estabelecidas de acordo com a presença e extensão do envolvimento da pele. A forma limitada é definida pelo envolvimento distal dos cotovelos e joelhos, enquanto na forma difusa há envolvimento das regiões proximais das extremidades e/ou envolvimento do tórax e abdome. A face pode ser acometida em ambas as formas. Alguns pacientes podem no entanto, ter uma apresentação inicial na forma limitada, e durante os primeiros 24 meses da apresentação da doença, apresentarem acometimento difuso; o estabelecimento da forma limitada da doença pode não ser confiável nos primeiros dois anos (29).

A importância desta classificação baseia-se na predição de prognóstico, onde usualmente a presença, bem como a extensão, do envolvimento da pele estão relacionados diretamente com o envolvimento dos órgãos internos, e portanto, com sobrevida. Esta divisão por conseguinte não é isenta de falhas, pois o portador da doença

difusa, por exemplo pode apresentar com o passar do tempo, afrouxamento da pele, bem como, por outro lado, pode apresentar forma limitada inicialmente, e depois evoluir para a forma difusa (29).

O perfil de auto-anticorpos pode ajudar na classificação do portador de ES. Quase todos os pacientes (85-90%) têm positividade para o Fator anti-nuclear (FAN) pela imunofluorescência indireta (15). Cerca de 80% serão positivos a pelo menos um dos 3 auto-anticorpos disponíveis comercialmente: anti-centrômero, anti-topoisomerase-I (anti-Scl-70) e anti-RNA polimerase III (31). Os subgrupos destes auto-anticorpos estão associados com padrões clínicos da doença, de forma geral. O anticorpo anti-centrômero tem sido implicado na ES limitada, com maior sobrevida quando comparado aos outros anticorpos, e menor risco de evoluir com doença pulmonar intersticial. Estes pacientes, todavia, têm maior risco de evoluir com hipertensão arterial pulmonar, e para tanto, não deve ser considerado como uma variante “benigna” da doença (32). Anticorpo anti-Scl-70 tem maior frequência de positividade na forma difusa da doença, mas também pode estar presente na forma limitada, e é relativamente de bom prognóstico para doença intersticial pulmonar severa (33).

3.4.1 Sintomas iniciais

O sintoma mais precoce da doença costuma ser o FRy, que será melhor detalhado no item 3.4.3. As chamadas “*puffy hands*”, também costumam ser um sintoma precoce da doença, e usualmente tem relação com o desenvolvimento da forma difusa da doença (34). Outros sintomas precoces são mal-estar, artralgia e mialgia. Menos frequentemente, os pacientes podem ter sintomas viscerais antes do aparecimento do espessamento da pele, como sintomas relacionados ao trato gastrointestinal e sistema respiratório (34).

3.4.2 Aspectos cutâneos

São conhecidos três estágios de mudanças de pele que ocorrem em pacientes com ES. O estágio inicial é o inflamatório, edematoso, no qual as mãos se apresentam edemaciadas e com perda das dobras dos dedos. Há uma redução na produção de suor, resultando em pele seca. Esta fase edematosa pode durar meses e é durante esta fase que o endurecimento e espessamento da pele se desenvolve (35).

A fase inflamatória inicial pode ser acompanhada por prurido, que pode ser secundário a produção de mediadores pró-inflamatórios bem como de histaminas e bradicininas (36). Uma vez esta fase inflamatória cessada, uma longa fase fibrosante pode se iniciar. Usualmente inicia-se pelas extremidades, distal às articulações metacarpofalangeanas e podem progredir proximalmente.

Na região perioral há uma modificação na pele bem característica da doença, que leva a redução da abertura oral, bem como a retração da pele, deixando os dentes em maior evidência. Retração da gengiva também ocorre devido tanto a fibrose, como atrofia da mandíbula (37).

Alterações na pigmentação da pele, chamadas leucomelanodermia, ocorrem tanto na fase inflamatória/edematosa como na fibrose progressiva. Dependendo da tonalidade da pele da paciente, pode aparecer hipopigmentação ou hiperpigmentação. Alguns pacientes apresentam despigmentação, particularmente no escalpo, tórax, e dorso superior, além de regiões submetidas a pressão, como dorso das mãos e região pré-tibial. Resulta, então, num aspecto conhecido como em “sal e pimenta” (35) (figura 2).

Figura 2 - Leucomelanodermia



retirado de : <http://www.artroimagen.com/cards/view/1376>

O *modified Rodnan Skin Score* (mRSS) é um método para graduar o espessamento de pele, e é validado para uso em ensaios clínicos, com baixa variabilidade interobservador (38). Há 17 áreas a serem avaliadas, e em cada área é dado um valor de 0 a 3, onde o “0” representa pele normal e “3” representa a pele tensa, bem aderida.

Outras modificações da pele incluem telangiectasia e calcinose. Telangiectasias são capilares dilatados, mais comumente encontrado na face, membrana mucosa, tórax e mãos. Calcinose subcutânea ocorrem em ambas as formas limitada e difusa, no entanto é mais comum na doença limitada. O depósito subcutâneo é composto por hidroxapatita de cálcio, e tende a aparecer em superfícies extensoras, e locais que sofrem maior pressão (34).

3.4.3 Sintomas vasculares

Fenômeno de Raynaud, por definição, é o vasoespasma nos dígitos que pode ser induzido pelo frio ou estresse. Pode acometer outros locais como nariz, orelha e raramente na língua. Está presente em mais de 90% dos pacientes com ES, e aqueles pacientes que não o apresentam têm um pior prognóstico (39).

É característico por apresentar fases que perfazem três cores: palidez (branco), seguida de cianose (roxo/azul), e posteriormente o hiperemia reativa (vermelho), ilustrado na figura 1. No entanto, nem sempre as três fases aparecem (40).

Em pacientes com ES limitada, o FRy tende a preceder em anos o aparecimento da esclerodermia ou da doença visceral. Já pacientes com a forma difusa apresentam o fenômeno simultaneamente ou logo após o aparecimento das mudanças da pele (34).

Esse fenômeno de vaso-espasmo implica complicações: cicatrizes digitais (*pitting scars*), mudanças isquêmicas fixas com perda de tecido (até amputação), úlceras digitais de difícil cicatrização, gangrena. Embora ainda controverso, há relato de vaso-espasmo induzido pelo frio em órgãos viscerais, como artérias coronárias, circulação renal, e até pulmões (34).

3.4.4 Envolvimento músculo-esquelético

Artralgia e mialgia são sintomas bastante comuns na ES, e algumas vezes podem desenvolver artropatias inflamatórias e/ou miopatias. As próprias mudanças fibróticas na pele também podem resultar em contraturas em flexão causando bastante incapacidade. Fraqueza muscular e fadiga também são sintomas proeminentes (41).

3.4.5 Envolvimento pulmonar

Doença pulmonar pode ser dividida em 2 grandes grupos: doença pulmonar intersticial e/ou hipertensão arterial pulmonar. A doença pulmonar intersticial tende a ser mais comum na ESd, mas pode ocorrer em ambas (42). Em estudo de autópsias, aproximadamente 80% dos pacientes com ES evidenciarão fibrose pulmonar, embora a evidência clínica só apareça em 40% dos pacientes (43, 44).

A presença do anticorpo anti-topoisomerase I (anti-Scl-70) está associada com o aumento no risco de envolvimento difuso da pele e fibrose pulmonar (45). No entanto, a presença do anticorpo anti-centrômero ou do anti-RNA polimerase III está associado com a redução do risco de desenvolver doença pulmonar intersticial (45).

Doença vascular pulmonar pode ocorrer tanto em forma primária, como secundária à doença cardíaca de base ou a doença intersticial pulmonar. Hipertensão pulmonar isolada tende a ocorrer em maior frequência nos pacientes com a forma limitada da doença. Tem um forte impacto na taxa de mortalidade destes pacientes (46).

3.4.6 *Envolvimento cardíaco*

Costuma aparecer de forma variável, e seu achado em avaliações *post-mortem* é muito comum, mesmo em pacientes sem evidência clínica (43).

Pode se manifestar como doença do pericárdio, disfunção sistólica do ventrículo direito ou esquerdo, insuficiência cardíaca, fibrose do miocárdio causando alterações de condução, arritmias, disfunção diastólica, doença arterial aterosclerótica coronária (47).

3.4.7 *Envolvimento gastrointestinal*

Envolvimento muito comum nos portadores da ES, e geralmente é o primeiro sintoma, que não o fenômeno de Raynaud. O envolvimento deste sistema pode abranger todo o trato gastrointestinal, e mesmo na ausência de sintomas, há alterações de mobilidade ou de teste funcional (48).

Tanto a fibrose, como a atrofia da musculatura lisa têm um papel na dismotilidade gastrointestinal. Não há predileção de acometimento para pacientes com envolvimento de pele difuso ou limitado, mas interfere na qualidade de vida do paciente (48).

3.4.8 Envolvimento renal

A crise renal esclerodérmica é uma manifestação vascular importante da ES. Estima-se que 10% dos pacientes com ES irão desenvolver esta crise renal. Esta enfermidade só ocorre em pacientes com a forma difusa e geralmente nos primeiros 3 anos de doença (49, 50). Classicamente o paciente apresenta-se com hipertensão arterial de início recente e insuficiência renal.

Mais de um terço dos pacientes com a crise renal esclerodérmica necessitam de terapia hemodialítica, no entanto muitos pacientes conseguem, após um certo período que varia em torno de dois anos, não requerer mais o uso da hemodiálise (51).

Por ser caracterizada por um processo microangiopático, inclui alguns aspectos característicos como anemia com presença de esquizócitos, trombocitopenia, insuficiência renal, proteinúria e alterações no sumário de urina com presença de cilindros celulares (52).

O tratamento baseia-se essencialmente no uso de inibidores da enzima conversora de angiotensina, além do suporte terapêutico das manifestações clínicas (51).

3.5 Fisiopatologia da ES

As doenças fibróticas podem ser atribuídas a uma variedade de causas, mas de uma forma geral, o processo de fibrose tem como início uma injúria tissular que ativa processos de reparação que visam restaurar a arquitetura do tecido original. A falta de ajuste fino deste processo de reparo leva à ativação persistente dos fibroblastos, e consequente destruição dos tecidos (53). Uma característica da pele lesionada é o infiltrado perivascular de linfócitos T e macrófagos, e se correlaciona com o grau e progressão do espessamento da pele (54). Uma importante questão que vem sendo sustentada sobre a fibrose é o fato de que a ativação persistente, patológica, de vias de sinalização necessárias para o desenvolvimento embrionário normal pode conduzir a cicatrização anormal de feridas e reparação de tecidos (53). Outra questão diz respeito ao fato de que não somente há um acúmulo excessivo de proteínas da matriz extracelular, como também, há alteração na composição e modificação pós-traducional destas proteínas (55).

Fibroblastos ativados são a principal fonte de produção de proteínas da matriz extracelular (7). No processo de inflamação ocorre um infiltrado perivascular, principalmente de leucócitos (células T ativadas, monócitos, mas também, fibroblastos), que estão presentes na fase precoce da doença, liberando mediadores pró-fibróticos que estimulam a produção excessiva de proteínas da matriz extracelular, culminando no

processo já supracitado (56, 57). No entanto, em fases mais avançadas da doença, as biópsias revelam um tecido conjuntivo bastante hipocelular (55). Embora, tanto a população de células T CD4⁺ como as de T CD8⁺ sejam encontradas na pele de pacientes com ES, a subpopulação majoritária é de células T CD4⁺ (58).

Num tecido saudável sem lesão, os fibroblastos encontram-se circundados por matriz extracelular (MEC) (59). Quando há dano neste tecido, os fibroblastos não possuem mais esta capa protetora, e começam a tentar compensá-la, produzindo excessivos anexos da matriz. Os miofibroblastos são caracterizados por expressar proteínas altamente contráteis, como a *alpha*-actina de músculo liso (α -SMA) que está organizada em fibras ligadas a MEC, produzindo e remodelando nova MEC (59, 60).

A fibrose caracteriza-se como um tipo de tecido cicatricial, secundário a deposição excessiva de MEC, sendo pois, o resultado final de inflamação ou dano, e acarretando por sua vez dano orgânico (61, 62).

Embora os miofibroblastos desapareçam quando o tecido conjuntivo é recém-formado durante a reparação normal, podem persistir no tecido conjuntivo fibrótico, e são considerados como sendo a célula efetora final em todas as condições fibróticas, incluindo na ES (63).

Algumas pesquisas que objetivaram identificar as diferenças na expressão de mRNA em amostras de pele de ES clinicamente afetadas e não afetadas evidenciaram diferenças, bem como as análises histológica e fenotípica que mostraram abundância de miofibroblastos nas áreas afetadas clinicamente. Os fibroblastos encontrados nestas áreas clinicamente afetadas apresentam adesão elevada e maior contratilidade da MEC. Em contrapartida, fibroblastos de pele de pessoas saudáveis são iguais aos de pele de ES não afetadas clinicamente (63-65). Como justificar a diferença entre áreas de pele de uma mesma pessoa portadora de ES, ainda é um pouco controverso, mas postula-se que os miofibroblastos surgiriam pela diferenciação dos próprios fibroblastos residentes no local em virtude de determinadas citocinas, ou até mesmo pelo recrutamento de células advindas de outras regiões ricas em α -SMA (principalmente advindas da vasculatura) (66, 67). O fato do TGF- β , uma das principais moléculas envolvidas na fibrose, ter capacidade de ativar Smad1 através ALK1/endogлина (uma via que normalmente é considerada como própria do sistema vascular), corrobora para a postulação de que os

miofibroblastos, na fibrose, podem ter origem de pericitos microvasculares (65, 66, 68).

Fibroblastos de pacientes com esclerodermia, obtidos de pele ou pulmão, expressam um fenótipo miofibroblasto-*like* ativado. Sob condições isquêmicas, células endoteliais podem perder a adesão célula-célula e se transformarem em células mesenquimais ou miofibroblastos produtores de colágeno. As células epiteliais esclerodérmicas estimulam fibroblastos normais a expressarem CTGF, IL-1a (interleucina), ET-1 (endotelina) e TGF- β (13). A injúria epitelial tem um papel importante na doença pulmonar intersticial da ES (69).

Do ponto de vista clínico, a hipóxia vem apresentando relevância importante na fisiopatologia da ES. As vias de sinalização celular, todavia, pela qual a hipóxia induziria a doença, foram caracterizadas recentemente (70, 71). Um dos efeitos mais proeminentes da hipóxia ocorre sobre a vasculogênese. E, durante este processo, as células-tronco originárias da medula óssea parecem ser encaminhadas para o tecido conectivo de órgãos afetados e contribuem para a fisiopatologia fibrótica (72).

Nos fibroblastos, a hipóxia induz síntese de um número de proteínas da MEC envolvidas na remodelação, por exemplo, trombospondina-1, fibronectina-1, TGF β , CTGF (73, 74). A hipóxia parece também aumentar a resposta do fator de crescimento para o PDGF (*platelet-derived growth factor*), aumentando a fosforilação do respectivo receptor. A indução de transição epitélio-mesenquimal, um conceito recém conhecido para a patogênese da fibrose no pulmão e rim, também foi diretamente ligada à hipóxia (75). Sugere-se, desta forma, que a hipóxia tem um papel central na alteração da composição do MEC, e de manutenção do círculo vicioso do processo fibrótico (55).

A fibrose, portanto, é induzida por múltiplos mediadores, e algumas moléculas exemplificam o fato, como TGF- β 1, PDGF, VEGF (*vascular endothelial growth factor*), ET-1, IL-13, IL-21, IL-6, CTGF, MCP-1, proteína inflamatória de macrófago, receptores de proliferação ativada de peroxissomas, proteínas séricas de fase aguda, caspases e sistema renina-angiotensina-aldosterona. O desbalanço entre níveis de metaloproteinases e inibidor tecidual de metaloproteinases implica em síntese excessiva de matriz extracelular, redução do catabolismo extracelular, resultando no acúmulo de colágeno (7).

Citocinas da via Th1 e Th2 têm sido implicadas na patogênese da ES (tabela 1). Células Th1 parecem inibir a deposição de colágeno e aumentar a produção de

metaloproteinases, através da liberação de IFN γ (interferon gama) ou pelo contato direto com fibroblastos e, dessa forma, teriam efeito antifibrótico. Tem sido demonstrado, por exemplo, que o IFN γ inibe a síntese de pró-colágeno por fibroblastos (76). Por outro lado, as células Th2 estimulam a produção de colágeno e inibem metaloproteinases da matriz a partir da liberação de IL-4 e IL-13, apresentando propriedades profibróticas e pro-angiogênicas (77). Interessantemente, os níveis de citocinas Th2 tendem a diminuir à medida que a esclerose cutânea regride e um estudo sugere que um desvio da resposta Th2 para Th1 se correlaciona com a melhora da fibrose cutânea na ES (77, 78). Citocinas Th2 incluindo IL-4, IL-5 e IL-13 contribuem, juntamente com o TGF- β , para indução de fibrose. A IL-13 possui um importante papel na produção de TGF- β 1 em macrófagos e estimula a ativação de TGF- β 1, através de metaloproteinases de matriz e as vias proteolíticas à base de cathepsina (77).

Tabela 1 - Moléculas de sinalização implicadas na patogênese da fibrose na Esclerose Sistêmica

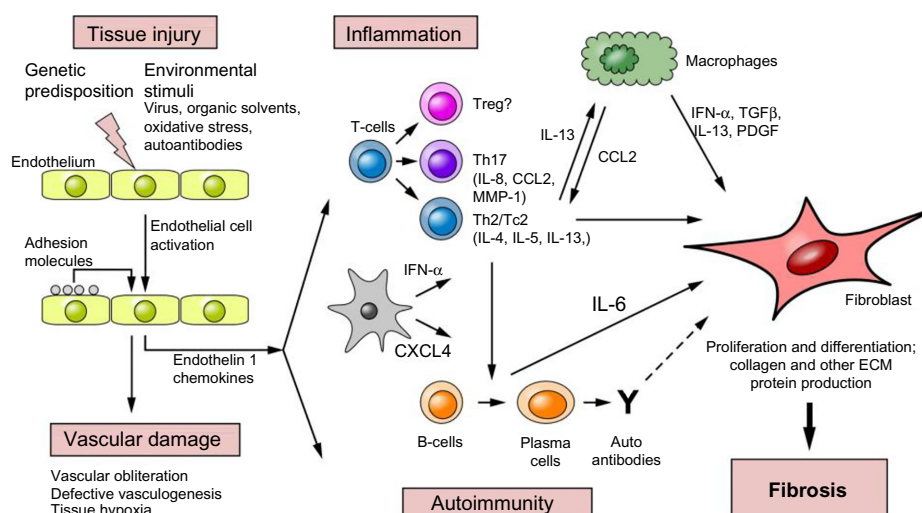
Molécula	Origem	Função em fibroblastos normais	Evidências de participação na Esclerose Sistêmica
IL-4 (79-82)	Macrófagos, Linfócitos Th2, mastócitos	↑ transdiferenciação miofibroblastos ↑ proliferação de fibroblastos ↑ síntese de colágeno ↑ produção de TGF- β , CTGF e TIMP ↑ quimiotaxia de fibroblastos	↑ expressão de IL-4 e seu RNAm em fibroblastos cultivados e provenientes de biópsia de pele. ↑ níveis séricos e do número de linfócitos produtores de IL-4;
IL-6 (83)	Fibroblastos, Monócitos, linfócitos B e T, células endoteliais	↑ proliferação de fibroblastos ↑ síntese de colágeno e TIMP-1	↑ expressão de IL-6 em fibroblastos cutâneos de ES; Correlação com o comprometimento cutâneo ↑ níveis no soro e LBA
IL-13 (80, 84-86)	Linfócitos Th2, mastócitos	↑ produção de TFG β por macrófagos ↑ proliferação de fibroblastos ↑ síntese de colágeno	↑ níveis séricos em pacientes com ES; Produção desregulada de IL-13 por linfócitos CD8(+) efetores de pacientes com ES Correlação com formas mais graves da doença cutânea; Inibição de IL-13 atenua a fibrose pulmonar induzida por bleomicina.
IL-17 (87, 88)	Linfócitos Th17	↑ proliferação de fibroblastos ↑ secreção de citocinas pro-inflamatórias, como IL-6 e IL-8 ↑ expressão de ICAM-1	↑ níveis séricos em pacientes com ES e possível associação com doença precoce; ↑ células Th17 no sangue periférico de indivíduos com ES.

IL-23 ⁽⁸⁹⁾	Linfócitos	Indução da via Th17, na presença de IL-6 e TGF- β	↑ níveis séricos Associação com doença precoce e comprometimento pulmonar.
IL-10 ⁽⁹⁰⁾	Monócitos ativados, linfócitos	↓ expressão do gene do colágeno tipo I em fibroblastos dérmicos ↑ expressão de MMP-1 e MMP-3 ↑ produção de IL-4 e IL-13	↑ níveis no LBA de pacientes com ES e doença pulmonar; ↑ níveis séricos em pacientes com doença difusa e correlação com escore cutâneo
IFN-γ ^(83, 90-92)	Linfócitos Th1	↓ proliferação de fibroblastos ↓ transdiferenciação de miofibroblastos ↓ síntese de colágeno ↓ expressão do gene do colágeno	Fibroblastos resistentes aos efeitos inibitórios do IFN γ Níveis séricos elevados ou diminuídos em pacientes com ES (resultados conflitantes) Associação com a forma cutânea limitada e com a presença de autoanticorpos
TNF ^(83, 90, 93-95)	Monócitos, macrófagos Células endoteliais Linfócitos Th1	↑ quimiotaxia de fibroblastos ↓ produção de colágeno ↑ síntese de collagenase	↑ níveis elevados no soro e no LBA Associação com progressão da doença pulmonar

TGF- β = *transforming growth factor* β ; TIMP = inibidor tissular de metaloproteinases; IFN- γ = interferon γ ; ET-1 = endotelina 1; CTGF = *connective tissue growth factor*; PDGF = *platelet-derived growth factor*; MCP-1 = *monocyte chemotactic protein-1*; IL-6 = interleucina 6; MEC = matriz extracelular; MMP = metaloproteinases de matriz; LBA = lavado broncoalveolar; TNF- α = fator de necrose tumoral- α .

Estudos recentes indicam um papel das citocinas da via Th17 na patogênese da fibrose na ES (figura 3). As células Th17 produzem as citocinas IL-17, IL-21 e IL-22. De uma maneira geral, a IL-17 é considerada uma citocina pró-inflamatória capaz de induzir produção de outras citocinas como IL-6, IL-1, IL-8 e TNF. Além disso, inibe angiogênese de células endoteliais e promove a proliferação de fibroblastos, entretanto não foi observada ação conhecida sobre o colágeno. Têm sido descritos níveis séricos elevados de IL-17 em pacientes com ES, sugerindo sua participação na fisiopatologia da doença (87, 96). A seguir descreverei as principais citocinas relacionadas a inflamação e fibrose na ES, e que serão objetos de estudo nesta tese.

Figura 3 - Etiopatogênese da ES



Nota: Fatores ambientais e genéticos contribuem para a etiologia da ES. A patogênese da ES envolve uma interação entre processos vasculares, imunológicos e de fibrose. Lesão vascular e dano endotelial são os primeiros eventos na patogênese da ES. As células endoteliais ativadas aumentam a expressão das moléculas de adesão e secretam quimiocinas, levando a inflamação e auto-imunidade. Macrófagos e células T são predominantes nos tipos de células inflamatórias dos infiltrados inflamatórios e produzem citocinas e fatores de crescimento que conduzem a síntese de proteínas da matriz extracelular por fibroblastos, resultando em fibrose progressiva. As células T também foram implicadas na produção de auto-anticorpos (*retirado: Immunotargets Ther. 2016; 5: 21–35*).

ECM: matriz extracelular; **IFN:** interferon; **IL:** interleucina; **MMP-1:** metaloproteinases-1 de matriz; **PDGF:** factor de crescimento derivado de plaquetas; **SSc:** esclerose sistêmica; **TGF β :** factor de crescimento transformante beta; **Treg:** T-célula reguladora; **?:** papel desconhecido

3.5.1 TNF

O TNF é uma citocina pró-inflamatória e o seu papel na ES permanece incerto. Já foram relatados o aumento deste na pele (97) e no soro (91), bem como aumento da produção por células mononucleares circulantes (98). Além disso, as células T coestimuladas com TNF produzem mais citocinas profibróticas e aumentam a produção de colágeno pelos fibroblastos (99). No entanto, por outro lado, TNF aumenta produção de metaloproteinases pelos fibroblastos dérmicos, o que poderia reduzir produção de colágeno (100, 101).

Brembilla *et al.* observou que em ratos, há um sinergismo entre TNF e IL-22, onde a IL-22 apenas foi capaz de induzir resposta dos fibroblastos pelo estímulo de queratinócitos, quando estes últimos foram ativados por TNF. A associação entre IL-22 e TNF foi capaz de induzir espessamento dermal, *in vivo*, em ratos (102). Seguindo este

pensamento, o TNF contribuiria indiretamente para o processo de fibrose, além da inflamação.

3.5.2 *IL-10*

A interleucina-10 é uma citocina anti-inflamatória secretada por monócitos e linfócitos. *In vitro*, ela é capaz de inibir produção e secreção de colágeno tanto em fibroblasto normal como de ES (103), e portanto parece ter propriedades antifibróticas (104, 105).

Células Tregs produzem IL-10 tanto no sangue (106) como na derme (107) de pacientes com ES. Recentemente tem sido sugerido que pacientes portadores de ES apresentam aumento quantitativo de células Tregs defeituosas (108), e talvez por isso, haja prejuízo na função da IL-10.

3.5.3 *INF γ e IL-2 (Th1)*

A IL-2 tem um papel importante na homeostase do sistema imune e da auto-tolerância, e compõe a resposta via Th1 (109). Interessante que ao mesmo tempo que promove proliferação de células T, induz finalização das respostas de células T (110). A IL-2 é especialmente importante na sobrevivência e manutenção da função das células Tregs (111). Além dessas atribuições, a IL-2 é capaz de facilitar a produção de imunoglobulinas pelas células B e induzir a diferenciação e proliferação de células *natural killers* (110, 112).

Interferon do tipo I (IFN) é um potente sinal imunomodulador que está fortemente implicada na patogênese do Lúpus Eritematoso Sistêmico, e se correlaciona proporcionalmente com a atividade e gravidade da doença nestes pacientes (113). Pensa-se que a interação dos anticorpos anti-nucleares com células dendríticas plasmocitóides na circulação resulta na indução de IFN. O aumento da expressão de genes do IFN em leucócitos do sangue periférico e monócitos também tem sido relatada na ES (61).

Além disso, a expressão de IFN é elevada na pele lesionada (114). Uma "assinatura IFN" forte na ES parece estar associada com a presença de anticorpos anti-tipo I, e pode refletir a estimulação de células dendríticas plasmocitoides por imunocomplexos que contêm ácidos nucleicos através de receptores do tipo toll como TLR3. O papel potencial de IFN na patogênese da ES é suportada pela associação de

mutações genéticas dos alelos que codificam genes envolvidos na sinalização da doença, tais como IFN IRF5 (115)

Notavelmente interferons agem como potentes inibidores da síntese de colágeno e outras respostas fibróticas (116, 117). Ainda não está claro neste momento se a sinalização IFN elevado na ES contribui diretamente na tentativa de limitar o dano e atenuar fibrose, ou se age com o objetivo de promoção de lesão microvascular e apoptose. Ensaios clínicos utilizando agentes que bloqueiam a sinalização IFN podem elucidar o real papel desta citocina.

3.5.4 *Citocinas da via Th17*

Células Th17 parecem coordenar a defesa do organismo contra bactérias extracelulares e fungos, em alguns sítios específicos como barreira gastro-intestinal, respiratório e pele (118). Várias vertentes têm sugerindo um papel crucial destas células na patologia da inflamação e auto-imunidade. A IL-17 pode ser produzida por três subconjuntos de células conhecidas, no entanto as células Th17 são as principais produtoras (119). Além da IL-17, as células Th17 também secretam IL-21 e IL-22 (120-122). TGF- β e IL-6 ou IL-21, o fator de crescimento e estabilização de IL-23, e os fatores de transcrição RORc, ROR α , e STAT-3 parecem estar envolvidos no desenvolvimento de células Th17. Este subconjunto de células T-helper podem contribuir não só para a inflamação, mas também a produção de fibrose via de IL-17A e outras citocinas (123).

Em 2006, foi observado em estudo com ratos, por Ivanov *et al.*, que o ROR γ t (também conhecido como RORc) é o fator transcripcional chave para o desenvolvimento de células Th17 (124). As células T helper chamadas células Th17 são controladas pelo fator de transcrição *retinoic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma* (ROR γ t) (125).

A frequência de circulação de células Th17 foi notavelmente aumentada em pacientes com ES (92). Os níveis elevados de IL-17A no soro e a aumentada expressão de IL-17A em linfócitos do sangue periférico e pele lesionada foram relatados em pacientes com ES (87, 92, 96).

A família IL-17 inclui: IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (também

conhecida como IL-25) e IL-17F. A IL-17F partilha 44% de aminoácidos com IL-17A, enquanto que os outros membros partilham uma identidade mais limitada de 15-27%. IL-17A e IL-17F podem ser segregados como homo- ou hetero-dímeros ligados a dissulfureto, e ligar-se ao mesmo receptor heterodimérico IL-17RA e IL-17RC (126, 127). Em geral, a IL-17F partilha funções com IL-17A, no entanto IL-17F não inibiu a produção de colágeno induzida em fibroblastos por TGF- β (128), embora ambas IL-17A e IL-17F auxiliem na modulação da função dos fibrócitos (129).

A IL-17A tem sido implicada no desenvolvimento de fibrose de pele e pulmonar induzida por bleomicina em ratos (123, 130). Essa citocina é capaz de aumentar a proliferação de fibroblastos em seres humanos (87), bem como a produção de citocinas pró-inflamatórias (MCP-1, IL-6 e IL-8) e as metaloproteinases de matriz (MMP-1 e MMP-3) (131, 132). Estes estudos que evidenciaram níveis aumentados de IL-17, sugeriram um papel pró-fibrótico na fisiopatologia da ES.

No entanto, Nakashima *et al.* mostrou evidência de um *upregulation* da miR-129-5p que bloqueia a IL-17A, reduzindo então a atividade anti-fibrótica da em fibroblastos humanos, associado ao *downregulation* de CTGF e colágeno-*alpha*-I (128).

Consoante a tal estudo, Truchetet *et al.*, em 2013, observou que a IL-17 diminui a expressão do α -SMA induzida pelo TGF- β em fibroblastos humanos, e que a expressão de IL-17A presente nas células da pele de ES se correlaciona inversamente com fibrose da pele (133). Somando-se aos outros, Brembilla *et al.* também faz alusão ao potencial efeito anti-fibrótico que a IL-17 parece exercer, sugerindo, inclusive, que os fibroblastos de pacientes com ES parecem ser resistentes ao seu efeito (120).

Desta forma, concluímos que o papel das células Th17 na fisiopatogênese da ES permanece incerto.

3.5.5 IL-4 e IL-13 (Th2)

Os linfócitos Th2 caracterizam-se pela produção de IL-4, IL-13, IL-5. De uma maneira geral, essas citocinas têm demonstrado propriedades profibróticas e pro-angiogênicas (77). IL-4 estimula a proliferação, quimiotaxia, síntese de colágeno e produção de TGF- β , CTGF e TIMP em fibroblastos normais (79). Em pacientes com ES foram identificados níveis séricos elevados de IL-4, assim como aumento no número de

linfócitos T produtores de IL-4 (80, 81). Além disso, também foi detectada expressão aumentada de IL-4 e seu RNAm em fibroblastos cutâneos (134).

A IL-13 é uma citocina imunorregulatória secretada predominantemente por células Th2 ativadas, mas também por mastócitos e *natural killers* (135, 136). É um modulador potente de monócitos e da função de células B, e entre as suas muitas funções, é conhecida por estar envolvida na remodelação de tecido e fibrose (137). A IL-13 possui a capacidade de suprimir a produção de citocina pró-inflamatória em monócitos / macrófagos, tais como TNF, IL-1, IL-8, e MIP-1-*alpha* (135, 138).

Além de promover a proliferação de células B, induz a expressão de integrinas à superfície celular, MHC de classe II e CD23, e favorece a troca de classe de anticorpo para a produção de IgE e IgG4 (139-142). Portanto, a IL-13 também tem demonstrado um papel de mediador importante para o desenvolvimento de doença alérgica (143).

Estudos anteriores têm demonstrado que a produção anormal de IL-13 por células T CD8 + efectoras no sangue periférico de ES se correlaciona com a extensão da fibrose de pele (144). IL-13 é uma citocina pró-fibrótica que é suficiente para induzir fibrose em pele e pulmão (145, 146).

Fuschiotti e colegas avaliaram o papel de célula T CD8 + e da IL-13 na produção de fibrose dérmica, e chegaram a conclusão que há nas lesões de pele de pacientes com ES, grandes quantidades de células T CD8 + e IL-13 (137).

Alguns estudos confirmam o potencial da IL-13 em estimular síntese de colágeno em ES, e também de estimular fibrose hepática e pulmonar (80, 146-149). Mas os fatores que regulam a expressão da IL-13 na doença fibrótica permanecem pouco compreendidos (150).

Alguns estudos evidenciam um papel da IL-13 como uma citocina anti-inflamatória, e que poderia ter efeito até mesmo na analgesia (151-153).

3.5.6 IL-6

A IL-6 é uma glicoproteína de 22 a 27 kDa. É uma citocina multifuncional pleiotrópica produzida por células, como os linfócitos, fibroblastos e monócitos (154). Dentre suas funções podemos citar a capacidade de ativar linfócitos T, estimular

reagentes de fase aguda (como proteína C reativa), e estimular células precursoras hematopoiéticas possibilitando maturação de células B em células produtoras de anticorpos (155).

Possui um importante papel na doença fibrótica. Em conjunto com TGF β , CTGF e PDGF formam um poderoso conjunto indutor de produção de colágeno e proliferação de fibroblasto (156).

A IL-6 parece está implicada, também, em angiogênese e neovascularização. Tal fato pode estar relacionado a proliferações vasculares aberrantes e manifestações isquêmicas na ES (157).

Estudos evidenciam níveis elevados de IL-6 em pacientes com ES (158), e há correlação destes com a extensão do acometimento cutâneo, mensurado através do escore de Rodnan modificado (97, 159). Foram observados também, níveis de IL-6 aumentados em tecidos, naqueles pacientes com doença severa da pele (97).

3.6 Tratamento e as Estatinas

O tratamento da ES é determinado pela extensão e gravidade das manifestações clínicas. Até o momento, a maioria das terapias disponíveis baseia-se no alívio sintomático, havendo poucas opções consideradas eficazes. Embora a inflamação seja uma das características da doença precoce, sua inter-relação com a fibrose ainda não está definida e terapias anti-inflamatórias tem se mostrado ineficazes (160). O desenvolvimento de efetivas terapias antifibróticas é alvo de alguns estudos (7, 56, 161-163), porém, até o momento, não há nenhum fármaco aprovado para esse fim no tratamento da ES.

Tendo em vista a reconhecida importância do TGF- β no processo de fibrose, as estratégias terapêuticas tem buscado o bloqueio de sua produção, atividade ou sinalização intracelular. Entretanto, o TGF- β apresenta também potente atividade anti-inflamatória e imunossupressora, importante na fisiologia normal e representando um mecanismo de proteção contra autoimunidade. Sendo assim, uma estratégia antifibrótica ideal tendo como alvo o TGF- β deveria inibir sua resposta fibrótica, sem alterar seu efeito imunossupressor fisiológico (160).

As estatinas são substâncias que, farmacologicamente, bloqueiam a conversão da hidroxil-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) em mevalonato ao se ligarem, por um

mecanismo competitivo, à HMG-CoA redutase promovendo um deslocamento do seu substrato natural (HMG-CoA) (164). Existem duas gerações de estatinas, a primeira natural, derivada de metabolismo fúngico, representada pelas lovastatina, sinvastatina, e pravastatina, e a segunda, sintética, denominadas fluvastatina, atorvastatina e rosuvastatina. Cada estatina tem propriedades farmacocinéticas próprias, o que determina diferenças na sua força hipolipêmica e ação pleiotrópica. As hidrofílicas, representadas pelas pravastatina e fluvastatina, têm penetração limitada através da membrana celular, enquanto as lipofílicas (sinvastatina, lovastatina e atorvastatina) apresentam melhor penetração na célula hepática e membrana endotelial (165). As estatinas que mais frequentemente têm sido utilizadas em estudos clínicos são a sinvastatina e a atorvastatina (166).

Há mais de trinta anos, as estatinas têm sido administradas com sucesso no tratamento da hipercolesterolemia e da doença cardiovascular, devido a sua ação hipolipemiante e anti-aterosclerótica. Durante as últimas décadas, a taxa de mortalidade por doença cardiovascular em pacientes com ES vem aumentando progressivamente (167). Estudos de coorte evidenciaram risco aumentado de infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e doença vascular periférica em comparação com a população geral (168, 169). Apesar de não estar bem elucidada a relação entre comprometimento macro e microvascular na ES, diversos ensaios clínicos têm demonstrado benefício das estatinas no tratamento da vasculopatia, evidenciando diminuição dos níveis de endotelina-1, ICAM-1 e CCL-2 e redução do risco de desenvolvimento de úlceras digitais (1). Uma vez que as estatinas são uma opção terapêutica bem estabelecida para a doença cardiovascular, apresentando perfil conhecido de segurança farmacológica, poderiam representar um tratamento facilmente transponível para a fibrose da pele. A melhor via de uso para um bom resultado em pele (tópica ou oral), a classe estatina, bem como a dosagem, precisariam ser determinados em estudos clínicos (8).

Evidências clínicas e experimentais têm demonstrado que as estatinas apresentam efeitos pleiotrópicos, os quais incluem ação anti-inflamatória e imunomoduladora (165, 170). Entre os efeitos anti-inflamatórios, estudos demonstraram que estatinas podem alterar a função de células T e células apresentadoras de antígenos, levando à redução na produção de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-1 β e IL-6; quimiocinas como IL-8, RANTES e MCP-1; e enzimas pró-inflamatórias como COX-2 (171-174). Estatinas também promovem inibição da ativação e apoptose de linfócitos T. Além disso, foi demonstrada diminuição da expressão induzida por IFN- γ de moléculas MHC classe II em macrófagos e células endoteliais, além de inibir o

leukocyte function antigen-1 (LFA-1), molécula que participa da adesão leucocitária e da co-estimulação para ativação de linfócitos T (175). Zhang *et al* demonstrou um efeito supressor direto sobre a secreção de IL-17 por células Th17 em pacientes com esclerose múltipla (164).

A inibição da HMG-CoA redutase promove não apenas uma potente inibição da biossíntese de colesterol como também inibe a síntese de moléculas lipídicas necessárias para a reação de isoprenilação (166, 176). A isoprenilação proteica pós-translacional é de importância fundamental na regulação da expressão de vários genes envolvidos na sobrevivência, proliferação e diferenciação celular. Esses processos são regulados pelas superfamílias de proteínas Rho e RAS, as quais correspondem a GTPases ligadas à membrana que necessitam da ligação de um grupo farnesil ou geranilgeranil para a sua atividade (177). Rosembloom *et al* demonstrou que a inibição específica da reação geranilgeranilação provocou uma redução significativa da expressão de colágeno tipo I e III em fibroblastos de indivíduos saudáveis e de pacientes com ES (178). Louneva *et al* encontrou um potente efeito inibidor da sinvastatina na expressão de colágeno tipo I em fibroblastos saudáveis e de pacientes com ES (177).

Estatinas também promoveram diminuição da expressão de TGF β 1 e CTGF por células mesangiais renais, fibroblastos renais e fibroblastos pulmonares (2-4). O tratamento com sinvastatina reduziu o processo de transição epitélio-mesenquimal em células epiteliais alveolares (179).

Bagnato *et al.* demonstrou que a sinvastatina preveniu o desenvolvimento de fibrose cutânea e pulmonar em modelo animal de fibrose induzida por ácido hipocloroso (HOCl) (161). De forma semelhante, Ou *et al.*, utilizando o modelo animal de fibrose pulmonar induzida por bleomicina, evidenciou redução da produção das moléculas pró-fibróticas TGF β 1 e CTGF e inibição da expressão de RhoA e da fosforilação Smad2/3, com consequente atenuação da fibrose pulmonar nesses animais (96). Efeito semelhante foi observado com a pravastatina (180) e atorvastatina (181). Tulek *et al.*, apesar de não ter demonstrado atenuação da fibrose pulmonar após tratamento com sinvastatina no modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina, mostrou diminuição dos níveis de IL-13 e TGF β 1 no lavado broncoalveolar (182).

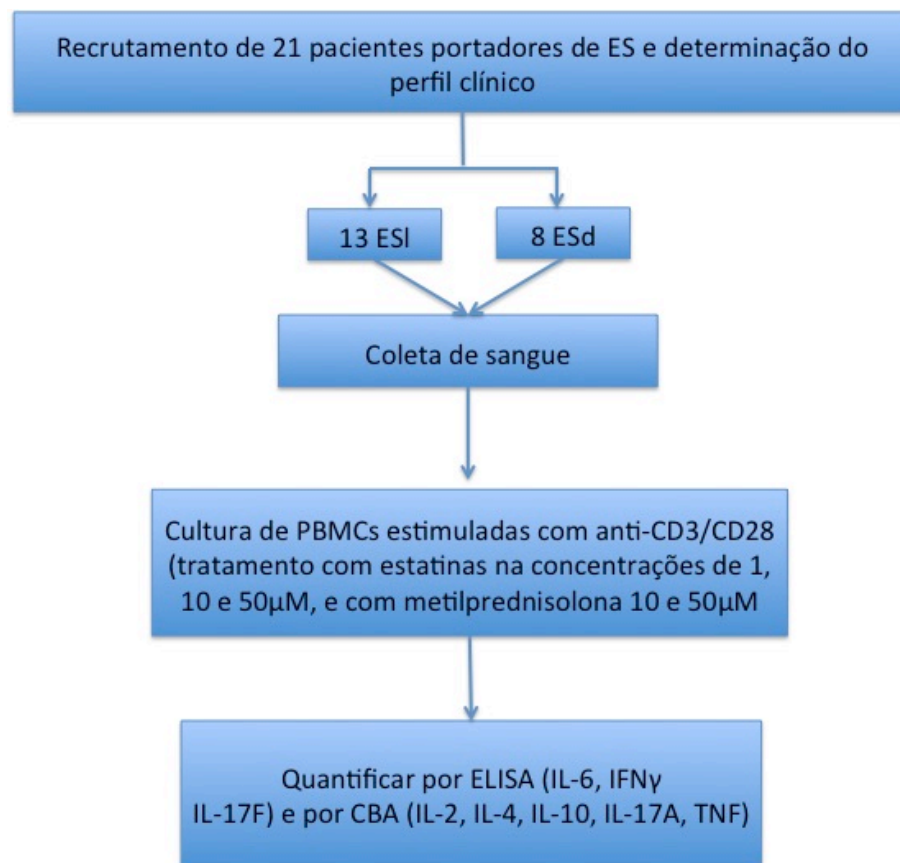
Os achados descritos acima sugerem um potencial efeito antifibrótico dos inibidores da HMG-CoA redutase. Entretanto, estudos adicionais são necessários para comprovar esse efeito e definir o mecanismo de ação envolvido. Neste contexto, este

trabalho se propõe a análise *in vitro* do uso de estatinas como agentes imunomoduladores como possibilidade de uso no tratamento da ES.

4 METODOLOGIA

Abaixo há a ilustração do fluxograma do estudo de forma resumida (figura 3).

Figura 4 - Desenho esquemático do delineamento do estudo



4.1 Recrutamento de pacientes portadores de Esclerose Sistêmica

No ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas de Pernambuco há 150 pacientes portadores de ES cadastrados. Foram selecionados 21 pacientes do sexo feminino atendidos no Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, com diagnóstico de Esclerose Sistêmica segundo os critérios do *American College of Rheumatology* (30). Os pacientes não estavam usando estatinas, e este era um critério de exclusão, além de pacientes menores de 18 anos, ou que tinham sobreposição de doenças, ou que tinham um diagnóstico conhecido de câncer ou infecção crônica também foram excluídos. Após esclarecimentos sobre o Projeto de Pesquisa, aqueles que concordaram quanto às propostas foram convidados a participar do estudo, com inclusão dos mesmos apenas após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE – apêndice 4 e 5). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética **CAAE**: 63515916.1.0000.5208 (Anexo B).

Os exames, bem como o tratamento dos pacientes, foram registrados a partir dos prontuários. O escore de espessura total da pele, o escore de Rodnan modificado, foi utilizado para avaliar a fibrose da pele. O envolvimento do esôfago foi determinado pela cintilografia ou endoscopia; envolvimento pulmonar (padrão de vidro moído ou fibrose bibasilar) foi observado usando tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR). Além disso, foi realizado um teste de função pulmonar (PFT) para examinar a gravidade da fibrose pulmonar; A capacidade vital <80% do previsto foi considerada anormal. A pressão da artéria pulmonar foi estimada pelo ecocardiograma Doppler; pressões acima de 35 mmHg foram interpretadas como hipertensão pulmonar.

4.2 Coleta de sangue e cultura de células mononucleadas de sangue periférico

Foram coletados 15ml de sangue em tubo contendo o anticoagulante heparina. As coletas foram feitas por profissionais competentes e devidamente treinados para reduzir os riscos para o paciente. Nenhuma coleta foi realizada sem a autorização prévia dos voluntários. Para isso, membros da equipe apresentaram aos pacientes o objetivo do estudo e o interesse da sua participação.

A citotoxicidade de simvastatina e atorvastatina foi avaliada em voluntários saudáveis para confirmar a seletividade de drogas. Foram testadas diferentes concentrações de simvastatina (1, 10, 50 μ M) e foram estabelecidas que em todas as concentrações a viabilidade média era > 95% (dados retirados de estudo prévio de Pereira et al) (183).

A citotoxicidade celular para atorvastatina foi avaliada utilizando o ensaio de brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT, Molecular Probes, Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, as PBMC de voluntários saudáveis (1,9 10⁴ / poço) foram semeadas em placas de 96 poços e foram tratadas com diferentes concentrações de Atorvastatina (1, 10, 50 e 100 μ M) durante um período de 72 h. No final da incubação, a absorvância foi lida a 570 nm.

As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram isoladas a partir do sangue de pacientes portadores de ES por centrifugação com Ficoll PaqueTM Plus (*GE Healthcare Bio-Sciences*). As PBMCs isoladas foram cultivadas em placas de 24 poços (10⁶ células/1000 μ L) em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com L-Glutamina, 10% de Soro Bovino Fetal (Lonza), 10 mM de HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (Gibco) e 200 U/mL de Penicilina/Estreptomicina (Gibco). O sobrenadante da cultura das PBMCs foram estimuladas com anti-CD3 e anti-

CD28 (Ebioscienses) e submetidas a tratamento com sinvastatina ou atorvastatina nas concentrações de 1µM, 10µM e 50µM, e a metilprednisolona foi utilizada como padrão da inibição da produção nas concentrações de 10µM e 50µM. Posteriormente estas células foram cultivadas em estufa de CO₂ 5% a 37°C. Após 48 horas, as placas foram centrifugadas, o sobrenadante das culturas foram coletados e armazenados a -20°C para análise das citocinas por ELISA/CBA.

4.3 Determinação de citocinas

As dosagens das citocinas presentes no sobrenadante das culturas foram realizadas utilizando *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) e/ou *Cytometric Bead Array* (CBA), seguindo as informações recomendadas pelos fornecedores. As citocinas avaliadas foram: IL-4, IL-10, IL-17A e TNF (CBA); IL-17F (R&D Systems), IL-6 e IFN γ (BD Biosciences).

4.3.1 Dosagem de citocinas por ELISA

O ELISA do tipo sanduíche foi utilizado para dosagem das citocinas IL-6, IFN γ e IL-17F (Tabela 2) no sobrenadante das culturas de células, seguindo as instruções recomendadas pelos fornecedores. A leitura da absorbância foi realizada em leitora de microplacas de 96 poços (Biotek) devidamente calibrada.

A tabela abaixo apresenta as citocinas avaliadas por ELISA, seus fabricantes e limites de detecção.

Tabela 2. Citocinas avaliadas pela técnica ELISA, fabricantes e limites de detecção.

CITOCINA (pg/ml)	FABRICANTE	LIMITES DE DETECÇÃO
IL-6	BD Biosciences	4,69
IL-17F	Ebioscience	31,25
IFN γ	BD Biosciences	4,6

4.3.2 Dosagem de citocinas por CBA

O *Kit Human Th1/Th2/Th17 Cytokine* (Ref 560485, BD Bioscience) foi utilizado para dosagem das citocinas IL-2, IL-4, IL-10, TNF e IL-17A (Tabela 3). As amostras foram avaliadas pelo citômetro de fluxo BDTM FACS Verse. As análises para quantificação das citocinas foram realizadas pelo BDTM FCAP Array Software v3.0 seguindo as instruções do fabricante.

A tabela abaixo apresenta as citocinas do *kit Human Th1/Th2/Th17 Cytokine* e os limites de detecção.

Tabela 3 - Citocinas do Kit CBA Human Th1/Th2/Th17 e limites de detecção

Kit Human Th1/Th2/Th17 Cytokine	
CITOCINA (pg/ml)	LIMITES DE DETECÇÃO
IL-2	2,60
IL-4	4,90
IL-17A	18,9
IL-10	4,50
TNF	3,80

4.4 Análise dos resultados

A expressão dos resultados das variáveis contínuas foi feita pelas médias e desvios padrão. O teste de D'Agostino foi utilizado para avaliação de normalidade da amostra. Para verificação de possíveis diferenças entre média, foi usado o teste “t” de *Student* para amostras independentes, quando a distribuição foi gaussiana. Nos casos em que o conjunto amostral não passou no teste da normalidade foi usado o teste não paramétrico de Mann-Whitney ou Wilcoxon. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Correlações foram determinadas usando a correlação de Spearman. Todos os dados foram analisados com o GraphPad Prism 6.

5 RESULTADOS

5.1 Determinação do perfil clínico dos pacientes com esclerose sistêmica

Foram avaliados 21 pacientes com ES do ambulatório do HC-UFPE, todos do sexo feminino. Os pacientes foram classificados, de acordo com a extensão do comprometimento cutâneo, na forma cutânea limitada e cutânea difusa, e não houve diferença estatística na amostra. A extensão do comprometimento cutâneo foi avaliado através do escore de Rodnan modificado. Na caracterização clínica dos pacientes, foram avaliados comprometimento de órgãos-alvo (presença de úlceras digitais, dismotilidade esofagiana, fibrose pulmonar, hipertensão arterial pulmonar). Na tabela 4 seguem as informações clínicas e de exames de imagem dos pacientes selecionados.

Tabela 4 - Comparação das características clínicas entre as formas cutânea difusa e limitada de pacientes com Esclerose Sistêmica coletados (n=21).

CARACTERÍSTICAS	CUTÂNEA DIFUSA (n=8)	CUTÂNEA LIMITADA (n=13)
Idade ± DP (anos)	47,6 ± 13,4	47,4 ± 13,1
Sexo feminino %	100	100
Tempo de FRy (meses)	157 ± 117,8	144,6 ± 115,4
Tempo diagnóstico (meses)	104,3 ± 97,3	114,5 ± 98,9
Sintoma inicial %		
Fenômeno de Raynaud	12,5	76,9
Não-FRy	87,5	23,1
Manifestações Clínicas %		
Leucomelanodermia	62,5	69,2
Telangiectasias	75	69,2
Microstomia	75	53,8
FRy objetivo	87,5	84,6
Microcicatrices	37,5	53,8
Úlceras em atividade	-	15,4
Disfagia	75	76,9
Dispepsia	87,5	84,6
Esofagite	25	23
Escore de Rodnan (mediana)	13,9	14,2
HAP	25	7,7
TAC de pulmão alterada %	62,5	38,5
sHAQ (mediana)	1,0	1,005

FRy: fenômeno de Raynaud; HAP: hipertensão arterial pulmonar; TAC: tomografia computadorizada

sHAQ: scleroderma Health Assessment Questionnaire

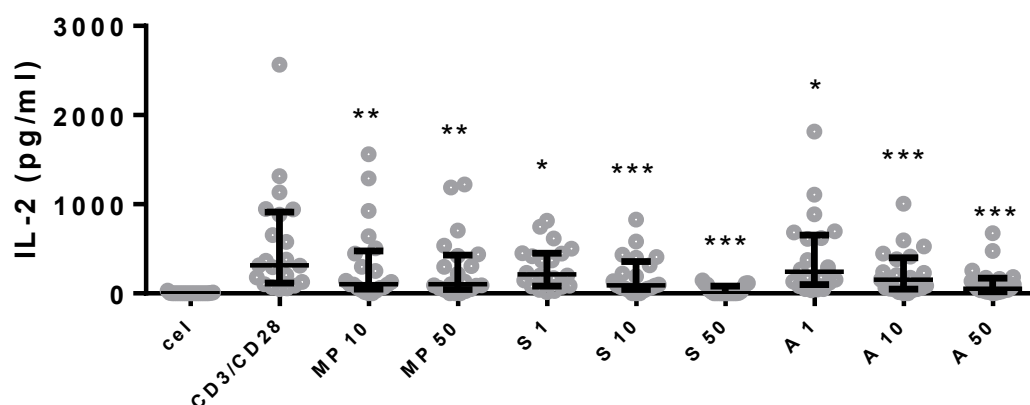
5.2 Avaliação do efeito das Estatinas em cultura de PBMC em pacientes com ES

Para testar o efeito do tratamento das estatinas sobre a secreção de citocinas em PBMCs de pacientes com ES foram avaliados os sobrenadantes das culturas de 21 pacientes e analisadas as seguintes citocinas: IL-6, IL-2, IL-4, TNF, IL-17A, IL-17F e IFN γ . Quando comparado com a condição estimulada, as estatinas promoveram a redução dos níveis de todas as citocinas avaliadas com significância estatística, com a ressalva que a IL-6 só teve seus níveis reduzidos apenas com a sinvastatina. A

metilprednisolona foi utilizada como controle, e também induziu redução da secreção das citocinas com significância estatística. Observamos que a dose de sinvastatina de 50 μ M teve um efeito na redução de todas as secreção de citocinas melhor que com o uso de metilprednisolona a 50 μ M, sendo esta diferença estatisticamente significativa (dados não apresentados).

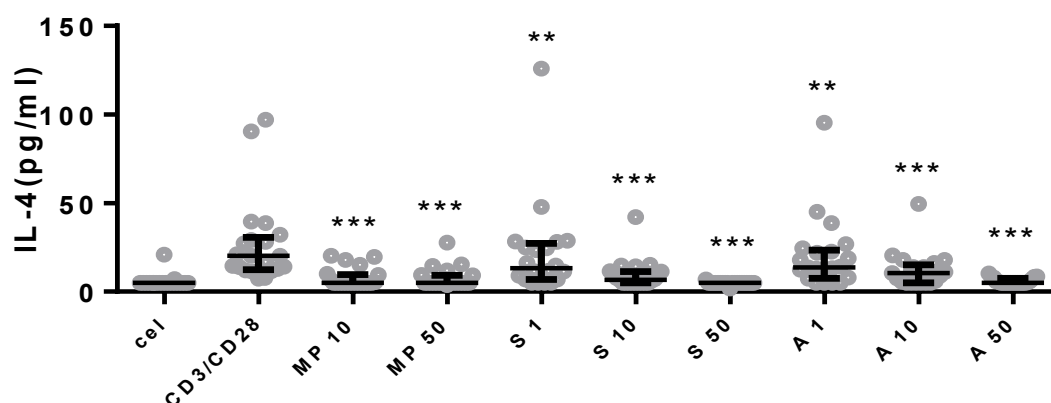
A sinvastatina promoveu redução estatisticamente significante nos níveis da citocina IL-2 em PBMC de pacientes com ES nas concentrações de 1 μ M ($p<0.05$), 10 μ M e 50 μ M ($p< 0.001$), e atorvastatina nas concentrações de 1 μ M ($p<0.05$), 10 e 50 μ M ($p<0.001$) (figura 5). A citocina IL-4 teve os níveis reduzidos nas concentrações da sinvastatina de 1 μ M ($p< 0.01$), 10uM e 50 μ M ($p<0.001$), enquanto a atorvastatina também foi capaz de induzir redução com 1 μ M ($p<0.01$), 10 e 50 μ M ($p<0.001$) (figura 6).

Figura 5 - Avaliação da atividade imunomoduladora das estatinas em culturas de PBMC de pacientes com ES (Níveis de IL-2).



Sinvastatina reduziu significativamente os níveis da IL-2 nas concentrações de 1 μ M, 10 μ M e 50 μ M; e atorvastatina reduziu significativamente os níveis da IL-2 nas concentrações de 1 μ M, 10 μ M e 50 μ M. Todas as comparações foram realizadas com a condição estimulada com anti-CD3/CD28. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. Cél= células, anti-CD3/CD28= anticorpos monoclonais CD3 e CD28, S= sinvastatina, A= Atorvastatina, MP= metilprednisolona

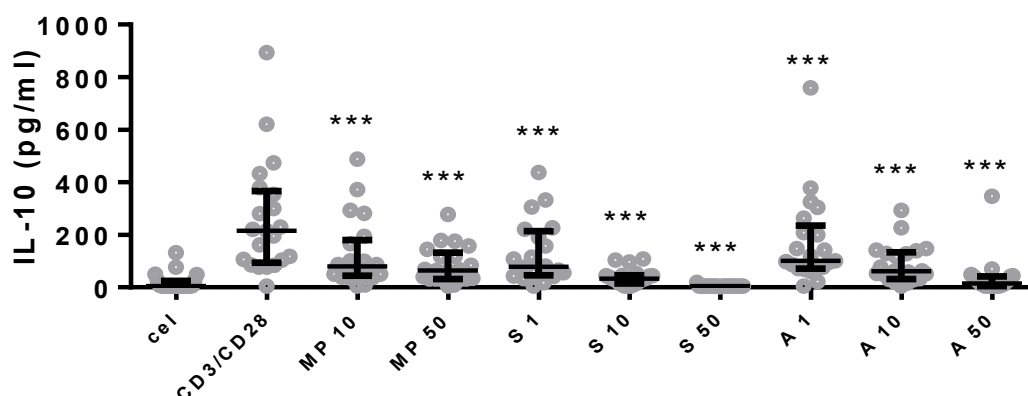
Figura 6 - Avaliação da atividade imunomoduladora das estatinas em culturas de PBMC de pacientes com ES (Níveis de IL-4).



Sinvastatina reduziu significativamente os níveis da IL-4 nas concentrações de 1 μ M, 10 μ M e 50 μ M; e atorvastatina reduziu significativamente os níveis da IL-4 nas concentrações de 1 μ M, 10 μ M e 50 μ M. Todas as comparações foram realizadas com a condição estimulada com anti-CD3/CD28. ** p <0.01, *** p <0.001. Cél= células, anti-CD3/CD28= anticorpos monoclonais CD3 e CD28, S= sinvastatina, A= Atorvastatina, MP= metilprednisolona.

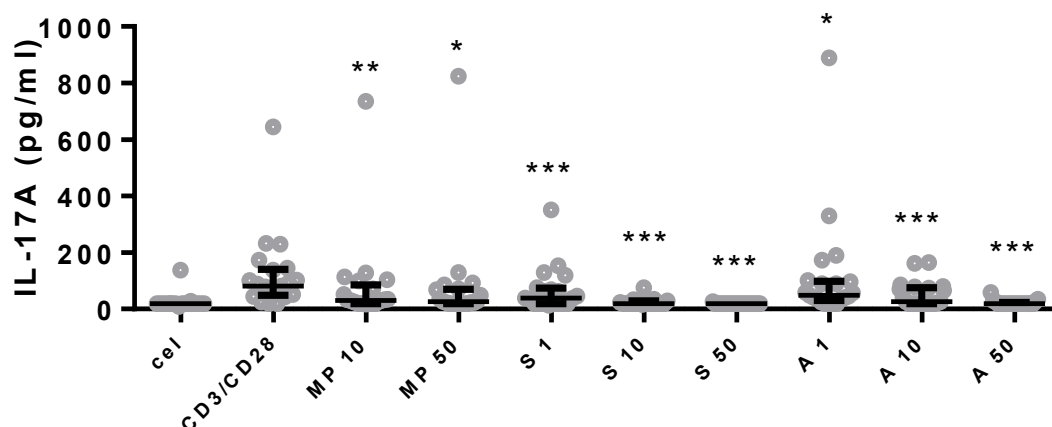
A sinvastatina promoveu redução estatisticamente significativa nos níveis da citocina IL-10 em PBMC de pacientes com ES nas concentrações de 1 μ M, 10 μ M e 50 μ M (p <0.001); e atorvastatina nas concentrações de 1 μ M, 10 μ M e 50 μ M (p <0.001) (figura 7). A citocina IL-17A teve os níveis reduzidos nas concentrações da sinvastatina de 1 μ M, 10 μ M e 50 μ M (p <0.001), enquanto a atorvastatina também foi capaz de induzir redução com 1 μ M (p <0.05), 10 e 50 μ M (p <0.001) (figura 8).

Figura 7 - Avaliação da atividade imunomoduladora das estatinas em culturas de PBMC de pacientes com ES (Níveis de IL-10).



Sinvastatina reduziu significativamente os níveis da IL-10 nas concentrações de 1 μ M, 10 μ M e 50 μ M; e atorvastatina reduziu significativamente os níveis da IL-10 nas concentrações de 1 μ M, 10 μ M e 50 μ M. Todas as comparações foram realizadas com a condição estimulada com anti-CD3/CD28. *** p <0.001. Cél= células, anti-CD3/CD28= anticorpos monoclonais CD3 e CD28, S= sinvastatina, A= Atorvastatina, MP= metilprednisolona

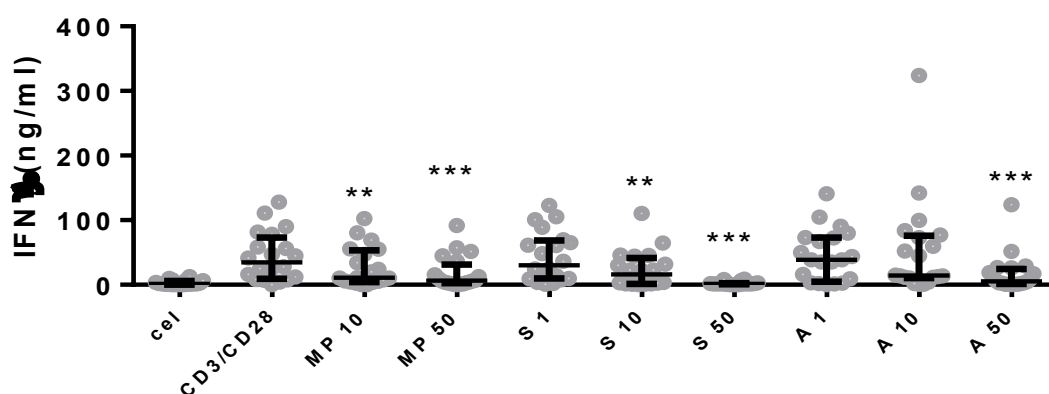
Figura 8 - Avaliação da atividade imunomoduladora das estatinas em culturas de PBMC de pacientes com ES (Níveis de IL-17A).



Sinvastatina reduziu significativamente os níveis da IL-17A nas concentrações de 1 μ M, 10 μ M e 50 μ M; e atorvastatina reduziu significativamente os níveis da IL-17A nas concentrações de 1 μ M, 10 μ M e 50 μ M. Todas as comparações foram realizadas com a condição estimulada com anti-CD3/CD28 * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001. Cél= células, anti-CD3/CD28= anticorpos monoclonais CD3 e CD28, S= sinvastatina, A=Atorvastatina, MP= metilprednisolona.

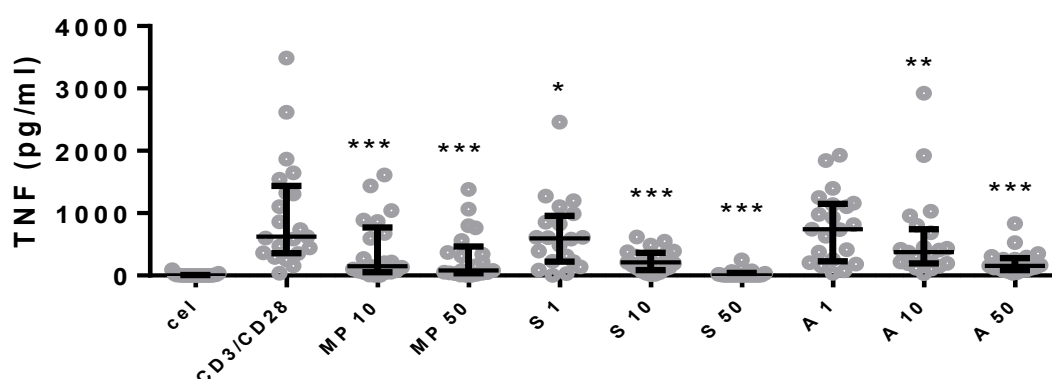
Os níveis de INF γ foram reduzidos com a sinvastatina estatisticamente significante em PBMC de pacientes com ES nas concentrações de 10 μ M (p =0.0006) e 50 μ M (p <0.0001); e atorvastatina na concentração de 50 μ M (p =0.0001) (figura 9). O TNF teve seus níveis reduzidos nas concentrações da sinvastatina de 1 μ M (p =0.0192), 10 μ M e 50 μ M (p <0.001), enquanto a atorvastatina também foi capaz de induzir redução com 10 μ M (p <0.01), e 50 μ M (p <0.001) (figura 10).

Figura 9 - Avaliação da atividade imunomoduladora das estatinas em culturas de PBMC de pacientes com ES (Níveis de INF γ).



Sinvastatina reduziu significativamente os níveis da INF γ nas concentrações de 10 μ M e 50 μ M, enquanto atorvastatina apenas na concentração de 50 μ M. Todas as comparações foram realizadas com a condição estimulada com anti-CD3/CD28. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001. Cél= células, anti-CD3/CD28= anticorpos monoclonais CD3 e CD28, S= sinvastatina, A= Atorvastatina, MP= metilprednisolona

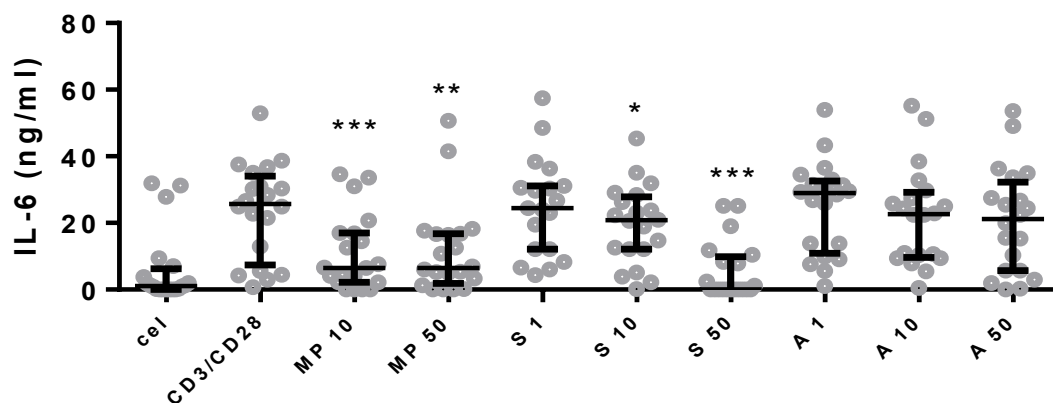
Figura 10 - Avaliação da atividade imunomoduladora das estatinas em culturas de PBMC de pacientes com ES (Níveis de TNF).



Sinvastatina reduziu significativamente os níveis da TNF nas concentrações de 1 μ M, 10 μ M e 50 μ M; e atorvastatina reduziu significativamente os níveis nas concentrações de 10 μ M e 50 μ M. Todas as comparações foram realizadas com a condição estimulada com anti-CD3/CD28. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001. Cél= células, anti-CD3/CD28= anticorpos monoclonais CD3 e CD28, S= sinvastatina, A= Atorvastatina, MP= metilprednisolona

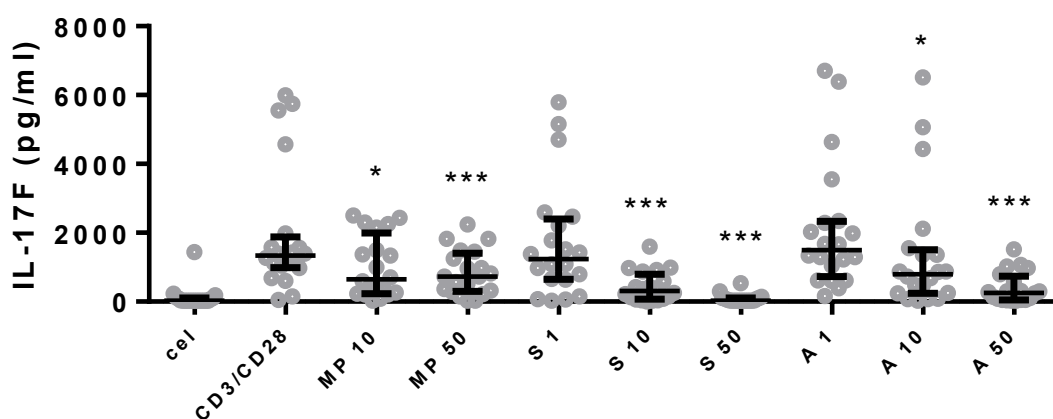
IL-6 teve seus níveis reduzidos de forma estatisticamente significativa apenas com a sinvastatina em PBMC de pacientes com ES e nas concentrações de 10 μ M (p <0.05) e 50 μ M (p <0.001); a atorvastatina não foi capaz de induzir redução dos níveis da IL-6 (figura 11). A IL-17F teve seus níveis bastante reduzidos nas concentrações da sinvastatina de 10 μ M (p <0.0001), e 50 μ M (p =0.0001), enquanto a atorvastatina foi capaz de promover redução com 10 μ M (p =0.0056) e 50 μ M (p <0.0001) (figura 12).

Figura 11 - Avaliação da atividade imunomoduladora das estatinas em culturas de PBMC de pacientes com ES (Níveis de IL-6).



Sinvastatina reduziu significativamente os níveis da IL-6 nas concentrações de 10µM e 50µM; e atorvastatina não foi capaz de reduzir os níveis da IL-6. Todas as comparações foram realizadas com a condição estimulada com anti-CD3/CD28 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Cél= células, anti-CD3/CD28= anticorpos monoclonais CD3 e CD28, S= sinvastatina, A= Atorvastatina, MP= metilprednisolona

Figura 12 - Avaliação da atividade imunomoduladora das estatinas em culturas de PBMC de pacientes com ES (Níveis de IL-17F).



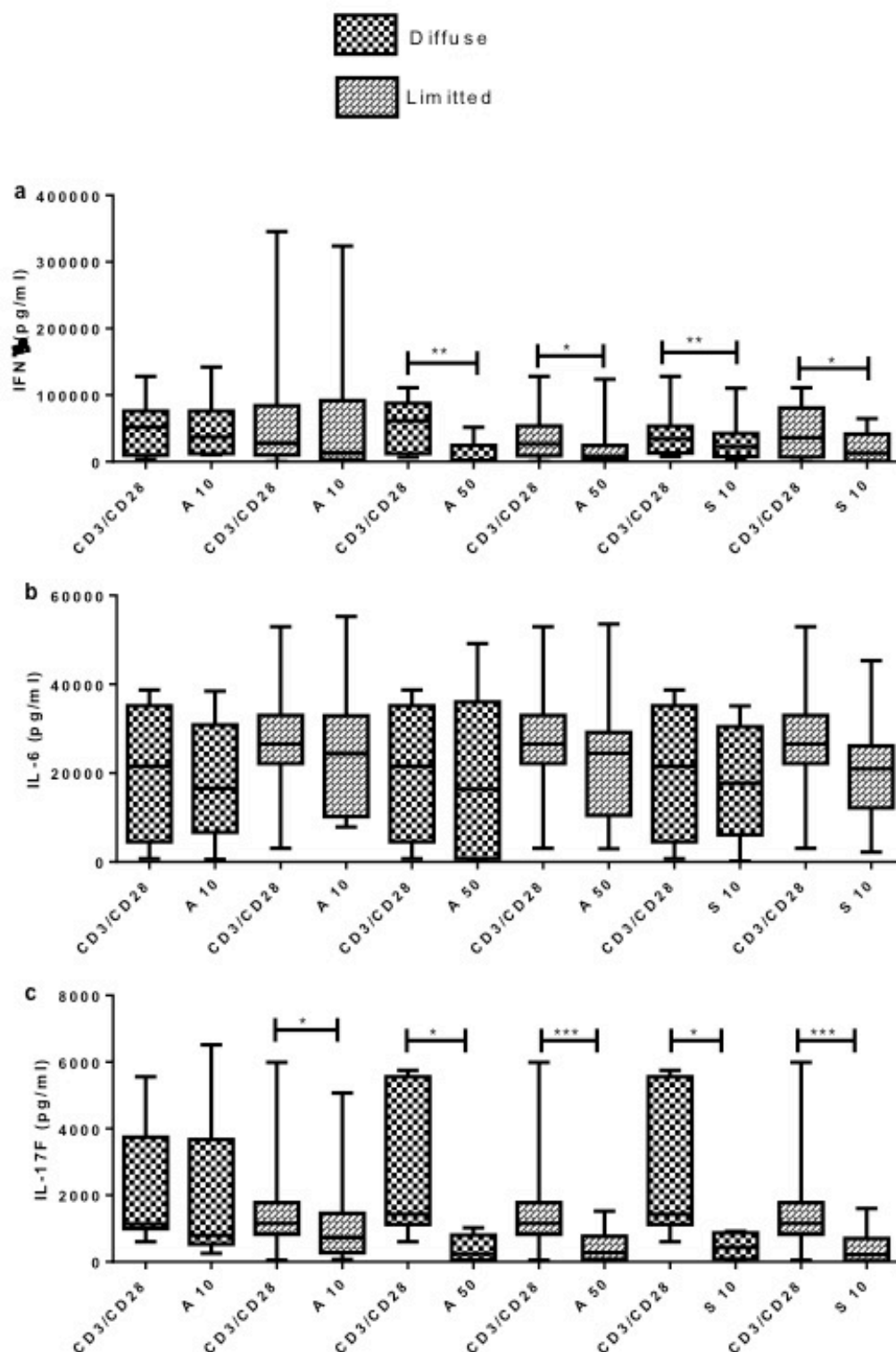
Sinvastatina reduziu significativamente os níveis da IL-17F nas concentrações de 10µM e 50µM; e atorvastatina foi capaz de promover redução dos níveis da IL-17F na concentração de 50µM. Todas as comparações foram realizadas com a condição estimulada com anti-CD3/CD28. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. Cél= células, anti-CD3/CD28= anticorpos monoclonais CD3 e CD28, S= sinvastatina, A= Atorvastatina, MP= metilprednisolona

5.3 Avaliação do efeito das estatinas nos subgrupos da ES separados de acordo com as formas de doença: difusa e limitada

Quando separamos em grupos por forma clínica de doença (difusa x limitada), sinvastatina e atorvastatina a 50µM conseguiram reduzir a secreção de todas as citocinas em ambas as apresentações (dados não mostrados), exceto para a IL-6 que não foi

reduzida pela atorvastatina 50 μ M, nem por sinvastatina e atorvastatina a 10 μ M em ambas as formas clínicas (figura 13b). A sinvastatina e a atorvastatina a 50 μ M induziram a diminuição na secreção de níveis de IFN γ em ambas as formas, mas a atorvastatina não conseguiu reduzi-la a uma dose de 10 μ M (figura 13a). Atorvastatina na dose de 10 μ M também não conseguiu reduzir o nível de secreção de IL17-F na forma difusa (figura 13c). Todos os outros níveis de citocinas analisados e não citados anteriormente tiveram resposta ao tratamento com sinvastatina a uma dose de 10 μ M, atorvastatina a 10 μ M e 50 μ M, que foi estatisticamente significante tanto na forma difusa quanto na forma limitada (dados não mostrados).

Figura 13 - Avaliação da resposta ao tratamento de sinvastatina 10 μ M em culturas PBMC de pacientes com as formas difusa e limitada



(a) Sinvastatina a 10 μ M e atorvastatina a 50 μ M induziu redução na secreção de níveis de IFN γ em ambas as formas; (b) Sinvastatina 10 μ M e atorvastatina 10 μ M e 50 μ M não conseguiram reduzir a secreção de IL-6 de PBMCs em ambas as formas clínicas. (c) Atorvastatina a 10 μ M apenas reduziu secreção de IL-17F na forma limitada. CD3 / CD28 = anticorpos monoclonais CD3 e CD28, A = atorvastatina, S = sinvastatina

5.4 Efeito das estatinas no perfil da citocina correlacionada com medidas clínicas

Observamos que todas as citocinas secretadas por PBMCs de pacientes com ES tiveram resposta (com significância estatística) a sinvastatina em uma dose de 50 μ M em diferentes grupos clínicos (fibrose pulmonar, ou úlceras e cicatrizes digitais, dados não mostrados).

Quando analisamos a resposta às estatinas na redução da secreção de IL-6, observamos que a atorvastatina em todas as doses não conseguiu reduzir a secreção em ambos os pacientes, com ou sem fibrose pulmonar. No entanto, a sinvastatina na dose de 50 μ M (como já mencionado) foi capaz de reduzir em ambos os grupos (com ou sem fibrose pulmonar) a IL-6, mas na dose de 10 μ M, apenas em pacientes com fibrose pulmonar ($p < 0,05$). A IL-6 não teve resposta a atorvastatina em doses de 10 μ M e 50 μ M em pacientes com ou sem presença de cicatrizes digitais, mas teve reduzida a secreção quando tratada com sinvastatina a 10 μ M em pacientes com presença de cicatrizes digitais ($p < 0,01$).

A atorvastatina na dose de 10 μ M não foi capaz de reduzir IFN γ em qualquer subgrupo clínico (fibrose pulmonar ou úlceras e picadas digitais), mas foi capaz de reduzir nas doses de 50 μ M (dados não mostrados). A atorvastatina 10 μ M também não reduziu a IL-17F em pacientes com presença de cicatrizes digitais e no grupo que não apresentava fibrose pulmonar. A secreção dos níveis de TNF não respondeu a 10 μ M de atorvastatina em ambos os grupos de pacientes com ou sem presença de cicatrizes digitais, e nesta dose de atorvastatina não foi possível reduzir os níveis de TNF em pacientes com fibrose pulmonar.

Todos os outros níveis de citocinas analisados e não citados anteriormente tiveram resposta ao tratamento com sinvastatina em uma dose de 10 μ M, atorvastatina 10 μ M e 50 μ M, que foi estatisticamente significativa em ambos os grupos independentemente do envolvimento pulmonar (dados não apresentados).

Não encontramos correlação dos níveis de secreção de citocinas das PBMCs em pacientes com ES, com escore de Rodnan modificado, nem com as apresentações clínicas (alterações pulmonares, vasculares, cardíacas ou gastrointestinais). Não houve diferença estatística entre os grupos tratados com imunossupressores, incluindo corticosteróides.

6 DISCUSSÃO

O tratamento da ES é direcionado de acordo com a extensão e gravidade das manifestações clínicas. Até recentemente, a maioria das terapias disponíveis são baseadas em alívio sintomático, com poucas opções consideradas efetivas. Embora a inflamação seja uma das características da doença precoce, sua interrelação com a fibrose ainda não foi definida e as terapias anti-inflamatórias demonstraram-se ineficazes (7).

Neste estudo demonstramos que a sinvastatina tem provável efeito imunossupressor (dose-dependente) em todas as citocinas testadas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN γ , IL17F e IL-17A), no sobrenadante da cultura de PBMCs de pacientes com esclerodermia. A atorvastatina também apresentou resposta em todas as citocinas (dose-dependente), com exceção da IL-6, onde nenhum efeito foi observado. Até o presente momento, nenhum estudo havia avaliado o efeito da sinvastatina *in vitro* em sobrenadante de cultura de PBMCs em pacientes com ES.

A diferença de resposta entre sinvastatina e atorvastatina (especialmente na IL-6) poderia ser explicada pelo fato de ambos terem diferentes estruturas tridimensionais. Existem dois tipos de estatinas de acordo com as estruturas. As estatinas de tipo 1 (por exemplo, sinvastatina) exibem ligação através de uma estrutura de anel de decalina e as estatinas de tipo 2 (por exemplo, atorvastatina) exibem ligação adicional através do seu grupo fluorofenilo. As diferenças na estrutura das estatinas e nas características de ligação podem explicar parcialmente as diferenças na potência de inibição da HMG-CoA redutase [21], e também podem explicar por que a sinvastatina parece ter mais efeito nas citocinas do sobrenadantes de PBMC na ES do que a atorvastatina.

Estudos realizados para avaliar os efeitos diretos das estatinas na produção de citocinas com células mononucleares de sangue periférico humano (PBMCs) de pessoas saudáveis *in vitro* mostraram diminuição da produção de IL-2, IFN γ como no nosso estudo, de forma dose-dependente, mas não demonstrou efeito sobre a IL-6 (184). Esta não resposta da IL-6 ao tratamento com sinvastatina, foi diferente do que observamos, e talvez a célula saudável não responda da mesma forma à sinvastatina, como foi observada em nosso estudo em células de ES, e em outros estudos que mostraram que a atorvastatina, por exemplo, diminuiu a produção de IL-6 em pacientes hipercolesterolêmicos (185) e em coelhos (186). A redução na secreção da IL-6 também foi observada após o tratamento de células endoteliais com pravastatina, sinvastatina, cerivastatina e fluvastatina (187).

Outro estudo revelou que a lovastatina diminuiu significativamente a produção de IL-2, IL-4 e IFN γ por linfócitos T purificados, a partir de PBMCs humanas *in vitro*, mas não reduziu secreção de TNF (188). Cherfan et al. avaliaram o efeito da sinvastatina em células T humanas saudáveis (apenas com hipercolesterolemia leve) *in vivo*, e não foram capazes de demonstrar qualquer influência significativa sobre a resposta Th1 e Th2 pela sinvastatina (189), e neste estudo apenas IL-4 e IFN γ foram analisadas. Em outro estudo, o tratamento com sinvastatina em pacientes dislipidêmicos resultou em uma diminuição da liberação de IFN γ e IL-2 quando as células foram estimuladas com *phytohemagglutinin* (190).

Embora não existam estudos sobre o efeito *in vitro* da estatina em PBMCs da ES, há estudos em outras doenças auto-imunes, como por exemplo na artrite reumatóide (AR). Em pacientes **portadores** de AR, a sinvastatina reduziu os níveis de secreção de IL-17A, IL-6, IL-22 e IFN γ em PBMCs numa resposta dose-dependente (183). Blaschke et al. observaram que a atorvastatina reduziu os níveis de secreção de IFN γ em PBMCs de pacientes com AR, mas não reduziu IL-6 (como observamos nos nossos resultados), mas também não teve efeito nas secreções de IL-4 e IL-10 (191), diferente do que observamos no nosso estudo.

Um outro estudo que foi realizado em linfócitos intraepiteliais murinos (IELs) e em células de esplenócitos evidenciaram supressão de IFN γ , IL-2, TNF e IL-4 quando essas células foram tratadas com estatinas (192). Em modelos murinos de doenças predominantes-Th1, como a artrite reumatóide e a esclerose múltipla, as estatinas mostraram consistentemente ações imunossupressoras pela inibição do desenvolvimento da via Th1 (193, 194).

As estatinas são substâncias que, farmacologicamente, bloqueiam a conversão da coenzima A de hidroxil-3-metilglutaril A (HMG-CoA) em mevalonato por ligação por mecanismo competitivo à HMG-CoA redutase promovendo o deslocamento de seu substrato natural (HMG-CoA) (165, 166). Este processo de bloqueio requer modificação pós-tradução de proteínas, como a superfamília Ras de GTPases, que são reguladores chaves em vias de sinalização desencadeadas por receptores de superfície. Desta forma, as estatinas têm efeitos pleiotrópicos em muitos tipos de células, e recentemente, os linfócitos T foram identificados como alvos celulares das estatinas (195).

Nas últimas décadas, a taxa de mortalidade por doença cardiovascular em pacientes com ES vem aumentando progressivamente (167, 168). Alguns poucos ensaios

pequenos e não randomizados sugeriram alguma utilidade do uso de estatinas para tratamento de danos vasculares nos pacientes com ES (196-203). Em geral, esses estudos observaram que as estatinas reduziram citocinas relacionadas ao dano vascular, como endotelina-1 e VEGF. Apesar dos resultados favoráveis destes estudos, ainda não há recomendações para o uso de estatinas na terapia de manifestações vasculares destes pacientes portadores de ES, incluindo fenômeno de Raynaud, úlceras digitais e hipertensão arterial pulmonar.

Um fato interessante foi a boa resposta ao tratamento de sinvastatina a 50 μ M em todas as citocinas quando analisamos por apresentações clínicas, mas em uma dose de sinvastatina a 10 μ M, IL-6 e IFN γ apresentaram respostas diferentes em certas circunstâncias clínicas, como também observamos que a atorvastatina a 10 μ M apresentou efeito distinto nas IL-17F e TNF, e nenhum efeito sobre IFN γ e IL-6.

Observamos efeito da sinvastatina 10 μ M na redução da secreção de níveis de IL-6 em PBMCs de pacientes com fibrose pulmonar. Como já sabemos, a IL-6 encontra-se elevada no soro de pacientes com ES e tem sido associada ao envolvimento de múltiplos órgãos incluindo a pele (159), presença de fibrose pulmonar (91, 158, 204), e aumento de mortalidade (205). Estes estudos demonstram que a IL-6 está envolvida na patogênese da ES, e pode contribuir para a progressão da fibrose e severidade da doença. Nosso resultado demonstra uma interessante observação a respeito do potencial da sinvastatina no tratamento de ES, uma vez que tem efeito sobre IL-6.

O TNF é uma citocina pró-inflamatória, e o seu papel na ES permanece incerto. Foi relatado aumento desta citocina na pele (98) e no soro (90), bem como uma produção aumentada por células mononucleadas circulantes (99) em pacientes com ES. Além disso, as células T co-estimuladas por TNF produzem mais citocinas profibróticas, e aumentam a produção de colágeno através dos fibroblastos (100). No entanto, por outro lado, outros estudos demonstram que TNF reduz a produção de colágeno e aumenta a produção de metaloproteinases por fibroblastos dérmicos (101, 102). Portanto, não há como concluir que a não resposta da atorvastatina 10 μ M na redução do TNF em pacientes com fibrose pulmonar, seja benéfica para este grupo de pacientes.

IL-17F compartilha funções com a IL-17A, no entanto, IL-17F parece não inibir a produção de colágeno induzido em fibroblastos por TGF- β (128), embora tanto a IL-17A quanto a IL-17F modulem a função dos fibrócitos (129). Além disso, enquanto

muitos autores defendem um papel inflamatório e pró-fibrótico de IL-17A/F (123, 130-132), outros acreditam que estas citocinas exerçam um papel antifibrótico indireto (120, 133). Portanto, ainda não é possível ratificar que a não inibição da IL-17F em pacientes que não possuem fibrose pulmonar nem que a não-inibição da IL-17F em pacientes com dano vascular periférico é uma solução boa ou ruim na terapia de pacientes com ES. A via Th17 precisa ser melhor estudada para elucidar o seu real papel na patogênese ES.

Outro resultado interessante do nosso estudo foi a resposta diferente das formas difusa e limitada da doença à sinvastatina e à atorvastatina na dose de 10µM. Atorvastatina 10µM não foi capaz de reduzir a secreção de níveis de IFN γ em ambas as formas (dcSSc e lcSSc), nem níveis de IL-17F em dcSSc. A IL-6 não sofreu efeito na terapia em ambas as formas dcSSc e lcSSc quer por sinvastatina 10 µM, nem por atorvastatina 10µM e 50µM; apenas respondendo a sinvastatina 50µM (dados não mostrados), ratificando o poder imunossupressor desta medicação em células ES. Esta resposta imunossupressora dependente da dose que observamos neste estudo em PBMCs de ES reforça o pensamento de que a estrutura da medicação, bem como o alvo da medicação, têm o poder da resposta final ao tratamento. A falta de estudos *in vitro* com PBMCs em ES usando estatinas não nos permite conclusões mais robustas, exceto a indicação do potencial imunossupressor que a sinvastatina a 50µM demonstrou em nosso estudo.

Nós reconhecemos que nosso estudo possui algumas limitações importantes. Nosso tamanho de amostra é limitado, e nossas descobertas justificam estudos adicionais em coortes de validação maiores. Além disso, a maioria dos pacientes estava em tratamento específico, o que pode interferir com os níveis de citocinas estudados, mas tentamos minimizar esse viés através de análises estatísticas ajustadas por idade e medicamentos utilizados.

A segurança das estatinas foi confirmada para uso no tratamento da hiperlipidemia em todo o mundo. As propriedades moduladoras potenciais das estatinas em respostas inflamatórias influenciaram os estudos sobre isso. As estatinas podem fornecer realmente um efeito terapêutico aditivo no tratamento de doenças auto-imunes.

7 CONCLUSÃO

Mostramos que as estatinas, especialmente a sinvastatina, reduziu a secreção de todas as citocinas de sobrenadante de cultura de PBMCs de uma maneira dose-dependente. Nossos achados sugerem que a terapia com estatina tem efeito

imunossupressor podendo ser capaz de modular as vias Th1, Th2 e Th17. No entanto, serão necessários mais estudos, com ensaios clínicos, para elucidar os mecanismos moleculares.

REFERÊNCIAS

1. Ong VH, Denton CP. Innovative therapies for systemic sclerosis. *Current opinion in rheumatology*. 2010;22(3):264-72.
2. Kim SI, Han DC, Lee HB. Lovastatin inhibits transforming growth factor-beta1 expression in diabetic rat glomeruli and cultured rat mesangial cells. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2000;11(1):80-7.
3. Li C, Yang CW, Park JH, Lim SW, Sun BK, Jung JY, et al. Pravastatin treatment attenuates interstitial inflammation and fibrosis in a rat model of chronic cyclosporine-induced nephropathy. *American journal of physiology Renal physiology*. 2004;286(1):F46-57.
4. Goppelt-Struebe M, Hahn A, Iwanciw D, Rehm M, Banas B. Regulation of connective tissue growth factor (ccn2; ctgf) gene expression in human mesangial cells: modulation by HMG CoA reductase inhibitors (statins). *Molecular pathology : MP*. 2001;54(3):176-9.
5. Matucci-Cerinic M, Steen V, Nash P, Hachulla E. The complexity of managing systemic sclerosis: screening and diagnosis. *Rheumatology*. 2009;48 Suppl 3:iii8-13.
6. Katsumoto TR, Whitfield ML, Connolly MK. The pathogenesis of systemic sclerosis. *Annual review of pathology*. 2011;6:509-37.
7. Balbir-Gurman A, Braun-Moscovici Y. Scleroderma - new aspects in pathogenesis and treatment. *Best practice & research Clinical rheumatology*. 2012;26(1):13-24.
8. Babalola O, Mamalis A, Lev-Tov H, Jagdeo J. NADPH oxidase enzymes in skin fibrosis: molecular targets and therapeutic agents. *Arch Dermatol Res*. 2014;306(4):313-30.
9. Chiffot H, Fautrel B, Sordet C, Chatelus E, Sibilia J. Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2008;37(4):223-35.
10. Silman AJ. Scleroderma--demographics and survival. *The Journal of rheumatology Supplement*. 1997;48:58-61.
11. Barnes J, Mayes MD. Epidemiology of systemic sclerosis: incidence, prevalence, survival, risk factors, malignancy, and environmental triggers. *Current opinion in rheumatology*. 2012;24(2):165-70.
12. Horimoto AM, Matos EN, Costa MR, Takahashi F, Rezende MC, Kanomata LB, et al. Incidence and prevalence of systemic sclerosis in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Bras Reumatol*. 2016.
13. Aden N, Nuttall A, Shiwen X, de Winter P, Leask A, Black CM, et al. Epithelial cells promote fibroblast activation via IL-1alpha in systemic sclerosis. *The Journal of investigative dermatology*. 2010;130(9):2191-200.
14. Varga J. Systemic Sclerosis (Scleroderma) and Related Disorders. 2012.
15. Mayes MD, Lacey JV, Jr., Beebe-Dimmer J, Gillespie BW, Cooper B, Laing TJ, et al. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis and rheumatism*. 2003;48(8):2246-55.
16. Ferri C, Valentini G, Cozzi F, Sebastiani M, Michelassi C, La Montagna G, et al. Systemic sclerosis: demographic, clinical, and serologic features and survival in 1,012 Italian patients. *Medicine*. 2002;81(2):139-53.
17. Dieude P, Boileau C, Allanore Y. Immunogenetics of systemic sclerosis. *Autoimmunity reviews*. 2011;10(5):282-90.

18. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nature medicine*. 2012;18(7):1028-40.
19. Allanore Y, Dieude P, Boileau C. Genetic background of systemic sclerosis: autoimmune genes take centre stage. *Rheumatology*. 2010;49(2):203-10.
20. Tsuchiya N, Kuroki K, Fujimoto M, Murakami Y, Tedder TF, Tokunaga K, et al. Association of a functional CD19 polymorphism with susceptibility to systemic sclerosis. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(12):4002-7.
21. Schwinzer R, Witte T, Hundrieser J, Ehlers S, Momot T, Hunzelmann N, et al. Enhanced frequency of a PTPRC (CD45) exon A mutation (77C-->G) in systemic sclerosis. *Genes and immunity*. 2003;4(2):168-9.
22. Rueda B, Broen J, Simeon C, Hesselstrand R, Diaz B, Suarez H, et al. The STAT4 gene influences the genetic predisposition to systemic sclerosis phenotype. *Human molecular genetics*. 2009;18(11):2071-7.
23. Zhou X, Tan FK, Reveille JD, Wallis D, Milewicz DM, Ahn C, et al. Association of novel polymorphisms with the expression of SPARC in normal fibroblasts and with susceptibility to scleroderma. *Arthritis and rheumatism*. 2002;46(11):2990-9.
24. Tan FK, Wang N, Kuwana M, Chakraborty R, Bona CA, Milewicz DM, et al. Association of fibrillin 1 single-nucleotide polymorphism haplotypes with systemic sclerosis in Choctaw and Japanese populations. *Arthritis and rheumatism*. 2001;44(4):893-901.
25. Arora-Singh RK, Assassi S, del Junco DJ, Arnett FC, Perry M, Irfan U, et al. Autoimmune diseases and autoantibodies in the first degree relatives of patients with systemic sclerosis. *Journal of autoimmunity*. 2010;35(1):52-7.
26. Rodnan GP, Benedek TG. An historical account of the study of progressive systemic sclerosis (diffuse scleroderma). *Annals of internal medicine*. 1962;57:305-19.
27. Seibold JR SE, Leroy C & Steen VD. Systemic sclerosis. In: limited M-ybE, editor. *Rheumatology*. London UK1994.
28. Klemperer P PAD, Baehr G. Diffuse Collagen Disease. *Jama*. 1942;119(4):331.
29. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA, Jr., et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *The Journal of rheumatology*. 1988;15(2):202-5.
30. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. *Arthritis and rheumatism*. 1980;23(5):581-90.
31. Andrade LECAL, Paulo Guilherme Leser. Auto-Anticorpos na Esclerose Sistêmica (ES). **Rev Bras Reumatol**. 2004;44(3):215-23.
32. Steen V, Medsger TA, Jr. Predictors of isolated pulmonary hypertension in patients with systemic sclerosis and limited cutaneous involvement. *Arthritis and rheumatism*. 2003;48(2):516-22.
33. Steen V. Predictors of end stage lung disease in systemic sclerosis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2003;62(2):97-9.
34. Nitsche A. Raynaud, digital ulcers and calcinosis in scleroderma. *Reumatologia clinica*. 2012;8(5):270-7.
35. Bertazzi GR, de Toledo RA, de Godoy MF, Geraldino GC, Fernandes GC, Polizelli DV, et al. [Skin manifestation in systemic sclerosis]. *Acta reumatologica portuguesa*. 2010;35(2):184-90.

36. Abe M, Yokoyama Y, Amano H, Matsushima Y, Kan C, Ishikawa O. Effect of activated human mast cells and mast cell-derived mediators on proliferation, type I collagen production and glycosaminoglycans synthesis by human dermal fibroblasts. *European journal of dermatology : EJD*. 2002;12(4):340-6.
37. Fischer DJ, Patton LL. Scleroderma: oral manifestations and treatment challenges. *Special care in dentistry : official publication of the American Association of Hospital Dentists, the Academy of Dentistry for the Handicapped, and the American Society for Geriatric Dentistry*. 2000;20(6):240-4.
38. Clements P, Lachenbruch P, Siebold J, White B, Weiner S, Martin R, et al. Inter and intraobserver variability of total skin thickness score (modified Rodnan TSS) in systemic sclerosis. *The Journal of rheumatology*. 1995;22(7):1281-5.
39. Garza-Rodriguez V, Villarreal-Alarcon MA, Ocampo-Candiani J. [Scleroderma: an update on the pathogenesis and treatment]. *Revista medica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 2013;51(1):50-7.
40. KAYSER CC, Marcelo José Uchôa; ANDRADE, Luís Eduardo Coelho. Fenômeno de Raynaud. *Rev Bras Reumatol*. 2009; 49(1):48-63.
41. Lorand V, Czirjak L, Minier T. Musculoskeletal involvement in systemic sclerosis. *Presse medicale*. 2014;43(10 Pt 2):e315-28.
42. Akter T, Silver RM, Bogatkevich GS. Recent advances in understanding the pathogenesis of scleroderma-interstitial lung disease. *Current rheumatology reports*. 2014;16(4):411.
43. D'Angelo WA, Fries JF, Masi AT, Shulman LE. Pathologic observations in systemic sclerosis (scleroderma). A study of fifty-eight autopsy cases and fifty-eight matched controls. *The American journal of medicine*. 1969;46(3):428-40.
44. Chang B, Wigley FM, White B, Wise RA. Scleroderma patients with combined pulmonary hypertension and interstitial lung disease. *The Journal of rheumatology*. 2003;30(11):2398-405.
45. Steen VD, Powell DL, Medsger TA, Jr. Clinical correlations and prognosis based on serum autoantibodies in patients with systemic sclerosis. *Arthritis and rheumatism*. 1988;31(2):196-203.
46. Highland KB. Recent advances in scleroderma-associated pulmonary hypertension. *Current opinion in rheumatology*. 2014;26(6):637-45.
47. Lambova S. Cardiac manifestations in systemic sclerosis. *World journal of cardiology*. 2014;6(9):993-1005.
48. Nay J, Menias CO, Mellnick VM, Balfe DM. Gastrointestinal manifestations of systemic disease: a multimodality review. *Abdominal imaging*. 2014.
49. Steen VD, Medsger TA, Jr., Osial TA, Jr., Ziegler GL, Shapiro AP, Rodnan GP. Factors predicting development of renal involvement in progressive systemic sclerosis. *The American journal of medicine*. 1984;76(5):779-86.
50. Steen VD, Medsger TA, Jr. Severe organ involvement in systemic sclerosis with diffuse scleroderma. *Arthritis and rheumatism*. 2000;43(11):2437-44.
51. Guillemin L, Mouthon L. Scleroderma Renal Crisis. *Rheumatic diseases clinics of North America*. 2015;41(3):475-88.
52. Visconti L, Atteritano M, Buemi M, Santoro D. [Renal and extra-renal involvement in scleroderma]. *Giornale italiano di nefrologia : organo ufficiale della Societa italiana di nefrologia*. 2014;31(5).
53. Lam AP, Gottardi CJ. beta-catenin signaling: a novel mediator of fibrosis and potential therapeutic target. *Current opinion in rheumatology*. 2011;23(6):562-7.

54. Distler O, Pap T, Kowal-Bielecka O, Meyringer R, Guiducci S, Landthaler M, et al. Overexpression of monocyte chemoattractant protein 1 in systemic sclerosis: role of platelet-derived growth factor and effects on monocyte chemotaxis and collagen synthesis. *Arthritis and rheumatism*. 2001;44(11):2665-78.
55. Hunzelmann N, Brinckmann J. What are the new milestones in the pathogenesis of systemic sclerosis? *Annals of the rheumatic diseases*. 2010;69 Suppl 1:i52-6.
56. Charles C, Clements P, Furst DE. Systemic sclerosis: hypothesis-driven treatment strategies. *Lancet*. 2006;367(9523):1683-91.
57. Kraling BM, Maul GG, Jimenez SA. Mononuclear cellular infiltrates in clinically involved skin from patients with systemic sclerosis of recent onset predominantly consist of monocytes/macrophages. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*. 1995;63(1):48-56.
58. Hasegawa M, Sato S, Takehara K. Augmented production of chemokines (monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) and MIP-1beta) in patients with systemic sclerosis: MCP-1 and MIP-1alpha may be involved in the development of pulmonary fibrosis. *Clinical and experimental immunology*. 1999;117(1):159-65.
59. Eckes B, Zigrino P, Kessler D, Holtkotter O, Shephard P, Mauch C, et al. Fibroblast-matrix interactions in wound healing and fibrosis. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2000;19(4):325-32.
60. Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *The Journal of pathology*. 2003;200(4):500-3.
61. Wei J, Bhattacharyya S, Tourtellotte WG, Varga J. Fibrosis in systemic sclerosis: emerging concepts and implications for targeted therapy. *Autoimmunity reviews*. 2011;10(5):267-75.
62. Manno R, Boin F. Immunotherapy of systemic sclerosis. *Immunotherapy*. 2010;2(6):863-78.
63. Chen Y, Shi-Wen X, van Beek J, Kennedy L, McLeod M, Renzoni EA, et al. Matrix contraction by dermal fibroblasts requires transforming growth factor-beta/activin-linked kinase 5, heparan sulfate-containing proteoglycans, and MEK/ERK: insights into pathological scarring in chronic fibrotic disease. *The American journal of pathology*. 2005;167(6):1699-711.
64. Whitfield ML, Finlay DR, Murray JI, Troyanskaya OG, Chi JT, Pergamenschikov A, et al. Systemic and cell type-specific gene expression patterns in scleroderma skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(21):12319-24.
65. Rajkumar VS, Howell K, Csiszar K, Denton CP, Black CM, Abraham DJ. Shared expression of phenotypic markers in systemic sclerosis indicates a convergence of pericytes and fibroblasts to a myofibroblast lineage in fibrosis. *Arthritis research & therapy*. 2005;7(5):R1113-23.
66. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *The American journal of pathology*. 2007;170(6):1807-16.
67. Abraham DJ, Eckes B, Rajkumar V, Krieg T. New developments in fibroblast and myofibroblast biology: implications for fibrosis and scleroderma. *Current rheumatology reports*. 2007;9(2):136-43.

68. Liu S, Taghavi R, Leask A. Connective tissue growth factor is induced in bleomycin-induced skin scleroderma. *Journal of cell communication and signaling*. 2010;4(1):25-30.
69. Willis BC, duBois RM, Borok Z. Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2006;3(4):377-82.
70. Kuwana M, Okazaki Y, Yasuoka H, Kawakami Y, Ikeda Y. Defective vasculogenesis in systemic sclerosis. *Lancet*. 2004;364(9434):603-10.
71. Allanore Y, Batteux F, Avouac J, Assous N, Weill B, Kahan A. Levels of circulating endothelial progenitor cells in systemic sclerosis. *Clinical and experimental rheumatology*. 2007;25(1):60-6.
72. Bellini A, Mattoli S. The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2007;87(9):858-70.
73. Distler JH, Jungel A, Pilecky M, Zwerina J, Michel BA, Gay RE, et al. Hypoxia-induced increase in the production of extracellular matrix proteins in systemic sclerosis. *Arthritis and rheumatism*. 2007;56(12):4203-15.
74. Hong KH, Yoo SA, Kang SS, Choi JJ, Kim WU, Cho CS. Hypoxia induces expression of connective tissue growth factor in scleroderma skin fibroblasts. *Clinical and experimental immunology*. 2006;146(2):362-70.
75. Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, Shrimanker N, Akai Y, Hohenstein B, et al. Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(12):3810-20.
76. Baraut J, Michel L, Verrecchia F, Farge D. Relationship between cytokine profiles and clinical outcomes in patients with systemic sclerosis. *Autoimmunity reviews*. 2010;10(2):65-73.
77. Chizzolini C, Brembilla NC, Montanari E, Truchetet ME. Fibrosis and immune dysregulation in systemic sclerosis. *Autoimmunity reviews*. 2011;10(5):276-81.
78. Matsushita T, Hasegawa M, Hamaguchi Y, Takehara K, Sato S. Longitudinal analysis of serum cytokine concentrations in systemic sclerosis: association of interleukin 12 elevation with spontaneous regression of skin sclerosis. *The Journal of rheumatology*. 2006;33(2):275-84.
79. Postlethwaite AE, Holness MA, Katai H, Raghoebar R. Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix proteins in response to interleukin 4. *The Journal of clinical investigation*. 1992;90(4):1479-85.
80. Hasegawa M, Fujimoto M, Kikuchi K, Takehara K. Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. *The Journal of rheumatology*. 1997;24(2):328-32.
81. Sakkas LI, Tourtellotte C, Berney S, Myers AR, Plattsoucas CD. Increased levels of alternatively spliced interleukin 4 (IL-4delta2) transcripts in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic sclerosis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 1999;6(5):660-4.
82. Salmon-Ehr V, Serpier H, Nawrocki B, Gillery P, Clavel C, Kalis B, et al. Expression of interleukin-4 in scleroderma skin specimens and scleroderma fibroblast cultures. Potential role in fibrosis. *Archives of dermatology*. 1996;132(7):802-6.

83. Gourh P, Arnett FC, Assassi S, Tan FK, Huang M, Diekman L, et al. Plasma cytokine profiles in systemic sclerosis: associations with autoantibody subsets and clinical manifestations. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(5):R147.
84. Fichtner-Feigl S, Fuss IJ, Young CA, Watanabe T, Geissler EK, Schlitt HJ, et al. Induction of IL-13 triggers TGF-beta1-dependent tissue fibrosis in chronic 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid colitis. *Journal of immunology*. 2007;178(9):5859-70.
85. Jinnin M, Ihn H, Yamane K, Tamaki K. Interleukin-13 stimulates the transcription of the human alpha2(I) collagen gene in human dermal fibroblasts. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(40):41783-91.
86. Medsger TA, Jr., Ivanco DE, Kardava L, Morel PA, Lucas MR, Fuschiotti P. GATA-3 up-regulation in CD8+ T cells as a biomarker of immune dysfunction in systemic sclerosis, resulting in excessive interleukin-13 production. *Arthritis and rheumatism*. 2011;63(6):1738-47.
87. Kurasawa K, Hirose K, Sano H, Endo H, Shinkai H, Nawata Y, et al. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis and rheumatism*. 2000;43(11):2455-63.
88. Murata M, Fujimoto M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K, et al. Clinical association of serum interleukin-17 levels in systemic sclerosis: is systemic sclerosis a Th17 disease? *J Dermatol Sci*. 50. Netherlands2008. p. 240-2.
89. Komura K, Fujimoto M, Hasegawa M, Ogawa F, Hara T, Muroi E, et al. Increased serum interleukin 23 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2008;35(1):120-5.
90. Gu YS, Kong J, Cheema GS, Keen CL, Wick G, Gershwin ME. The immunobiology of systemic sclerosis. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2008;38(2):132-60.
91. Scala E, Pallotta S, Frezzolini A, Abeni D, Barbieri C, Sampogna F, et al. Cytokine and chemokine levels in systemic sclerosis: relationship with cutaneous and internal organ involvement. *Clinical and experimental immunology*. 2004;138(3):540-6.
92. Radstake TR, van Bon L, Broen J, Hussiani A, Hesselstrand R, Wuttge DM, et al. The pronounced Th17 profile in systemic sclerosis (SSc) together with intracellular expression of TGFbeta and IFNgamma distinguishes SSc phenotypes. *PloS one*. 2009;4(6):e5903.
93. Hussein MR, Hassan HI, Hofny ER, Elkholy M, Fatehy NA, Abd Elmoniem AE, et al. Alterations of mononuclear inflammatory cells, CD4/CD8+ T cells, interleukin 1beta, and tumour necrosis factor alpha in the bronchoalveolar lavage fluid, peripheral blood, and skin of patients with systemic sclerosis. *J Clin Pathol*. 2005;58(2):178-84.
94. Schmidt K, Martinez-Gamboa L, Meier S, Witt C, Meisel C, Hanitsch LG, et al. Bronchoalveolar lavage fluid cytokines and chemokines as markers and predictors for the outcome of interstitial lung disease in systemic sclerosis patients. *Arthritis research & therapy*. 2009;11(4):R111.
95. Pehlivan Y, Onat AM, Ceylan N, Turkbeyler IH, Buyukhatipoglu H, Comez G, et al. Serum leptin, resistin and TNF-alpha levels in patients with systemic sclerosis: the role of adipokines in scleroderma. *Int J Rheum Dis*. 2012;15(4):374-9.
96. Murata M, Fujimoto M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K, et al. Clinical association of serum interleukin-17 levels in systemic sclerosis: is systemic sclerosis a Th17 disease? *Journal of dermatological science*. 2008;50(3):240-2.

97. Koch AE, Kronfeld-Harrington LB, Szekanecz Z, Cho MM, Haines GK, Harlow LA, et al. In situ expression of cytokines and cellular adhesion molecules in the skin of patients with systemic sclerosis. Their role in early and late disease. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*. 1993;61(5-6):239-46.
98. Kantor TV, Friberg D, Medsger TA, Jr., Buckingham RB, Whiteside TL. Cytokine production and serum levels in systemic sclerosis. *Clin Immunol Immunopathol*. 1992;65(3):278-85.
99. Hugel T, O'Reilly S, Simpson R, Kraaij MD, Bigley V, Collin M, et al. Tumor necrosis factor-costimulated T lymphocytes from patients with systemic sclerosis trigger collagen production in fibroblasts. *Arthritis and rheumatism*. 2013;65(2):481-91.
100. Chizzolini C, Rezzonico R, De Luca C, Burger D, Dayer JM. Th2 cell membrane factors in association with IL-4 enhance matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) while decreasing MMP-9 production by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-differentiated human monocytes. *Journal of immunology*. 2000;164(11):5952-60.
101. Takeda K, Hatamochi A, Arakawa M, Ueki H. Effects of tumor necrosis factor-alpha on connective tissue metabolism in normal and scleroderma fibroblast cultures. *Arch Dermatol Res*. 1993;284(8):440-4.
102. Brembilla NC, Dufour AM, Alvarez M, Hugues S, Montanari E, Truchetet ME, et al. IL-22 capacitates dermal fibroblast responses to TNF in scleroderma. *Annals of the rheumatic diseases*. 2016;75(9):1697-705.
103. Ghosh AK. Factors involved in the regulation of type I collagen gene expression: implication in fibrosis. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2002;227(5):301-14.
104. Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(16):9558-63.
105. Wilson MS, Elnekave E, Mentink-Kane MM, Hodges MG, Pesce JT, Ramalingam TR, et al. IL-13 α 2 and IL-10 coordinately suppress airway inflammation, airway-hyperreactivity, and fibrosis in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(10):2941-51.
106. Papp G, Horvath IF, Barath S, Gyimesi E, Sipka S, Szodoray P, et al. Altered T-cell and regulatory cell repertoire in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Scandinavian journal of rheumatology*. 2011;40(3):205-10.
107. Antiga E, Quaglini P, Bellandi S, Volpi W, Del Bianco E, Comessatti A, et al. Regulatory T cells in the skin lesions and blood of patients with systemic sclerosis and morphea. *Br J Dermatol*. 2010;162(5):1056-63.
108. Radstake TR, van Bon L, Broen J, Wenink M, Santegoets K, Deng Y, et al. Increased frequency and compromised function of T regulatory cells in systemic sclerosis (SSc) is related to a diminished CD69 and TGF β expression. *PloS one*. 2009;4(6):e5981.
109. Edme JL, Tellart AS, Launay D, Nevriere R, Grutzmacher C, Boulenguez C, et al. Cytokine concentrations in exhaled breath condensates in systemic sclerosis. *Inflamm Res*. 2008;57(4):151-6.
110. Diaz-Gallo LM, Simeon CP, Broen JC, Ortego-Centeno N, Beretta L, Vonk MC, et al. Implication of IL-2/IL-21 region in systemic sclerosis genetic susceptibility. *Annals of the rheumatic diseases*. 2013;72(7):1233-8.

111. Wang H, Hou L, Kwak D, Fassett J, Xu X, Chen A, et al. Increasing Regulatory T Cells With Interleukin-2 and Interleukin-2 Antibody Complexes Attenuates Lung Inflammation and Heart Failure Progression. *Hypertension*. 2016;68(1):114-22.
112. Yamanouchi J, Rainbow D, Serra P, Howlett S, Hunter K, Garner VE, et al. Interleukin-2 gene variation impairs regulatory T cell function and causes autoimmunity. *Nature genetics*. 2007;39(3):329-37.
113. Kok HM, van den Hoogen LL, van Roon JAG, Adriaansen EJM, Fritsch-Stork RDE, Nguyen TQ, et al. Systemic and local granzyme B levels are associated with disease activity, kidney damage and interferon signature in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*. 2017.
114. Duan H, Fleming J, Pritchard DK, Amon LM, Xue J, Arnett HA, et al. Combined analysis of monocyte and lymphocyte messenger RNA expression with serum protein profiles in patients with scleroderma. *Arthritis and rheumatism*. 2008;58(5):1465-74.
115. Dieude P, Guedj M, Wipff J, Avouac J, Fajardy I, Diot E, et al. Association between the IRF5 rs2004640 functional polymorphism and systemic sclerosis: a new perspective for pulmonary fibrosis. *Arthritis and rheumatism*. 2009;60(1):225-33.
116. Lindahl GE, Stock CJ, Shi-Wen X, Leoni P, Sestini P, Howat SL, et al. Microarray profiling reveals suppressed interferon stimulated gene program in fibroblasts from scleroderma-associated interstitial lung disease. *Respiratory research*. 2013;14:80.
117. Poosti F, Bansal R, Yazdani S, Prakash J, Post E, Klok P, et al. Selective delivery of IFN-gamma to renal interstitial myofibroblasts: a novel strategy for the treatment of renal fibrosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2014.
118. Weaver CT, Elson CO, Fouser LA, Kolls JK. The Th17 pathway and inflammatory diseases of the intestines, lungs, and skin. *Annual review of pathology*. 2013;8:477-512.
119. Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *The New England journal of medicine*. 2009;361(9):888-98.
120. Brembilla NC, Montanari E, Truchetet ME, Raschi E, Meroni P, Chizzolini C. Th17 cells favor inflammatory responses while inhibiting type I collagen deposition by dermal fibroblasts: differential effects in healthy and systemic sclerosis fibroblasts. *Arthritis research & therapy*. 2013;15(5):R151.
121. Duhon T, Geiger R, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nature immunology*. 2009;10(8):857-63.
122. Trifari S, Kaplan CD, Tran EH, Crellin NK, Spits H. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nature immunology*. 2009;10(8):864-71.
123. Wilson MS, Madala SK, Ramalingam TR, Gochuico BR, Rosas IO, Cheever AW, et al. Bleomycin and IL-1beta-mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. *The Journal of experimental medicine*. 2010;207(3):535-52.
124. Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*. 2006;126(6):1121-33.

125. Eberl G, Littman DR. The role of the nuclear hormone receptor ROR γ in the development of lymph nodes and Peyer's patches. *Immunological reviews*. 2003;195:81-90.
126. Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(8):556-67.
127. Aggarwal S, Gurney AL. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J Leukoc Biol*. 2002;71(1):1-8.
128. Nakashima T, Jinnin M, Yamane K, Honda N, Kajihara I, Makino T, et al. Impaired IL-17 signaling pathway contributes to the increased collagen expression in scleroderma fibroblasts. *Journal of immunology*. 2012;188(8):3573-83.
129. Hayashi H, Kawakita A, Okazaki S, Yasutomi M, Murai H, Ohshima Y. IL-17A/F modulates fibrocyte functions in cooperation with CD40-mediated signaling. *Inflammation*. 2013;36(4):830-8.
130. Okamoto Y, Hasegawa M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Huu DL, Iwakura Y, et al. Potential roles of interleukin-17A in the development of skin fibrosis in mice. *Arthritis and rheumatism*. 2012;64(11):3726-35.
131. Agarwal S, Misra R, Aggarwal A. Interleukin 17 levels are increased in juvenile idiopathic arthritis synovial fluid and induce synovial fibroblasts to produce proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases. *The Journal of rheumatology*. 2008;35(3):515-9.
132. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *The Journal of experimental medicine*. 1996;183(6):2593-603.
133. Truchetet ME, Brembilla NC, Montanari E, Lonati P, Raschi E, Zeni S, et al. Interleukin-17A+ cell counts are increased in systemic sclerosis skin and their number is inversely correlated with the extent of skin involvement. *Arthritis and rheumatism*. 2013;65(5):1347-56.
134. Baraut J, Farge D, Jean-Louis F, Kesmandt H, Durant C, Verrecchia F, et al. [Cytokines in systemic sclerosis]. *Pathol Biol (Paris)*. 2012;60(2):127-39.
135. Zurawski G, de Vries JE. Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. *Immunology today*. 1994;15(1):19-26.
136. Burd PR, Thompson WC, Max EE, Mills FC. Activated mast cells produce interleukin 13. *The Journal of experimental medicine*. 1995;181(4):1373-80.
137. Fuschiotti P, Larregina AT, Ho J, Feghali-Bostwick C, Medsger TA, Jr. Interleukin-13-producing CD8+ T cells mediate dermal fibrosis in patients with systemic sclerosis. *Arthritis and rheumatism*. 2013;65(1):236-46.
138. de Waal Malefyt R, Figdor CG, Huijbens R, Mohan-Peterson S, Bennett B, Culpepper J, et al. Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN- γ or IL-10. *Journal of immunology*. 1993;151(11):6370-81.
139. McKenzie AN, Culpepper JA, de Waal Malefyt R, Briere F, Punnonen J, Aversa G, et al. Interleukin 13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(8):3735-9.
140. Minty A, Chalon P, Derocq JM, Dumont X, Guillemot JC, Kaghad M, et al. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature*. 1993;362(6417):248-50.

141. Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, McKenzie AN, Menon S, Zurawski G, et al. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(8):3730-4.
142. Defrance T, Carayon P, Billian G, Guillemot JC, Minty A, Caput D, et al. Interleukin 13 is a B cell stimulating factor. *The Journal of experimental medicine*. 1994;179(1):135-43.
143. Corry DB. IL-13 in allergy: home at last. *Current opinion in immunology*. 1999;11(6):610-4.
144. McMahan ZH, Wigley FM. Novel investigational agents for the treatment of scleroderma. *Expert opinion on investigational drugs*. 2014;23(2):183-98.
145. Zheng T, Oh MH, Oh SY, Schroeder JT, Glick AB, Zhu Z. Transgenic expression of interleukin-13 in the skin induces a pruritic dermatitis and skin remodeling. *The Journal of investigative dermatology*. 2009;129(3):742-51.
146. Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J, et al. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *The Journal of clinical investigation*. 1999;103(6):779-88.
147. Chiamonte MG, Donaldson DD, Cheever AW, Wynn TA. An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. *The Journal of clinical investigation*. 1999;104(6):777-85.
148. Fallon PG, Richardson EJ, McKenzie GJ, McKenzie AN. Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. *Journal of immunology*. 2000;164(5):2585-91.
149. Doucet C, Brouty-Boye D, Pottin-Clemenceau C, Canonica GW, Jasmin C, Azzarone B. Interleukin (IL) 4 and IL-13 act on human lung fibroblasts. Implication in asthma. *The Journal of clinical investigation*. 1998;101(10):2129-39.
150. Rankin AL, Mumm JB, Murphy E, Turner S, Yu N, McClanahan TK, et al. IL-33 induces IL-13-dependent cutaneous fibrosis. *Journal of immunology*. 2010;184(3):1526-35.
151. Sturgill J, McGee E, Menzies V. Unique cytokine signature in the plasma of patients with fibromyalgia. *Journal of immunology research*. 2014;2014:938576.
152. Karam MC, Merckbawi R, El-Kouba JE, Bazzi SI, Bodman-Smith KB. In *Leishmania* major-induced inflammation, interleukin-13 reduces hyperalgesia, down-regulates IL-1beta and up-regulates IL-6 in an IL-4 independent mechanism. *Experimental parasitology*. 2013;134(2):200-5.
153. de Oliveira CM, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomao R. Cytokines and pain. *Revista brasileira de anesthesiologia*. 2011;61(2):255-9, 60-5, 137-42.
154. Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T. Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunology today*. 1990;11(12):443-9.
155. Muangchan C, Pope JE. Interleukin 6 in systemic sclerosis and potential implications for targeted therapy. *The Journal of rheumatology*. 2012;39(6):1120-4.
156. Sfrent-Cornateanu R, Mihai C, Balan S, Ionescu R, Moldoveanu E. The IL-6 promoter polymorphism is associated with disease activity and disability in systemic sclerosis. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2006;10(4):955-9.
157. Bodolay E, Koch AE, Kim J, Szegedi G, Szekanecz Z. Angiogenesis and chemokines in rheumatoid arthritis and other systemic inflammatory rheumatic diseases. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2002;6(3):357-76.

158. Hasegawa M, Sato S, Fujimoto M, Ihn H, Kikuchi K, Takehara K. Serum levels of interleukin 6 (IL-6), oncostatin M, soluble IL-6 receptor, and soluble gp130 in patients with systemic sclerosis. *The Journal of rheumatology*. 1998;25(2):308-13.
159. Sato S, Hasegawa M, Takehara K. Serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 correlate with total skin thickness score in patients with systemic sclerosis. *Journal of dermatological science*. 2001;27(2):140-6.
160. Wu M, Melichian DS, Chang E, Warner-Blankenship M, Ghosh AK, Varga J. Rosiglitazone abrogates bleomycin-induced scleroderma and blocks profibrotic responses through peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *The American journal of pathology*. 2009;174(2):519-33.
161. Bagnato G, Bitto A, Pizzino G, Irrera N, Sangari D, Cinquegrani M, et al. Simvastatin attenuates the development of pulmonary and cutaneous fibrosis in a murine model of systemic sclerosis. *Rheumatology*. 2013;52(8):1377-86.
162. Blom IE, Goldschmeding R, Leask A. Gene regulation of connective tissue growth factor: new targets for antifibrotic therapy? *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2002;21(6):473-82.
163. Baron M. Targeted Therapy in Systemic Sclerosis. *Rambam Maimonides Med J*. 2016;7(4).
164. Zhang X, Jin J, Peng X, Ramgolam VS, Markovic-Plese S. Simvastatin inhibits IL-17 secretion by targeting multiple IL-17-regulatory cytokines and by inhibiting the expression of IL-17 transcription factor RORC in CD4+ lymphocytes. *Journal of immunology*. 2008;180(10):6988-96.
165. Garcia-Sabina A, Gulin-Davila J, Sempere-Serrano P, Gonzalez-Juanatey C, Martinez-Pacheco R. [Specific considerations on the prescription and therapeutic interchange of statins]. *Farm Hosp*. 2012;36(2):97-108.
166. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*. 1990;343(6257):425-30.
167. Soriano A, Afeltra A, Shoenfeld Y. Is atherosclerosis accelerated in systemic sclerosis? Novel insights. *Current opinion in rheumatology*. 2014;26(6):653-7.
168. Man A, Zhu Y, Zhang Y, Dubreuil M, Rho YH, Peloquin C, et al. The risk of cardiovascular disease in systemic sclerosis: a population-based cohort study. *Annals of the rheumatic diseases*. 2013;72(7):1188-93.
169. Ngian GS, Sahhar J, Proudman SM, Stevens W, Wicks IP, Van Doornum S. Prevalence of coronary heart disease and cardiovascular risk factors in a national cross-sectional cohort study of systemic sclerosis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2012;71(12):1980-3.
170. Khattri S, Zandman-Goddard G. Statins and autoimmunity. *Immunologic research*. 2013;56(2-3):348-57.
171. Dombrecht EJ, Van Offel JF, Bridts CH, Ebo DG, Seynhaeve V, Schuerwegh AJ, et al. Influence of simvastatin on the production of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide by activated human chondrocytes. *Clinical and experimental rheumatology*. 2007;25(4):534-9.
172. Gouveia TL, Scorza FA, Iha HA, Frangiotti MI, Perosa SR, Cavalheiro EA, et al. Lovastatin decreases the synthesis of inflammatory mediators during epileptogenesis in the hippocampus of rats submitted to pilocarpine-induced epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2014;36:68-73.
173. Mouawad CA, Mrad MF, El-Achkar GA, Abdul-Sater A, Nemer GM, Creminon C, et al. Statins Modulate Cyclooxygenase-2 and Microsomal Prostaglandin E

- Synthase-1 in Human Hepatic Myofibroblasts. *J Cell Biochem.* 2016;117(5):1176-86.
174. Mason RP, Corbalan JJ, Jacob RF, Dawoud H, Malinski T. Atorvastatin enhanced nitric oxide release and reduced blood pressure, nitroxidative stress and rantes levels in hypertensive rats with diabetes. *J Physiol Pharmacol.* 2015;66(1):65-72.
175. Tristano AG, Fuller K. Immunomodulatory effects of statins and autoimmune rheumatic diseases: novel intracellular mechanism involved. *International immunopharmacology.* 2006;6(12):1833-46.
176. Holstein SA, Wohlford-Lenane CL, Hohl RJ. Consequences of mevalonate depletion. Differential transcriptional, translational, and post-translational up-regulation of Ras, Rap1a, RhoA, AND RhoB. *The Journal of biological chemistry.* 2002;277(12):10678-82.
177. Louneva N, Huaman G, Fertala J, Jimenez SA. Inhibition of systemic sclerosis dermal fibroblast type I collagen production and gene expression by simvastatin. *Arthritis and rheumatism.* 2006;54(4):1298-308.
178. Rosenbloom J, Saitta B, Gaidarova S, Sandorfi N, Rosenbloom JC, Abrams WR, et al. Inhibition of type I collagen gene expression in normal and systemic sclerosis fibroblasts by a specific inhibitor of geranylgeranyl transferase I. *Arthritis and rheumatism.* 2000;43(7):1624-32.
179. Yang T, Chen M, Sun T. Simvastatin attenuates TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in human alveolar epithelial cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology.* 2013;31(6):863-74.
180. Kim JW, Rhee CK, Kim TJ, Kim YH, Lee SH, Yoon HK, et al. Effect of pravastatin on bleomycin-induced acute lung injury and pulmonary fibrosis. *Clinical and experimental pharmacology & physiology.* 2010;37(11):1055-63.
181. Zhu B, Ma AQ, Yang L, Dang XM. Atorvastatin attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via suppressing iNOS expression and the CTGF (CCN2)/ERK signaling pathway. *International journal of molecular sciences.* 2013;14(12):24476-91.
182. Tulek B, Kiyan E, Kiyici A, Toy H, Bariskaner H, Suerdem M. Effects of simvastatin on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in female rats. *Biological research.* 2012;45(4):345-50.
183. Pereira MC, Cardoso PR, Da Rocha LF, Jr., Rego MJ, Goncalves SM, Santos FA, et al. Simvastatin inhibits cytokines in a dose response in patients with rheumatoid arthritis. *Inflamm Res.* 2014;63(4):309-15.
184. Bessler H, Salman H, Bergman M, Straussberg R, Djaldetti M. In vitro effect of statins on cytokine production and mitogen response of human peripheral blood mononuclear cells. *Clin Immunol.* 2005;117(1):73-7.
185. Ascer E, Bertolami MC, Venturinelli ML, Buccheri V, Souza J, Nicolau JC, et al. Atorvastatin reduces proinflammatory markers in hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis.* 2004;177(1):161-6.
186. Li H, Li X, Duan L, Li C. Inhibition of lovastatin on proliferation and expression of proinflammatory cytokines in cultured human glomerular mesangial cells. *Chinese medical journal.* 2003;116(9):1366-9.
187. Inoue I, Goto S, Mizotani K, Awata T, Mastunaga T, Kawai S, et al. Lipophilic HMG-CoA reductase inhibitor has an anti-inflammatory effect: reduction of mRNA levels for interleukin-1beta, interleukin-6, cyclooxygenase-2, and p22phox by

regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in primary endothelial cells. *Life Sci.* 2000;67(8):863-76.

188. Cheng SM, Lai JH, Yang SP, Tsao TP, Ho LJ, Liou JT, et al. Modulation of human T cells signaling transduction by lovastatin. *Int J Cardiol.* 2010;140(1):24-33.

189. Cherfan P, Tompa A, Wikby A, Lofgren S, Jonasson L. Effects of simvastatin on human T cells in vivo. *Atherosclerosis.* 2007;193(1):186-92.

190. Okopien B, Krysiak R, Kowalski J, Madej A, Belowski D, Zielinski M, et al. The effect of statins and fibrates on interferon-gamma and interleukin-2 release in patients with primary type II dyslipidemia. *Atherosclerosis.* 2004;176(2):327-35.

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

192. Zhang J, Osawa S, Takayanagi Y, Ikuma M, Yamada T, Sugimoto M, et al. Statins directly suppress cytokine production in murine intraepithelial lymphocytes. *Cytokine.* 2013;61(2):540-5.

193. Youssef S, Stuve O, Patarroyo JC, Ruiz PJ, Radosевич JL, Hur EM, et al. The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease. *Nature.* 2002;420(6911):78-84.

194. Leung BP, Sattar N, Crilly A, Prach M, McCarey DW, Payne H, et al. A novel anti-inflammatory role for simvastatin in inflammatory arthritis. *Journal of immunology.* 2003;170(3):1524-30.

195. Ghittoni R, Lazzerini PE, Pasini FL, Baldari CT. T lymphocytes as targets of statins: molecular mechanisms and therapeutic perspectives. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2007;6(1):3-16.

196. Rossi M, Bazzichi L, Ghiadoni L, Mencaroni I, Franzoni F, Bombardieri S. Increased finger skin vasoreactivity and stimulated vasomotion associated with simvastatin therapy in systemic sclerosis hypercholesterolemic patients. *Rheumatol Int.* 2012;32(12):3715-21.

197. Alekperov RT, Korzeneva EG, Aleksandrova EN, Novikov AA, Anan'eva LP. [Pleiotropic effects of statins in systemic sclerosis]. *Ter Arkh.* 2011;83(5):41-7.

198. Kuwana M, Okazaki Y, Kaburaki J. Long-term beneficial effects of statins on vascular manifestations in patients with systemic sclerosis. *Mod Rheumatol.* 2009;19(5):530-5.

199. Abou-Raya A, Abou-Raya S, Helmii M. Statins: potentially useful in therapy of systemic sclerosis-related Raynaud's phenomenon and digital ulcers. *The Journal of rheumatology.* 2008;35(9):1801-8.

200. Blagojevic J, Matucci-Cerinic M. Are statins useful for treating vascular involvement in systemic sclerosis? *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2009;5(2):70-1.

201. Del Papa N, Cortiana M, Vitali C, Silvestris I, Maglione W, Comina DP, et al. Simvastatin reduces endothelial activation and damage but is partially ineffective in inducing endothelial repair in systemic sclerosis. *The Journal of rheumatology.* 2008;35(7):1323-8.

202. Abou-Raya A, Abou-Raya S, Helmii M. Statins as immunomodulators in systemic sclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2007;1110:670-80.

203. Kuwana M, Kaburaki J, Okazaki Y, Yasuoka H, Kawakami Y, Ikeda Y. Increase in circulating endothelial precursors by atorvastatin in patients with systemic sclerosis. *Arthritis and rheumatism*. 2006;54(6):1946-51.
204. Bolster MB, Ludwicka A, Sutherland SE, Strange C, Silver RM. Cytokine concentrations in bronchoalveolar lavage fluid of patients with systemic sclerosis. *Arthritis and rheumatism*. 1997;40(4):743-51.
205. De Lauretis A, Sestini P, Pantelidis P, Hoyles R, Hansell DM, Goh NS, et al. Serum interleukin 6 is predictive of early functional decline and mortality in interstitial lung disease associated with systemic sclerosis. *The Journal of rheumatology*. 2013;40(4):435-46.



APÊNDICE A FICHA CLÍNICA Nº1

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS
SERVIÇO DE REUMATOLOGIA
AMBULATÓRIO DE PESQUISA CLÍNICA
FICHA CLÍNICA ESCLEROSE SISTÊMICA**

IDENTIFICAÇÃO			
1. Número da Ficha 	2. Data de preenchimento ____/____/____	3. Registro HC 	
4. Nome do paciente		5. Sexo 1. Masculino ☐ 2. Feminino ☐	
6. Data de Nascimento ____/____/____	7. Idade (anos) 	8. Raça 1. Branca ☐ 2. Negra ☐ 3. Parda ☐ 4. Indígena ☐ 5. Amarela ☐	
9. Endereço _____ _____			
10. Telefone () ____ / () ____		11. Naturalidade _____	
12. Procedência (cidade) _____		1. Litoral ☐ 2. Zona da Mata ☐ 3. Agreste ☐ 4. Sertão ☐	
13. Ocupação: _____			
13.1 Em atividade 1. Sim 2. Não ☐		13.2 Desempregado 1. Sim 2. Não ☐	
13.3 Em benefício 1. Sim 2. Não ☐			
14. Renda Familiar (soma dos moradores do mesmo domicílio) R\$ _____		15. Escolaridade (anos estudados) _____ 	
CLASSIFICAÇÃO			
16. Forma Clínica 1. Cutânea Limitada ☐ 2. Cutânea Difusa ☐ 3. Sine Escleroderma ☐ 4. Overlap: _____ 5. Localizada (EXCLUIR) ☐			
DIAGNÓSTICO / HISTÓRIA CLÍNICA			
17. Data de início do FRy ____/____/____ 17.1 Δt (meses)	18. Data de início dos sintomas não-FRy ____/____/____ 18.1 Δt (meses)	19. Data do diagnóstico ____/____/____ 19.1 Δt (meses)	
20. Sintomas iniciais 20.1 Fenômeno de Raynaud 1. Sim ☐ 2. Não ☐		20.2 Sintoma não-FRy inicial 1. Pele ☐ 2. Articular ☐ 3. Pulmonar ☐ 4. Gastrointestinal ☐ 5. Outros: _____	



**HOSPITAL DAS CLÍNICAS
SERVIÇO DE REUMATOLOGIA
AMBULATÓRIO DE PESQUISA CLÍNICA
FICHA CLÍNICA ESCLEROSE SISTÊMICA**

21. Critérios Classificatórios																			
21.1 ACR, 1980		1. Sim	☐																
		2. Não																	
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td colspan="2">Critério maior</td></tr> <tr><td colspan="2">() Esclerodermia proximal</td></tr> <tr><td colspan="2">Critérios menores</td></tr> <tr><td colspan="2">() Esclerodactilia</td></tr> <tr><td colspan="2">() Cicatrizes digitais ou perda da gordura subcutânea dos dedos</td></tr> <tr><td colspan="2">() Fibrose pulmonar bibasal</td></tr> <tr><td colspan="2">1 Maior + 2 Menores</td></tr> </table>				Critério maior		() Esclerodermia proximal		Critérios menores		() Esclerodactilia		() Cicatrizes digitais ou perda da gordura subcutânea dos dedos		() Fibrose pulmonar bibasal		1 Maior + 2 Menores			
Critério maior																			
() Esclerodermia proximal																			
Critérios menores																			
() Esclerodactilia																			
() Cicatrizes digitais ou perda da gordura subcutânea dos dedos																			
() Fibrose pulmonar bibasal																			
1 Maior + 2 Menores																			
22.2 Esclerose Sistêmica Precoce (LeRoy e Medsger, 2001)																			
		1. Sim	☐																
		2. Não																	
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Critérios Maiores</td> <td style="width: 50%;">Critérios Menores</td> </tr> <tr> <td>() Fenômeno de Raynaud</td> <td>() Calcinose</td> </tr> <tr> <td>() Autoanticorpos (FAN, Anti Centromero, anti Scl70)</td> <td>() Edema dos dedos</td> </tr> <tr> <td>() Videocapilaroscopia ungueal</td> <td>() Úlceras digitais</td> </tr> <tr> <td></td> <td>() Disfunção do esfíncter esofágico inferior</td> </tr> <tr> <td></td> <td>() Telangiectasias</td> </tr> <tr> <td></td> <td>() TC de alta resolução – vidro fosco</td> </tr> <tr> <td colspan="2">3 Maiores ou 1 Maior + 2 Menores</td> </tr> </table>				Critérios Maiores	Critérios Menores	() Fenômeno de Raynaud	() Calcinose	() Autoanticorpos (FAN, Anti Centromero, anti Scl70)	() Edema dos dedos	() Videocapilaroscopia ungueal	() Úlceras digitais		() Disfunção do esfíncter esofágico inferior		() Telangiectasias		() TC de alta resolução – vidro fosco	3 Maiores ou 1 Maior + 2 Menores	
Critérios Maiores	Critérios Menores																		
() Fenômeno de Raynaud	() Calcinose																		
() Autoanticorpos (FAN, Anti Centromero, anti Scl70)	() Edema dos dedos																		
() Videocapilaroscopia ungueal	() Úlceras digitais																		
	() Disfunção do esfíncter esofágico inferior																		
	() Telangiectasias																		
	() TC de alta resolução – vidro fosco																		
3 Maiores ou 1 Maior + 2 Menores																			
23. Fatores de Risco/ Exposição																			
1. Sim 2. Não 3. Não sabe informar																			
23.1 Parente 1º grau com ES?	☐	23.2 Parente 1º grau com DRAI? (Especificar)	☐																
23.3 Exposição a sílica?	☐	23.4 Exposição a metais pesados?	☐																
23.5 Exposição a derivados de petróleo?	☐	23.6 Uso de inibidor do apetite? (Especificar)	☐																
23.7 Quimioterapia prévia? (Especificar)	☐	23.8 Uso de drogas ilícitas? (Especificar)	☐																
MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS																			
MANIFESTAÇÕES GERAIS																			
1. Sim - presente 2. Sim – passado 3. Não 4. Não avaliado 5. Não se aplica 6. Não sabe informar																			
24. Perda de peso	☐	25. Anorexia	☐																
26. Fadiga	☐																		
26.1 Fadiga: Com relação ao cansaço, indique como você tem se sentindo nesta última semana:																			
Muito bem		Muito mal																	
		☐ ☐ ☐																	
COMPROMETIMENTO CUTÂNEO																			
1. Sim - presente 2. Sim – passado 3. Não 4. Não avaliado 5. Não se aplica 6. Não sabe informar																			
27. Esclerodactilia	☐	28. Espessamento cutâneo proximal	☐																
29. Leucomelanodermia (hipo/ hiperpigmentação)	☐	30. Edema	☐																



HOSPITAL DAS CLÍNICAS
SERVIÇO DE REUMATOLOGIA
AMBULATÓRIO DE PESQUISA CLÍNICA
FICHA CLÍNICA ESCLEROSE SISTÊMICA

31. Calcinose <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>	32. Telangiectasias <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>	33. Microstomia <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>	34. Lesões periungueais <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>
35. Prurido <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>			
36. Biópsia Cutânea 1. Normal 2. Alterada 3. Não realizada _____ _____ _____ <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>			
COMPROMETIMENTO VASCULAR			
1. Sim - presente 2. Sim – passado 3. Não 4. Não avaliado 5. Não se aplica 6. Não sabe informar			
37. FRy subjetivo <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>	38. FRy objetivo <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>	39. Microcatrizes de polpas digitais <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>	40. Úlceras digitais <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>
41. Úlceras em superfícies extensoras <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>	42. Necrose digital <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>	43. Amputação de extremidades <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>	
44. Capilaroscopia 1. Normal 2. Alterada 3. Não realizada Capilares ectasiados: _____ Megacapilares: _____ Deleção: _____ Número de capilares/mm: _____ <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>			
COMPROMETIMENTO MÚSCULO-ESQUELÉTICO			
1. Sim - presente 2. Sim – passado 3. Não 4. Não avaliado 5. Não se aplica 6. Não sabe informar			
45. Artralgia <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>	46. Artrite/ sinovite <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>	47. Crepitação tendínea <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>	48. Contratura articular /mão em garra <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>
49. Mialgia <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>	50. Déficit de força <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>	51. Aumento de enzimas musculares <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>	
52. Radiografia de mãos 1. Normal 2. Alterada 3. Não realizada () Osteopenia () Erosões () Calcinose () Acrosteólise <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>			
COMPROMETIMENTO GASTROINTESTINAL			
1. Sim - presente 2. Sim – passado 3. Não 4. Não avaliado 5. Não se aplica 6. Não sabe informar			
53. Xerostomia <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>	54. Má conservação dentária <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>	55. Disfagia <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>	56. Regurgitação <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>
57. Pirose <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>	58. Plenitude pós-prandial <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>	59. Diarreia <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>	60. Constipação <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>
61. Incontinência fecal <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>			



HOSPITAL DAS CLÍNICAS
SERVIÇO DE REUMATOLOGIA
AMBULATÓRIO DE PESQUISA CLÍNICA
FICHA CLÍNICA ESCLEROSE SISTÊMICA

62. Endoscopia Digestiva Alta 1. Normal 2. Alterada 3. Não realizada <input style="float: right;" type="checkbox"/>			
62.1 Esofagite 1. Sim ☐ 2. Não ☐ 3. Não se aplica ☐	62.2 Esôfago de Barrett 1. Sim ☐ 2. Não ☐ 3. Não se aplica ☐	62.3 Gastrite 1. Sim ☐ 2. Não ☐ 3. Não se aplica ☐	62.4 Outros 1. Sim ☐ 2. Não ☐ 3. Não se aplica ☐
63. Cintilografia de Esvaziamento Esofágico 1. Normal ☐ 2. Alterada ☐ 3. Não realizada ☐ 63.1 Retardo de esvaziamento 1. Leve ☐ 2. Moderado ☐ 3. Acentuado ☐ 4. Não se aplica ☐			
64. Esófagograma 1. Normal ☐ 2. Alterada ☐ 3. Não realizada ☐ 64.1 Alteração no esófagograma 1. Retardo no esvaziamento ☐ 2. Dilatação ☐ 3. Hérnia hiatal ☐ 4. RGE ☐ 5. Outro: _____ ☐ 6. Não se aplica ☐			
65. Manometria 1. Normal ☐ 2. Alterada ☐ 3. Não realizada ☐ 65.1 Alterações na manometria 1. Hipotonia ☐ 2. Atonia ☐ 3. Relaxamento EEI ☐ 4. Não se aplica ☐			
COMPROMETIMENTO CARDIO-PULMONAR			
1. Sim - presente 2. Sim – passado 3. Não 4. Não avaliado 5. Não se aplica 6. Não sabe informar			
66. Dispneia aos esforços ☐	67. Dispneia em repouso ☐	68. Tosse ☐	69. Palpitação ☐
70. Dor torácica ☐	71. Hemoptise ☐	72. Síncope ☐	
73. Radiografia de Tórax 1. Normal ☐ 2. Alterada ☐ 3. Não realizada ☐ 73.1 Alterações na radiografia de tórax 1. Aumento da área cardíaca ☐ 2. Infiltrado intersticial ☐ 3. Envolvimento pleural ☐ 4. Granuloma residual ☐ 5. Não se aplica ☐			

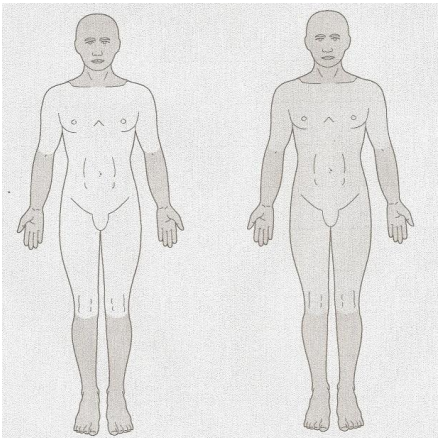


HOSPITAL DAS CLÍNICAS
SERVIÇO DE REUMATOLOGIA
AMBULATÓRIO DE PESQUISA CLÍNICA
FICHA CLÍNICA ESCLEROSE SISTÊMICA

74. Tomografia de Tórax 1. Normal 2. Alterada 3. Não realizada	<input style="width: 30px; height: 30px;" type="checkbox"/>	
74.1 Alterações na tomografia de tórax 1. Padrão de vidro fosco 2. Fibrose pulmonar/ faveolamento 3. Envolvimento pleural 4. Granuloma residual 5. Não se aplica	<input style="width: 30px; height: 30px;" type="checkbox"/> <input style="width: 30px; height: 30px;" type="checkbox"/> <input style="width: 30px; height: 30px;" type="checkbox"/> <input style="width: 30px; height: 30px;" type="checkbox"/>	
75. Espirometria 1. Normal 2. Alterada 3. Não realizada	<input style="width: 30px; height: 30px;" type="checkbox"/>	
75.1 Alterações na espirometria 1. Distúrbio restritivo leve 2. Distúrbio restritivo moderado 3. Distúrbio restritivo grave 4. Distúrbio obstrutivo 5. Não se aplica	<input style="width: 30px; height: 30px;" type="checkbox"/> <input style="width: 30px; height: 30px;" type="checkbox"/>	
76. ECG 1. Normal 2. Alterada 3. Não realizada	<input style="width: 30px; height: 30px;" type="checkbox"/>	
76.1 Alterações no ECG 1. Hipertrofia de câmaras 2. Distúrbio do ritmo 3. Distúrbio de condução 4. Alterações isquêmicas 5. Não se aplica	<input style="width: 30px; height: 30px;" type="checkbox"/> <input style="width: 30px; height: 30px;" type="checkbox"/> <input style="width: 30px; height: 30px;" type="checkbox"/> <input style="width: 30px; height: 30px;" type="checkbox"/>	
77. Ecocardiograma 1. Normal 2. Alterada 3. Não realizada	<input style="width: 30px; height: 30px;" type="checkbox"/>	
77.1 Alterações no Ecocardiograma 1. Aumento de câmaras direitas 2. Aumento de câmaras esquerdas 3. Disfunção sistólica 4. Disfunção diastólica 5. Disfunção valvular: _____ 6. HAP leve 7. HAP moderada PSAP: _____ mmHg 8. HAP grave 9. Derrame pericárdico 10. Não se aplica	<input style="width: 30px; height: 30px;" type="checkbox"/> <input style="width: 30px; height: 30px;" type="checkbox"/> <input style="width: 30px; height: 30px;" type="checkbox"/> <input style="width: 30px; height: 30px;" type="checkbox"/>	
78. Cateterismo cardíaco direito 1. Normal 2. Alterada 3. Não realizada	<input style="width: 30px; height: 30px;" type="checkbox"/>	
78.1 Alterações no CATE direito 1. HAP leve 2. HAP moderada 3. HAP grave 4. Não se aplica	<input style="width: 30px; height: 30px;" type="checkbox"/>	TP: _____ AD: _____ IC: _____



HOSPITAL DAS CLÍNICAS
SERVIÇO DE REUMATOLOGIA
AMBULATÓRIO DE PESQUISA CLÍNICA
FICHA CLÍNICA ESCLEROSE SISTÊMICA

79. Teste de caminhada 6 minutos 1. Normal ☐ <input style="margin-left: 10px;" type="checkbox"/> 2. Alterada 3. Não realizada				Distância percorrida: _____ % do previsto: _____ Índice de dispneia de Borg pré: _____																																																																																																															
COMPROMETIMENTO GENITO-URINÁRIO																																																																																																																			
1. Sim - presente 2. Sim – passado 3. Não 4. Não avaliado 5. Não se aplica 6. Não sabe informar																																																																																																																			
80. Dispareunia ☐	81. Disfunção erétil ☐	82. Crise renal ☐	83. Diálise ☐																																																																																																																
COMPROMETIMENTO NEUROLÓGICO																																																																																																																			
1. Sim - presente 2. Sim – passado 3. Não 4. Não avaliado 5. Não se aplica 6. Não sabe informar																																																																																																																			
84. Neuropatia periférica ☐	85. Disautonomia ☐	86. Cefaleia ☐																																																																																																																	
87. ESCORE DE RODNAN : _____																																																																																																																			
				<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th></th> <th colspan="4">DIREITO</th> <th colspan="4">ESQUERDO</th> </tr> <tr> <th></th> <th>0</th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>0</th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Dedos</td> <td></td><td></td><td></td><td></td> <td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td>Dorso das mãos</td> <td></td><td></td><td></td><td></td> <td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td>Antebraço</td> <td></td><td></td><td></td><td></td> <td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td>Braço</td> <td></td><td></td><td></td><td></td> <td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td>Face</td> <td></td><td></td><td></td><td></td> <td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td>Tórax anterior</td> <td></td><td></td><td></td><td></td> <td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td>Abdome</td> <td></td><td></td><td></td><td></td> <td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td>Coxa</td> <td></td><td></td><td></td><td></td> <td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td>Perna</td> <td></td><td></td><td></td><td></td> <td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td>Dorso dos pés</td> <td></td><td></td><td></td><td></td> <td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> </tbody> </table>					DIREITO				ESQUERDO					0	1	2	3	0	1	2	3	Dedos									Dorso das mãos									Antebraço									Braço									Face									Tórax anterior									Abdome									Coxa									Perna									Dorso dos pés								
	DIREITO				ESQUERDO																																																																																																														
	0	1	2	3	0	1	2	3																																																																																																											
Dedos																																																																																																																			
Dorso das mãos																																																																																																																			
Antebraço																																																																																																																			
Braço																																																																																																																			
Face																																																																																																																			
Tórax anterior																																																																																																																			
Abdome																																																																																																																			
Coxa																																																																																																																			
Perna																																																																																																																			
Dorso dos pés																																																																																																																			
COMORBIDADES																																																																																																																			
1. Sim 2. Não 3. Não sabe informar																																																																																																																			
88. HAS ☐	89. DM ☐	90. Insuficiência cardíaca ☐	91. Doença cardíaca isquêmica ☐																																																																																																																
92. Osteopenia ☐	93. Osteoporose ☐	94. Dislipidemia ☐	95. Hipotireoidismo ☐																																																																																																																
96. Depressão ☐	97. Transtorno de ansiedade ☐	98. Tabagismo ☐	99. Etilismo ☐																																																																																																																



HOSPITAL DAS CLÍNICAS
SERVIÇO DE REUMATOLOGIA
AMBULATÓRIO DE PESQUISA CLÍNICA
FICHA CLÍNICA ESCLEROSE SISTÊMICA

100. Neoplasia <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>	101. Outros <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>	
MEDICAÇÕES (especificar a dose)		
1. Sim- atual 2. Não- parou há < 30 dias 3. Não- parou há > 30 dias 4. Nunca usou 5. Não sabe informar		
102. BCC () Nifedipina () Anlodipina () Diltiazem () Verapamil	103. IECA () Captopril () Enalapril	104. BRA () Losartan () Valsartan
105. AAS	106. Pentoxifilina	107. Sildenafil
108. Bosentana	109. Corticoide () Prednisona () Prednisolona ()	110. Metotrexato
111. Azatioprina	112. Micofenolato	113. Ciclofosfamida VO
114. Ciclofosfamida EV Data da última aplicação: ____/____/____	115. IBP () Omeprazol () Pantoprazol	116. Procinético () Bromoprida () Domperidona
117. AINE	118. OUTROS (Especificar):	
AUTOANTICORPOS (Especificar o título)		
1. Positivo 2. Negativo 3. Não realizado		
119. FAN 119.1 Título: _____ 119.2 Padrão: _____ _____	120. Anticentromero	121. Anti-Sc170
122. Anti-RNP	123. Anti-Ro	124. Anti-La
125. Anti Jo1	126. Fator Reumatoide	
EXAME FÍSICO		
127. Peso 	128. Altura 	129. IMC
130.1 PAS 		
130.2 PAD 		



HOSPITAL DAS CLÍNICAS
SERVIÇO DE REUMATOLOGIA
AMBULATÓRIO DE PESQUISA CLÍNICA
FICHA CLÍNICA ESCLEROSE SISTÊMICA

HAQ – Health Assessment Questionnaire

Atividade	Sem dificuldade 0	Pouca dificuldade 1	Muita dificuldade 2	Não consegue 3	Maior valor
1. Vestir-se, inclusive amarrar os cordões dos sapatos e abotoar as roupas					
2. Lavar sua cabeça e seus cabelos					
3. Levantar-se de maneira ereta de uma cadeira de encosto reto e sem braços					
4. Deitar-se e levantar-se da cama					
5. Cortar pedaços de carne					
6. Levar à boca um copo ou xícara cheio de café, leite ou água					
7. Abrir um saco (caixa) de leite comum					
8. Caminhar em lugares planos					
9. Subir 5 degraus					
10. Lavar e secar seu corpo após o banho					
11. Tomar banho de chuveiro					
12. Sentar-se e levantar-se de um vaso sanitário					
13. Levantar os braços e pegar um objeto de aproximadamente 2,5 quilos que está posicionado pouco acima da cabeça					
14. Curvar-se para pegar roupas no chão					
15. Segurar-se em pé no ônibus ou metrô					
16. Abrir potes ou vidros de conservas que tenham sido previamente abertos					
17. Abrir e fechar torneiras					
18. Fazer compras nas redondezas onde mora					
19. Entrar e sair de um ônibus					
20. Realizar tarefas tais como usar vassoura para varrer e ou rodo para a água					
SOMATÓRIO					
SOMATÓRIO DIVIDIDO POR 8 (RESULTADO DO HAQ)					

Questionário sHAQ: 5 domínios adicionais (VAS):

ITEM	VAS (0 – 10)
Fenômeno de Raynaud	
Trato gastrointestinal	
Envolvimento pulmonar	
Dor	
Gravidade da doença	

APÊNDICE B

FICHA CLÍNICA Nº 2. (PREENCHIDA NO DIA DA BIÓPSIA DE PELE)

IDENTIFICAÇÃO		
Número da Ficha		Data de preenchimento ____ / ____ / ____
		Sexo 1. Masculino ☐ 2. Feminino ☐
Nome do paciente		
	7. Idade (anos) 	Raça 1. Branca 2. Negra 3. Parda 4. Indígena 5. Amarela ☐
CLASSIFICAÇÃO		
16. Forma Clínica 1. Cutânea Limitada 2. Cutânea Difusa 3. Sine Escleroderma 4. Overlap (EXCLUIR) 5. Localizada (EXCLUIR)	☐	17. Tempo de Doença 1. < 2 anos 2. 2-5 anos 3. > 5 anos
Comprometimento Sistemas 1. Pele 2. Raynaud 3. Úlceras 4. Doença pulmonar intersticial 5. Hipertensão arterial pulmonar 6. Musculo-esquelético 7. Comprometimento esofageano 8. Renal		
AVALIAÇÃO ATUAL DA DOENÇA		
COMPROMETIMENTO VASCULAR		
Úlceras em atividade? 1. Sim 2. Não	☐	Número de úlceras em atividade
COMPROMETIMENTO MÚSCULO-ESQUELÉTICO		
Artrite? 1. Sim 2. Não	Número de articulações dolorosas	Número de articulações edemaciadas
Déficit de força? 1. Sim 2. Não		CPK
COMPROMETIMENTO CARDIO-PULMONAR		
Dispneia? 1. Sim 2. Não	Valor do CVF nos últimos 6 meses:	

Quadro 1 – Escala modificada de Borg usada no Brasil										Presença de vidro fosco em TAC tórax nos últimos 6 meses 1. Sim 2. Não																																																																																																	
<table border="1"> <tr><td>0</td><td>Nenhuma</td></tr> <tr><td>0,5</td><td>Muito, muito leve</td></tr> <tr><td>1</td><td>Muito leve</td></tr> <tr><td>2</td><td>Leve</td></tr> <tr><td>3</td><td>Moderada</td></tr> <tr><td>4</td><td>Pouco intensa</td></tr> <tr><td>5</td><td>Intensa</td></tr> <tr><td>6</td><td></td></tr> <tr><td>7</td><td>Muito intensa</td></tr> <tr><td>8</td><td></td></tr> <tr><td>9</td><td>Muito, muito intensa</td></tr> <tr><td>10</td><td>Máxima</td></tr> </table>										0	Nenhuma	0,5	Muito, muito leve	1	Muito leve	2	Leve	3	Moderada	4	Pouco intensa	5	Intensa	6		7	Muito intensa	8		9	Muito, muito intensa	10	Máxima																																																																										
0	Nenhuma																																																																																																										
0,5	Muito, muito leve																																																																																																										
1	Muito leve																																																																																																										
2	Leve																																																																																																										
3	Moderada																																																																																																										
4	Pouco intensa																																																																																																										
5	Intensa																																																																																																										
6																																																																																																											
7	Muito intensa																																																																																																										
8																																																																																																											
9	Muito, muito intensa																																																																																																										
10	Máxima																																																																																																										
<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th colspan="4">DIREITO</th> <th colspan="4">ESQUERDO</th> </tr> <tr> <th></th> <th>0</th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>0</th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Dedos</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Dorso das mãos</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Antebraço</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Braço</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Face</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td colspan="4" rowspan="4"></td></tr> <tr><td>Tórax anterior</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Abdome</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Coxa</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Perna</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Dorso dos pés</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table>											DIREITO				ESQUERDO					0	1	2	3	0	1	2	3	Dedos									Dorso das mãos									Antebraço									Braço									Face									Tórax anterior					Abdome					Coxa					Perna									Dorso dos pés									ESCORE DE RODNAN:	
	DIREITO				ESQUERDO																																																																																																						
	0	1	2	3	0	1	2	3																																																																																																			
Dedos																																																																																																											
Dorso das mãos																																																																																																											
Antebraço																																																																																																											
Braço																																																																																																											
Face																																																																																																											
Tórax anterior																																																																																																											
Abdome																																																																																																											
Coxa																																																																																																											
Perna																																																																																																											
Dorso dos pés																																																																																																											
MEDICAÇÕES (especificar a dose) 1. Sim- atual 2. Não- parou há < 30 dias 3. Não- parou há > 30 dias 4. Nunca usou 5. Não sabe informar																																																																																																											
102. BCC () Nifedipina ☐ () Anlodipina ☐ () Diltiazem ☐ () Verapamil ☐			103. IECA () Captopril ☐ () Enalapril ☐			104. BRA () Losartan ☐ () Valsartan ☐			105. AAS ☐																																																																																																		
106. Pentoxifilina ☐			107. Sildenafil ☐			108. Bosentana ☐			109. Corticoide () Prednisona ☐ () Prednisolona ☐ () ☐																																																																																																		
110. Metotrexato ☐			111. Azatioprina ☐			112. Micofenolato ☐			113. Ciclofosfamida VO ☐																																																																																																		
114. Ciclofosfamida EV Data da última aplicação: ____/____/____ ☐						115. IBP () Omeprazol ☐ () Pantoprazol ☐			116. Procinético () Bromoprida ☐ () Domperidona ☐																																																																																																		
117. AINE ☐			118. OUTROS (Especificar):																																																																																																								
EXAMES LABORATORIAIS (DATA: _____)																																																																																																											
Hb :			C3:			CPK:			PCR:																																																																																																		

Ht:	C4:	Creatinina:	VSH:
EXAME FÍSICO			
127. Peso 	128. Altura 	129. IMC 	130.1 PAS 130.2 PAD

HAQ – Health Assessment Questionnaire

Atividade	Sem dificultad e 0	Pouca dificultad e1	Muita dificuldade 2	Não consegue 3	Maior valor
1. Vestir-se, inclusive amarrar os cordões dos sapatos e abotoar as roupas					
2. Lavar sua cabeça e seus cabelos					
3. Levantar-se de maneira ereta de uma cadeira de encosto reto e sem braços					
4. Deitar-se e levantar-se da cama					
5. Cortar pedaços de carne					
6. Levar à boca um copo ou xícara cheio de café, leite ou água					
7. Abrir um saco (caixa) de leite comum					
8. Caminhar em lugares planos					
9. Subir 5 degraus					
10. Lavar e secar seu corpo após o banho					
11. Tomar banho de chuveiro					
12. Sentar-se e levantar-se de um vaso sanitário					
13. Levantar os braços e pegar um objeto de aproximadamente 2,5 quilos que está posicionado pouco acima da cabeça					
14. Curvar-se para pegar roupas no chão					
15. Segurar-se em pé no ônibus ou metrô					
16. Abrir potes ou vidros de conservas que tenham sido previamente abertos					
17. Abrir e fechar torneiras					
18. Fazer compras nas redondezas onde mora					
19. Entrar e sair de um ônibus					
20. Realizar tarefas tais como usar vassoura para varrer e ou rodo para a água					
SOMATÓRIO					
SOMATÓRIO DIVIDIDO POR 8 (RESULTADO DO HAQ)					

Atividade	Sem dificultad e 0	Pouca dificultad e1	Muita dificuldade 2	Não consegue 3	Maior valor
1. Vestir-se, inclusive amarrar os cordões					

dos sapatos e abotoar as roupas					
2. Lavar sua cabeça e seus cabelos					
3. Levantar-se de maneira ereta de uma cadeira de encosto reto e sem braços					
4. Deitar-se e levantar-se da cama					
5. Cortar pedaços de carne					
6. Levar à boca um copo ou xícara cheio de café, leite ou água					
7. Abrir um saco (caixa) de leite comum					
8. Caminhar em lugares planos					
9. Subir 5 degraus					
10. Lavar e secar seu corpo após o banho					
11. Tomar banho de chuveiro					
12. Sentar-se e levantar-se de um vaso sanitário					
13. Levantar os braços e pegar um objeto de aproximadamente 2,5 quilos que está posicionado pouco acima da cabeça					
14. Curvar-se para pegar roupas no chão					
15. Segurar-se em pé no ônibus ou metrô					
16. Abrir potes ou vidros de conservas que tenham sido previamente abertos					
17. Abrir e fechar torneiras					
18. Fazer compras nas redondezas onde mora					
19. Entrar e sair de um ônibus					
20. Realizar tarefas tais como usar vassoura para varrer e ou rodo para a água					
SOMATÓRIO					
SOMATÓRIO DIVIDIDO POR 8 (RESULTADO DO HAQ)					

Questionário sHAQ: 5 domínios adicionais (VAS):

ITEM	VAS (0 - 10)
Fenômeno de Raynaud	
Trato gastrointestinal	
Envolvimento pulmonar	
Dor	
Gravidade da doença	

1. Dê uma nota de 0 a 10 para o seu **Fenômeno de Raynaud** na última semana

Nenhum incômodo 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Gravidade extrema

2. Dê uma nota de 0 a 10 para gravidade do **acometimento do Trato Gastrointestinal** na última semana

Nenhum gravidade 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Gravidade extrema

3. Dê uma nota de 0 a 10 para gravidade de sua **dispnéia (falta de ar)** na última semana

Nenhum gravidade 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Gravidade extrema

4. Dê uma nota de 0 a 10 para como **a sua dor** na última semana

Nenhuma dor 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Dor extrema

5. Dê uma nota de 0 a 10 para gravidade de sua doença na última semana

Nenhuma gravidade 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Gravidade extrema

APÊNDICE C

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE EESCLARECIDO

« AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA E ANTIFIBRÓTICA DE ESTATINAS EM PACIENTES PORTADORES DE ESCLEROSE SISTÊMICA »

Nós o convidamos a participar de uma pesquisa que visa estudar o que acontece no corpo fazendo com que a esclerose sistêmica se desenvolva. Como pesquisadores responsáveis deste estudo, nosso objetivo é descobrir o que está desregulado no seu corpo, levando ao desenvolvimento da doença. Nesta pesquisa só será realizado testes com as células presentes no seu sangue e/ou na sua pele. Deste modo, nenhum medicamento será administrado em você durante toda a pesquisa.

É importante ressaltar que:

1. Sua participação é inteiramente **voluntária**;
2. Você pode deixar de participar do estudo a qualquer momento que quiser;
3. Nós solicitaremos novamente sua aprovação (verbal) no momento de cada coleta;
4. Suas informações nunca serão divulgadas, ou seja, permanecerão confidenciais;
5. Faremos um banco de dados e caso a pesquisa traga bons resultados, você será um dos primeiros beneficiados.

A esclerose sistêmica é uma doença autoimune, inflamatória crônica que acomete principalmente a pele, podendo comprometer também outros órgãos, como pulmão, coração e trato digestivo. Com o passar do tempo, os portadores de esclerose sistêmica podem desenvolver incapacidade para realização de suas atividades tanto de vida diária como profissional. Apesar de rara, a esclerose sistêmica é uma doença grave e ainda sem cura.

Nós solicitamos a sua colaboração e participação neste estudo porque você é **um voluntário**. Este estudo inclui a participação de 80 indivíduos. Entre os quais, 40 são voluntários sadios e 40 são portadores da esclerose sistêmica.

Para este estudo, precisamos coletar algumas células de sangue. A coleta de sangue é feita no braço e a quantidade coletada é equivalente a duas colheres de sopa (10-15 ml). Antes de iniciar a coleta, nós limparemos o seu braço com álcool, e todo material usado na coleta é descartável. A coleta será feita por profissionais treinados e competentes e orientados para reduzir os riscos. Para a amostra de pele, serão utilizados restos de pele retirados na sua cirurgia plástica no Hospital das Clínicas, não havendo necessidade de nenhum procedimento adicional para os voluntários sadios. Nos pacientes com ES a biópsia será realizada no antebraço com um punch de 5 mm. O objetivo é estudar também o que acontece na pele das pessoas que têm esclerose sistêmica, um dos órgãos mais comprometidos na doença, e para isso precisamos comparar com a pele de indivíduos que não possuem a doença.

Os riscos envolvidos nesse projeto se referem à coleta de sangue, que pode ser desconfortável e o braço pode ficar um pouco dolorido e apresentar hematoma que é uma área arroxeadada no local da coleta. Com relação a biópsia, há um pequeno **risco** de infecção, sangramento, e por precisar de colocação de pontos, pode deixar cicatriz. Com relação aos benefícios no voluntário saudável, você será submetido a uma avaliação clínica e, caso seja detectada alguma alteração sugestiva de

doença auto-imune, será encaminhado para um acompanhamento adequado. Aos pacientes portadores da ES, os benefícios encontram-se na descoberta de terapia específica para doença.

A coleta de dados só será iniciada após a aprovação do projeto de pesquisa pelo CEP e o cronograma proposto será cumprido. O orçamento financeiro desta pesquisa será de inteira responsabilidade do pesquisador principal. Os dados coletados nesta pesquisa através de questionários ficarão armazenados em computador pessoal, sob a responsabilidade de Dra. Rafaela Gonçalves no endereço . Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE, pelo período de mínimo 5 anos. Os resultados deste estudo serão apresentados em congressos, conferências ou em revistas médicas, mas não aparecerá seu nome. Suas informações nunca serão divulgadas, permanecerão confidenciais.

Você tem alguma pergunta sobre a sua participação neste estudo?

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

Dra. Rafaela Silva Guimaraes Gonçalves, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco e Médica do Hospital Das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE. E-mail: rafa_sgg@hotmail.com. Telefone: 55 (81) 2126.3575.

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

Em caso de dúvidas relacionados aos aspectos éticos desse estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE- CEP/CCS, no Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, situado na Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Telefone/Fax: 55 (81) 2126-8588, email cepccs@ufpe.br.

Você ficará com uma cópia deste documento.

Nome do responsável pela coleta de sangue:

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

Nome:

RG: _____

Data:

Endereço: _____

Assinatura: _____

Testemunha 1: -

RG: _____ **Data:**

Testemunha 2:

RG: _____ **Data:**

Pesquisador Responsável:

_____ **Data:** _____

Assinatura:

APÊNDICE D

ARTIGO DOS RESULTADOS NA *MEDIATORS OF INFLAMMATION*: STATINS INHIBIT CYTOKINES IN A DOSE-DEPENDENT RESPONSE IN PATIENTS WITH SYSTEMIC SCLEROSIS; E AS INSTRUÇÕES PARA SUBMISSÃO DO ARTIGO NA *REVISTA CITADA*

Statins inhibit cytokines in a dose-dependent response in patients with Systemic Sclerosis

Rafaela Silva Guimarães Gonçalves¹, Andréa Tavares Dantas¹, Michelly Cristiny Pereira², Anderson Ferreira de Almeida², Claudia Diniz Lopes Marques¹, Moacyr J. B. M. Rego², Ivan da Rocha Pitta², Angela Luzia Branco Pinto Duarte¹, Maira Galdino da Rocha Pitta²

¹Hospital das Clínicas, ²Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas Suely Galdino; Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

e-mails: rafa_sgg@hotmail.com, michelly2305@yahoo.com.br,
andreatdantas@gmail.com, andersonr.almeida@hotmail.com,
claudia_reumatologia@terra.com.br, moacyroraculo@gmail.com, irpitta@gmail.com,
angelabduarte@hotmail.com, mgrpitta@gmail.com

Although statins have been successfully administered in the treatment of hypercholesterolemia and cardiovascular disease due to their lipid-lowering and anti-atherosclerotic action, they have shown immunomodulatory effects in several studies with immune-mediated diseases. The aim of this study was to investigate the effects of statins treatment on Th1, Th2 and Th17 cytokines production from stimulated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from Systemic Sclerosis (SSc) patients. We recruited 21 patients classified according to American College of Rheumatology criteria for SSc for PBMCs culture analysis. Simvastatin and atorvastatin at 50µM promoted reduction in all cytokines levels with statistical significance, except for IL-6, which had its reduction only induced by use of simvastatin. Statins, particularly simvastatin, appear to have immunosuppressive effect reducing all cytokine secretions levels from PBMCs of SSc in a dose dependent manner.

Key words: *statin, Systemic Sclerosis, cytokines, Th1, Th2, Th17*

1. Introduction

Th1 and Th2 pathway cytokines have been implicated in Systemic Sclerosis (SSc) pathogenesis. Th1 cells appear to inhibit collagen deposition and increase metalloproteinase production, either by release of IFN γ (interferon gamma) or by direct contact with fibroblasts, and thus have an antifibrotic effect [1]. On the other hand, Th2 cells stimulate the production of collagen and inhibit matrix metalloproteinases from the release of IL-4 and IL-13, presenting profibrotic and pro-angiogenic properties [2]. Interestingly, Th2 cytokine levels tend to decrease as cutaneous sclerosis regresses, and a study suggests that a shift in Th2 response to Th1 correlates with improved cutaneous fibrosis in SSc [2, 3].

Another cell pathway that is increasingly being studied in SSc is Th17. Th17 cells produce mainly IL-17, IL-21 and IL-22 cytokines [4, 5]. In general, IL-17 is considered a proinflammatory cytokine capable of inducing production of other cytokines such as IL-6, IL-1, IL-8 and TNF [6]. In addition, it inhibits angiogenesis of endothelial cells and promotes proliferation of fibroblasts, however no known action on collagen has been observed. Elevated serum levels of IL-17 have been described in patients with SSc, suggesting their participation in the pathophysiology of the disease [7, 8].

Statins have been successfully administered in the treatment of hypercholesterolemia and cardiovascular disease due to its lipid-lowering and anti-atherosclerotic action. Although the relationship between macro and microvascular involvement in SSc has not been well elucidated, several clinical trials have demonstrated the benefit of statins in the treatment of vasculopathy, evidencing decrease in levels of endothelin-1, ICAM-1 and CCL-2 and reduction in the risk of development of digital ulcers [9, 10]. Statins also promoted decreased expression of transforming growth factor (TGF β 1) and connective tissue growth factor (CTGF) by renal mesangial cells, renal fibroblasts and pulmonary fibroblasts [11-13], suggesting a potential antifibrotic effect of HMG-CoA reductase inhibitors. However, additional studies are needed to prove this effect and to define the mechanism of action involved.

In this context, it is suggested the possibility of the use of statins as immunomodulatory [14-16] and antifibrotic agents in the treatment of SSc. Therefore, the aims of this study were to investigate the effects of statins treatment on Th1, Th2 and Th17 cytokines production from stimulated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from SSc patients and to assess if there is any association to statin's response in the levels of cytokines with clinical measures from SSc patients included in the study.

2. Materials and methods

2.1 Study subjects. We recruited 21 patients (all female) for PBMCs culture analysis, classified according to American College of Rheumatology criteria for SSc [17]. Patients were classified as limited cutaneous SSc (lcSSc; n = 13) or diffuse cutaneous

SSc (dcSSc; n = 8) [18]. The characteristics of SSc patients are summarized in the Table 1. The mean disease duration, calculated from the time of onset of the first non-Raynaud phenomenon event, was 156.9 ± 113.2 months. All subjects gave their written consent to participate. The patients were not using statins, and this was an exclusion criteria, besides patients younger than 18 years old, or who had overlap diseases, or had a known diagnosis of cancer or chronic infection were also excluded.

TABLE 1. Clinical parameters and image's data of SSc patients.

CARACTERISTICS	DIFFUSE CUTTANEOUS (n=8)	LIMITED CUTTANEOUS (n=13)
Age $\pm$ SD (yrs)	$47,6 \pm 13,4$	$47,4 \pm 13,1$
Gender female %	100	100
Raynaud phenomenon duration (months) $\pm$ SD	$157 \pm 117,8$	$144,6 \pm 115,4$
Diseases Duration (months) $\pm$ SD	$104,3 \pm 97,3$	$114,5 \pm 98,9$
Initial symptoms %		
Raynaud phenomenon	12,5	76,9
No-Raynaud phenomenon	87,5	23,1
Clinical Manifestation %		
Leucomelanoderma	62,5	69,2
Telangiectasia	75	69,2
Microstomia	75	53,8
Objective Raynaud phenomenon	87,5	84,6
Digital pittings	37,5	53,8
Digital ulcer	-	15,4
Dysphagia	75	76,9
Dyspepsia	87,5	84,6
Esophagitis	25	23
Rodnan score (median)	13,9	14,2
Pulmonary Arterial Hypertension	25	7,7
Lung fibrosis on thorax CT %	62,5	38,5
sHAQ (median)	1,0	1,005

SD: standard deviation, yrs=years; CT= computed tomography; sHAQ= scleroderma Health Assessment Questionnaire

Patients' exams and treatment were recorded down from the medical charts. The modified Rodnan total skin thickness score was used to evaluate skin fibrosis. Esophagus involvement was determined by scintilography or endoscopy; lung involvement (ground glass pattern or bibasilar fibrosis) was observed using high-resolution computed tomography (HRCT). In addition, a pulmonary function test (PFT) was performed to examine the severity of pulmonary fibrosis; vital capacity <80 % of predicted was considered abnormal. Pulmonary artery pressure was estimated by Doppler echocardiogram; pressures above 35 mmHg were interpreted as pulmonary hypertension.

The study protocol was approved by the ethics committee of Universidade Federal de Pernambuco (CAAE: 63515916.1.0000.5208), according to the principles of the Declaration of Helsinki, and informed consent was obtained from all subjects.

2.2. PBMC purification and culture. PBMCs were obtained from the heparinized blood of patients and controls. The PBMCs were isolated using the standard Ficoll-Hypaque density-gradient centrifugation (GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA, USA) method. PBMCs (1×10^6 cells/ml) were cultured in RPMI- 1640 (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, Carlsbad, CA, USA), HEPES 10 mM (Gibco, Carlsbad, CA, USA) and penicillin (10.000 U/ml)/streptomycin (10.000 µg/ml) (Gibco, Carlsbad, CA, USA).

Cells were stimulated with anti-CD3/CD28 (Ebioscience, San Diego, CA, USA) and were treated with simvastatin at 1, 10 and 50µM doses (Sigma) and Atorvastatin at 1, 10 and 50uM doses (Sigma). The metilprednisolone (Pfizer) at 10 and 50 µM was used as the standard drug. Cells were incubated at 37 °C in a humidified 5% CO₂ incubator. Culture supernatant was collected after 48h for cytokines quantification.

2.3. Evaluation of cytotoxicity. The simvastatin and atorvastatin cytotoxicity was evaluated in healthy volunteers to confirm drug selectivity. Differents concentrations for simvastatin were tested (1, 10, 50 µM) and were founded that at all concentrations the average viability was >95 % (data not shown) [19].

Cell cytotoxicity for atorvastatin was evaluated using the 3-(4,5-dimeth- ylthiazol-2yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide (MTT, Molecular Probes, Invitrogen) assay following the manufacturer's instructions. Briefly, PBMCs from healthy volunteers (1.9×10^4 /well) were seeded in 96-well plates and were treated with different concentrations of the Atorvastatin (1, 10, 50 and 100 l µM) over a 72 h time period. At the end of incubation, the absorbance was read at 570 nm.

2.4. Cytokines quantification. Cytokine (IFN-γ, TNF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A and IL-17F) levels were quantified in PBMC culture supernatants. Concentrations of cytokines in culture supernatants were determined by cytometric bead array (CBA), according to the manufacturer's protocol (CBA, BD Biosciences) for TNF, IL-2, IL-4, IL-10 and IL-17A. Briefly, 50µl serum samples were subjected to analysis in duplicate using the cytometric bead array kit on a Accuri C6 Flow Cytometer (BD, Biosciences). The concentration of cytokines was quantified using FCAP Array software v3.0.1. The detection limits were, TNF 3.8 pg/ml, IL-2 2.6 pg/ml, IL-4 4.9 pg/ml, IL-10 4.5 pg/ml, and IL-17A 18.9 pg/ml.

For IL-17F, IL-6 and IFNα cytokines levels were used an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). The lower detection limits for the ELISA analyses were, IFNα 4.68, IL-17F 31.25, and IL-6 4.68.

2.5. Statistical analysis. Statistical analyses of the data were performed using the GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) statistical program. The

D'Agostino test verified the normality of samples. Numerical data were expressed as mean $\pm$ standard error (SE), if they were in normal distribution or median and interquartile range (IQR) if they were not in Gaussian distribution. Mann-Whitney U test was used to compare serum cytokines levels. The Wilcoxon's signed rank test was used to compare differences in the cytokine production of PBMCs. A probability value of $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Effects of statins treatment on cytokines production by PBMC from SSc patients after stimulation with anti-CD3/CD28. We analyzed the effect of the in vitro treatment of statins (simvastatin and atorvastatin) on secretion of cytokines in PBMCs from SSc patients, and with metilprednisolone (that was used as the standard drug). When compared to the stimulated condition, simvastatin and atorvastatin 50 μ M promoted a reduction in all cytokines levels with statistical significance, except for IL-6, which had its reduction only induced by use of simvastatin (showed in fig 1).

When we separated in groups by clinical form (dcSSc x lcSSc), simvastatin and atorvastatin at 50 μ M was able to reduce secretion of all cytokines in both presentations (data not shown), except for IL-6 that was not reduced by atorvastatin at any doses 50 μ M, neither by simvastatin at 1 and 10 μ M in both clinical forms (fig 2b). Simvastatin and atorvastatin at 50 μ M induced decreased in IFN γ levels secretion in both forms, but was not able to reduce at a dose of 10 μ M (fig 2a). Atorvastatin 10 μ M was also not able to reduce IL17-F secretion level in dcSSc (fig 3c). All other cytokines levels analysed, and not cited above, had response to treatment with simvastatin at a dose of 10 μ M, atorvastatin 10 μ M and 50 μ M that was statistically significant in both dcSSc and lcSSc (data not shown).

Methylprednisolone was used as a control, and also induced reduction of cytokine secretion with statistical significance. We also observed that simvastatin dose of 50 μ M had a better effect on the reduction of all cytokines secretion when compared with metilprednisolone at 50 μ M, with statistically singnificance (data not shown).

3.2. Effect of simvastatin on cytokine profile correlated with clinical measures. We observed that all cytokines secreted by PBMCs from patients with SSc had response (with statistical significance) of simvastatin at a dose of 50 μ M in differents clinical groups (lung fibrosis or ulcers and digital pittings, (data not shown).

When we analyzed the response to statins in reducing IL-6 secretion, we observed that atorvastatin at all doses was not able to reduce secretion in both patients with or without pulmonary fibrosis. However, simvastatin at the dose of 50 μ M (as already have mencioned) was able to reduce IL-6 in both groups (with or without pulmonary fibrosis), but at the dose of 10 μ M, only in patients with pulmonary fibrosis ($p < 0.05$). IL-6 had no effect by atorvastatin titration at doses of 10 μ M and 50 μ M in patients with or without presence of pitting scars, but had effect on secretion reducing when was treated with simvastatin 10 μ M in patients with presence of pitting scars ($p < 0.01$).

Atorvastatin 10 μ M was not able to reduce IFN γ in any clinical subgroups (lung fibrosis

or ulcers and digital pittings), but was able to reduce at 50 μ M doses (data not show). Atorvastatin 10 μ M did not also reduce IL-17F in patients with presence of pitting digitals, and in the group that did not lung fibrosis. TNF levels secretion did not response to atorvastatin 10 μ M in both group of patients with or without presence of pitting scars, and at this dose of atorvastatin was not able to reduce TNF levels in patients with lung fibrosis.

All other cytokines levels analysed, and not cited above, had response to treatment with simvastatin at a dose of 10 μ M, atorvastatin 10 μ M and 50 μ M that was statistically significant in both groups regardless of lung involvement (data not shown).

We did not find correlation of cytokine production levels by PBMCs in SSc patients with modified Rodnan score nor with the clinical presentations (pulmonary, vascular, cardiac or gastrointestinal alterations). There was no statistical difference between the groups treated with immunosuppressants, including corticosteroids.

4. Discussion

We demonstrate that simvastatin has immunosuppressive effect doses-dependent on all cytokines, secreted by PBMCs of SSc, tested in this study (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ , IL17F and IL-17A). Atorvastatin also modulated almost all cytokines with doses dependency, except for IL-6, where no modulation was observed. To our knowledge, no study has evaluated the effect of statins on the cytokines modulation in secretions of SSc's PBMCs *in vitro*.

The difference in response between simvastatin and atorvastatin (especially on IL-6) could be explain by the fact of both have 3-dimensional structures different. There are two types of statins according with structures. Type 1 statins (e.g., simvastatin) exhibit binding via a decalin ring structure, and type 2 statins (e.g., atorvastatin) exhibit additional binding via their fluorophenyl group. Differences in statin structure and binding characteristics may partially explain the differences in potency of HMG-CoA reductase inhibition [20], and also may explain why simvastatin appear have more effect in cytokines of PBMC's supernadant in SSc than atorvastatin.

Studies made to evaluate direct effects of statins on cytokine production in with human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy people *in vitro* showed decrease of IL-2, IFN γ , as our study, in a doses dependence manner, but not effect in IL-6 [21]. This not response of IL-6 to treatment with simvastatin, was different that we observed, and maybe the healthy cell do not have the same effect of simvastatin as saw in our study with SSc cells and in others, that showed atorvastatin, for example, decreased IL-6 production in hypercholesterolemic patients [22] and in rabbits [23]. Decreased IL-6 was observed also after treatment of endothelial cells with pravastatin, simvastatin, cerivastatin and fluvastatin [24].

Another study revealed that lovastatin significantly decreased IL-2, IL-4, and IFN γ production by T lymphocytes purified from human PBMCs *in vitro* but not TNF [25]. Cherfan et al. evaluate the effect of simvastatin on human healthy T cells (only with mild hypercholesterolemia) *in vivo*, were not able to demonstrate any significant

influence on the Th1 and Th2 response by simvastatin [26], and in this study only IL-4 and IFN γ were analysed. In other study, simvastatin treatment in dyslipidemic patients resulted in a decreased release of IFN γ and IL-2 when cells were stimulated with phytohemagglutinin [27].

Although there are no studies on SSc PBMCs, there are others studies done on immune-mediated diseases, especially in rheumatoid arthritis (RA). In patients with RA simvastatin reduced secretion levels of IL-17A, IL-6, IL-22 and IFN γ by PBMCs in a dose dependent response [19]. Blaschke et al. observed effect of atorvastatin in decreased of IFN γ levels in secretions by PBMCs from RA patients, but not in IL-6 (as ours results) but also do not had effect in IL-4 and IL-10 secretions [28], different from what we observed in our study.

Another study realized with murine intraepithelial lymphocytes (IELs) and splenocytes cells showed suppression of IFN γ , IL-2, TNF and IL-4 when was used statin treatment [29]. In murine models of Th1- predominant diseases, like rheumatoid arthritis and multiple sclerosis, statins have consistently shown immunosuppressive actions by the inhibition of Th1 development [30, 31].

Statins are substances that, pharmacologically, block the conversion of hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) to mevalonate by binding by competitive mechanism to HMG-CoA reductase promoting a displacement of its natural substrate (HMG- CoA) [32, 33]. This blocking process requires post-translational modification of proteins such as the Ras superfamily of GTPases, which are master regulators in signaling pathways triggered by surface receptors. As such, statins have pleiotropic effects on many cell types, and just recently, T lymphocytes have been identified as cellular targets of statins [34].

During the last decades, the mortality rate due to cardiovascular disease in SSc patients has been increasing progressively [35, 36]. Few previous small and non-randomized trials suggested some usefulness of the statins treatment for vascular damage in SSc [10, 37-43]. In general, they observe cytokine reduction response related to vascular damage such as endothelin-1 and vascular endothelial growth factor (VEGF) when using statins. Despite theses results there are no recommendations for use of statins in the treatment of vascular manifestations of SSc, including Raynaud phenomenon, digital ulcers, and pulmonary arterial hypertension.

Of interest, we observed that all cytokines had a good response to treatment of 50 μ M simvastatin when we analysed by clinical presentations, but in a dose of simvastatin 10 μ M, IL-6 and IFN γ had different responses under certain circumstances, as also we observed that atorvastatin 10 μ M had distinct effect at IL- 17F and TNF, and no effect on IFN γ and IL-6.

We observed response by simvastatin at 10 μ M in reducing IL-6 levels secretion in PBMCs of patients with lung fibrosis. As we already know IL-6 is increased in the sera of SSc patients and has been associated with multiple organ involvement including skin [44], the occurrence of pulmonary fibrosis [45-47], and increased mortality [48]. These

studies demonstrate that IL-6 is involved in the pathogenesis of SSc and may contribute to progression of fibrosis and disease severity in SSc. Our result is an interesting observation on the potential of simvastatin in SSc treatment.

TNF is a proinflammatory cytokine and its role in SSc remains uncertain. It has been reported to increase of this cytokine in skin (98) and serum (90), as well as increased production by circulating mononuclear cells (99). In addition, TNF-costimulated T cells produce more profibrotic cytokines and increase collagen production by fibroblasts (100). However, on the other hand, others studies observed TNF reduces collagen production and increases production of metalloproteinases by dermal fibroblasts (101, 102). Therefore, there is no way to conclude that the non-response of atorvastatin 10 μ M in reducing TNF in patients with pulmonary fibrosis is beneficial to this group of patients.

IL-17F shares functions with IL-17A, however IL-17F seems do not inhibit the production of collagen induced in fibroblasts by TGF- β [49], although both IL-17A and IL-17F modulate function of fibrocytes [50]. Furthermore, while many authors defending an inflammatory and pro-fibrotic role of IL-17A/F [51- 54], others believe an indirect antifibrotic role [55, 56]. Therefore, there is no possible ratify yet that the non-inhibition of IL-17F in patients who do not have pulmonary fibrosis, nor that the non-inhibition of IL- 17F in patients who have peripheral vascular damage, is a good or bad solution in the therapy of patients with SSc. Th17 pathway needs to be better studied to elucidate the actual role in SSc pathogenesis.

Another interesting result of our study was the different response to simvastatin and atorvastatin 10 μ M in patients with diffuse form, from those in the limited form of the disease. Atorvastatin at 10 μ M was not able to reduce secretion of IFN γ levels in both forms (dcSSc and lcSSc), neither IL-17F levels in dcSSc. IL-6 had no effect by the therapy in both dcSSc and lcSSc forms either by simvastatin 10, neither by atorvastatin 10 μ M and 50 μ M; only responding to simvastatin 50 μ M (data not show), ratifying the immunosuppressive power of this medication in SSc cells. This dose-dependent immunosuppressive response that we observed in this study with SSc PBMCs reinforces the thought that the structure of the medication as well as the target of the medication have the power of the final response to treatment. The lack of *in vitro* studies with PBMCs in SSc using statins does not allow for more robust conclusions, except indicating the immunosuppressive potential that simvastatin at 50 μ M demonstrated in our study.

Methylprednisolone was used as a control, and also induced reduction of cytokine secretion with statistical significance. We also observed that simvastatin dose of 50 μ M had a better effect on the reduction of all cytokines secretion when compared with methylprednisolone at 50 μ M, with statistically significance (data not shown).

We recognize that our study has some important limitations. Our sample size is limited and our findings warrant further study in larger validation cohort. Besides, most of patients were on specific treatment, what can interfere with cytokines levels studied, but we tried to minimize this bias through statistical analysis adjusted by age and medication

used.

The safety of statins has been confirmed for use in the treatment of hyperlipidemia worldwide. The potential modulatory properties of statins in inflammatory responses have influenced studies about this. Statins may provide really an additive therapeutic effect in the treatment of autoimmune diseases.

We showed that statins, particularly simvastatin, reduced all cytokine secretions levels from PBMCs in a dose dependent manner. Our findings suggest that the simvastatin therapy does able to modulate Th1, Th2 and Th17 pathways. Further studies will be necessary to elucidate the molecular mechanisms.

Declarations of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Funding information

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT-if).

References

1. Baraut J, Michel L, Verrecchia F, Farge D. Relationship between cytokine profiles and clinical outcomes in patients with systemic sclerosis. *Autoimmunity reviews*. 2010;10(2):6573. doi:10.1016/j.autrev.2010.08.003.
2. Chizzolini C, Brembilla NC, Montanari E, Truchetet ME. Fibrosis and immune dysregulation in systemic sclerosis. *Autoimmunity reviews*. 2011;10(5):276-81. doi:10.1016/j.autrev.2010.09.016.
3. Matsushita T, Hasegawa M, Hamaguchi Y, Takehara K, Sato S. Longitudinal analysis of serum cytokine concentrations in systemic sclerosis: association of interleukin 12 elevation with spontaneous regression of skin sclerosis. *The Journal of rheumatology*. 2006;33(2):275-84.
4. Duhon T, Geiger R, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nature immunology*. 2009;10(8):857-63. doi:10.1038/ni.1767.
5. Trifari S, Kaplan CD, Tran EH, Crellin NK, Spits H. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nature immunology*. 2009;10(8):864-71. doi:10.1038/ni.1770.
6. Hwang SY, Kim JY, Kim KW, Park MK, Moon Y, Kim WU et al. IL-17 induces production of IL-6 and IL-8 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via NF-kappaB- and PI3-kinase/Akt-dependent pathways. *Arthritis research & therapy*. 2004;6(2):R120-8. doi:10.1186/ar1038.
7. Kurasawa K, Hirose K, Sano H, Endo H, Shinkai H, Nawata Y et al. Increased interleukin-

- 17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis and rheumatism*. 2000;43(11):2455-63.doi:10.1002/15290131
8. Murata M, Fujimoto M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K et al. Clinical association of serum interleukin-17 levels in systemic sclerosis: is systemic sclerosis a Th17 disease? *Journal of dermatological science*. 2008;50(3):240-2. doi:10.1016/j.jdermsci.2008.01.001.
9. Ong VH, Denton CP. Innovative therapies for systemic sclerosis. *Current opinion in rheumatology*. 2010;22(3):264-72. doi:10.1097/BOR.0b013e328337c3d6.
10. Rossi M, Bazzichi L, Ghiadoni L, Mencaroni I, Franzoni F, Bombardieri S. Increased finger skin vasoreactivity and stimulated vasomotion associated with simvastatin therapy in systemic sclerosis hypercholesterolemic patients. *Rheumatol Int*. 2012;32(12):3715-21. doi:10.1007/s00296-011- 2183-5.
11. Kim SI, Han DC, Lee HB. Lovastatin inhibits transforming growth factor-beta1 expression in diabetic rat glomeruli and cultured rat mesangial cells. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2000;11(1):80-7.
12. Li C, Yang CW, Park JH, Lim SW, Sun BK, Jung JY et al. Pravastatin treatment attenuates interstitial inflammation and fibrosis in a rat model of chronic cyclosporine-induced nephropathy. *American journal of physiology Renal physiology*. 2004;286(1):F46-57. doi:10.1152/ajprenal.00428.2002.
13. Goppelt-Struebe M, Hahn A, Iwanciw D, Rehm M, Banas B. Regulation of connective tissue growth factor (ccn2; ctgf) gene expression in human mesangial cells: modulation by HMG CoA reductase inhibitors (statins). *Molecular pathology : MP*. 2001;54(3):176-9.
14. Schonbeck U, Libby P. Inflammation, immunity, and HMG-CoA reductase inhibitors: statins as antiinflammatory agents? *Circulation*. 2004;109(21 Suppl 1):II18-26. doi:10.1161/01.CIR.0000129505.34151.23.
15. Mach F. Statins as immunomodulatory agents. *Circulation*. 2004;109(21 Suppl 1):II15-7. doi:10.1161/01.CIR.0000129502.10459.fe.
16. Forero-Pena DA, Gutierrez FR. Statins as modulators of regulatory T-cell biology. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:167086. doi:10.1155/2013/167086.
17. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. *Arthritis and rheumatism*. 1980;23(5):581-90.
18. LeRoy EC, Medsger TA, Jr. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *The Journal of rheumatology*. 2001;28(7):1573-6.
19. Pereira MC, Cardoso PR, Da Rocha LF, Jr., Rego MJ, Goncalves SM, Santos FA et al. Simvastatin inhibits cytokines in a dose response in patients with rheumatoid arthritis. *Inflamm Res*. 2014;63(4):309-15. doi:10.1007/s00011-013-0702-4.
20. Istvan E. Statin inhibition of HMG-CoA reductase: a 3-dimensional view. *Atheroscler Suppl*. 2003;4(1):3-8.
21. Bessler H, Salman H, Bergman M, Straussberg R, Djaldetti M. In vitro effect of statins on

- cytokine production and mitogen response of human peripheral blood mononuclear cells. *Clin Immunol.* 2005;117(1):73-7. doi:10.1016/j.clim.2005.06.014.
22. Ascer E, Bertolami MC, Venturinelli ML, Buccheri V, Souza J, Nicolau JC et al. Atorvastatin reduces proinflammatory markers in hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis.* 2004;177(1):161-6. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2004.07.003.
23. Li H, Li X, Duan L, Li C. Inhibition of lovastatin on proliferation and expression of proinflammatory cytokines in cultured human glomerular mesangial cells. *Chinese medical journal.* 2003;116(9):1366-9.
24. Inoue I, Goto S, Mizotani K, Awata T, Mastunaga T, Kawai S et al. Lipophilic HMG-CoA reductase inhibitor has an anti-inflammatory effect: reduction of mRNA levels for interleukin-1beta, interleukin-6, cyclooxygenase-2, and p22phox by regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in primary endothelial cells. *Life Sci.* 2000;67(8):863-76.
25. Cheng SM, Lai JH, Yang SP, Tsao TP, Ho LJ, Liou JT et al. Modulation of human T cells signaling transduction by lovastatin. *Int J Cardiol.* 2010;140(1):24-33. doi:10.1016/j.ijcard.2008.10.044.
26. Cherfan P, Tompa A, Wikby A, Lofgren S, Jonasson L. Effects of simvastatin on human T cells in vivo. *Atherosclerosis.* 2007;193(1):186-92. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2006.06.022.
27. Okopien B, Krysiak R, Kowalski J, Madej A, Belowski D, Zielinski M et al. The effect of statins and fibrates on interferon-gamma and interleukin-2 release in patients with primary type II dyslipidemia. *Atherosclerosis.* 2004;176(2):327-35. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2004.05.009.
28. Blaschke S, Viereck V, Schwarz G, Klinger HM, Guerluek S, Muller GA. Anti-inflammatory effects of atorvastatin on peripheral blood mononuclear cells and synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Scandinavian journal of rheumatology.* 2009;38(4):235-9. doi:10.1080/03009740802572475.
29. Zhang J, Osawa S, Takayanagi Y, Ikuma M, Yamada T, Sugimoto M et al. Statins directly suppress cytokine production in murine intraepithelial lymphocytes. *Cytokine.* 2013;61(2):540-5. doi:10.1016/j.cyto.2012.12.006.
30. Youssef S, Stuve O, Patarroyo JC, Ruiz PJ, Radosevich JL, Hur EM et al. The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease. *Nature.* 2002;420(6911):78-84. doi:10.1038/nature01158.
31. Leung BP, Sattar N, Crilly A, Prach M, McCarey DW, Payne H et al. A novel anti-inflammatory role for simvastatin in inflammatory arthritis. *Journal of immunology.* 2003;170(3):1524-30.
32. Garcia-Sabina A, Gulin-Davila J, Sempere-Serrano P, Gonzalez-Juanatey C, Martinez-Pacheco R. [Specific considerations on the prescription and therapeutic interchange of statins]. *Farm Hosp.* 2012;36(2):97-108. doi:10.1016/j.farma.2011.02.010.
33. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature.* 1990;343(6257):425-30. doi:10.1038/343425a0.

34. Ghittoni R, Lazzerini PE, Pasini FL, Baldari CT. T lymphocytes as targets of statins: molecular mechanisms and therapeutic perspectives. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2007;6(1):3-16.
 35. Soriano A, Afeltra A, Shoenfeld Y. Is atherosclerosis accelerated in systemic sclerosis? Novel insights. *Current opinion in rheumatology*. 2014;26(6):653-7. doi:10.1097/BOR.0000000000000115.
 36. Man A, Zhu Y, Zhang Y, Dubreuil M, Rho YH, Peloquin C et al. The risk of cardiovascular disease in systemic sclerosis: a population-based cohort study. *Annals of the rheumatic diseases*. 2013;72(7):1188-93. doi:10.1136/annrheumdis-2012-202007.
 37. Alekperov RT, Korzeneva EG, Aleksandrova EN, Novikov AA, Anan'eva LP. [Pleiotropic effects of statins in systemic sclerosis]. *Ter Arkh*. 2011;83(5):41-7.
 38. Kuwana M, Okazaki Y, Kaburaki J. Long-term beneficial effects of statins on vascular manifestations in patients with systemic sclerosis. *Mod Rheumatol*. 2009;19(5):530-5. doi:10.1007/s10165-009-0199-4.
 39. Abou-Raya A, Abou-Raya S, Helmii M. Statins: potentially useful in therapy of systemic sclerosis- related Raynaud's phenomenon and digital ulcers. *The Journal of rheumatology*. 2008;35(9):1801-8.
 40. Blagojevic J, Matucci-Cerinic M. Are statins useful for treating vascular involvement in systemic sclerosis? *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2009;5(2):70-1. doi:10.1038/ncprheum0993.
 41. Del Papa N, Cortiana M, Vitali C, Silvestris I, Maglione W, Comina DP et al. Simvastatin reduces endothelial activation and damage but is partially ineffective in inducing endothelial repair in systemic sclerosis. *The Journal of rheumatology*. 2008;35(7):1323-8.
 42. Abou-Raya A, Abou-Raya S, Helmii M. Statins as immunomodulators in systemic sclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007;1110:670-80. doi:10.1196/annals.1423.070.
 43. Kuwana M, Kaburaki J, Okazaki Y, Yasuoka H, Kawakami Y, Ikeda Y. Increase in circulating endothelial precursors by atorvastatin in patients with systemic sclerosis. *Arthritis and rheumatism*. 2006;54(6):1946-51. doi:10.1002/art.21899.
 44. Sato S, Hasegawa M, Takehara K. Serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 correlate with total skin thickness score in patients with systemic sclerosis. *Journal of dermatological science*. 2001;27(2):140-6.
 45. Scala E, Pallotta S, Frezzolini A, Abeni D, Barbieri C, Sampogna F et al. Cytokine and chemokine levels in systemic sclerosis: relationship with cutaneous and internal organ involvement. *Clinical and experimental immunology*. 2004;138(3):540-6. doi:10.1111/j.1365-2249.2004.02642.x.
- 9
46. Bolster MB, Ludwicka A, Sutherland SE, Strange C, Silver RM. Cytokine concentrations in bronchoalveolar lavage fluid of patients with systemic sclerosis. *Arthritis and rheumatism*. 1997;40(4):743-51. doi:10.1002/1529-0131(199704)40:4<743::AID-ART21>3.0.CO;2-Z.

47. Hasegawa M, Sato S, Fujimoto M, Ihn H, Kikuchi K, Takehara K. Serum levels of interleukin 6 (IL- 6), oncostatin M, soluble IL-6 receptor, and soluble gp130 in patients with systemic sclerosis. *The Journal of rheumatology*. 1998;25(2):308-13.
48. De Lauretis A, Sestini P, Pantelidis P, Hoyles R, Hansell DM, Goh NS et al. Serum interleukin 6 is predictive of early functional decline and mortality in interstitial lung disease associated with systemic sclerosis. *The Journal of rheumatology*. 2013;40(4):435-46. doi:10.3899/jrheum.120725.
49. Nakashima T, Jinnin M, Yamane K, Honda N, Kajihara I, Makino T et al. Impaired IL-17 signaling pathway contributes to the increased collagen expression in scleroderma fibroblasts. *Journal of immunology*. 2012;188(8):3573-83. doi:10.4049/jimmunol.1100591.
50. Hayashi H, Kawakita A, Okazaki S, Yasutomi M, Murai H, Ohshima Y. IL-17A/F modulates fibrocyte functions in cooperation with CD40-mediated signaling. *Inflammation*. 2013;36(4):830-8. doi:10.1007/s10753-013-9609-z.
51. Wilson MS, Madala SK, Ramalingam TR, Gochuico BR, Rosas IO, Cheever AW et al. Bleomycin and IL-1 β -mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. *The Journal of experimental medicine*. 2010;207(3):535-52. doi:10.1084/jem.20092121.
52. Okamoto Y, Hasegawa M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Huu DL, Iwakura Y et al. Potential roles of interleukin-17A in the development of skin fibrosis in mice. *Arthritis and rheumatism*. 2012;64(11):3726-35. doi:10.1002/art.34643.
53. Agarwal S, Misra R, Aggarwal A. Interleukin 17 levels are increased in juvenile idiopathic arthritis synovial fluid and induce synovial fibroblasts to produce proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases. *The Journal of rheumatology*. 2008;35(3):515-9.
54. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *The Journal of experimental medicine*. 1996;183(6):2593-603.
55. Truchetet ME, Brembilla NC, Montanari E, Lonati P, Raschi E, Zeni S et al. Interleukin-17A⁺ cell counts are increased in systemic sclerosis skin and their number is inversely correlated with the extent of skin involvement. *Arthritis and rheumatism*. 2013;65(5):1347-56. doi:10.1002/art.37860.
56. Brembilla NC, Montanari E, Truchetet ME, Raschi E, Meroni P, Chizzolini C. Th17 cells favor inflammatory responses while inhibiting type I collagen deposition by dermal fibroblasts: differential effects in healthy and systemic sclerosis fibroblasts. *Arthritis research & therapy*. 2013;15(5):R151. doi:10.1186/ar4334.

Fig 1. Evaluation of the response to treatment of statins in PBMC cultures of patients with SSc. (A) Simvastatin significantly reduced TNF levels at concentrations of 1 μ M, 10 μ M and 50 μ M; and atorvastatin significantly reduced levels at concentrations of 10 μ M and 50 μ M (B) Simvastatin and atorvastatin significantly reduced IL-4 levels at concentrations of 1 μ M, 10 μ M and 50 μ M; (C) Simvastatin and atorvastatin significantly reduced IL-10 levels at concentrations of 1 μ M, 10 μ M and 50 μ M; (D) Simvastatin and atorvastatin significantly reduced IL-17A levels at concentrations of 1 μ M, 10 μ M and 50 μ M; (E) Simvastatin significantly reduced IL-6 levels at concentrations of 10 μ M and 50 μ M; and atorvastatin was not able to reduce IL-6 levels; (F) Simvastatin significantly reduced IL-17F levels at concentrations of 10 μ M and 50 μ M; and atorvastatin was able to promote reduction of 50 μ M; (G) Simvastatin significantly reduced IFN γ levels at concentrations of 10 μ M and 50 μ M; and atorvastatin was able to promote reduction of 50 μ M; (H) Simvastatin and atorvastatin significantly reduced IL-2

levels at concentrations of 1 μ M, 10 μ M and 50 μ M. *p <0.05, **p <0.01 ***p <0.001. Cel = cells, CD3/CD28= monoclonal antibodies CD3 and CD28, S= simvastatin, A= atorvastatin, MP= methylprednisolone, ng=nanogram, pg = picogram

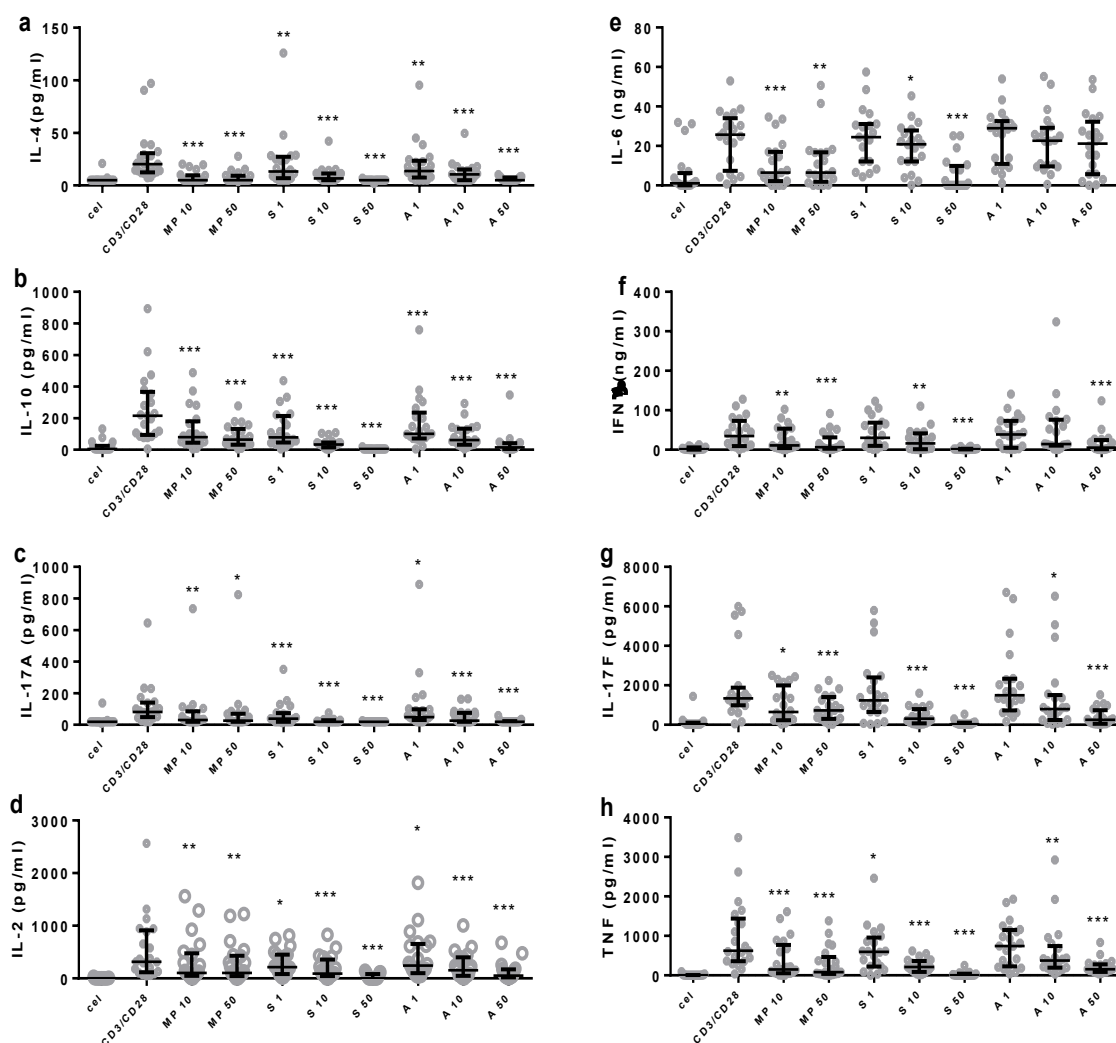
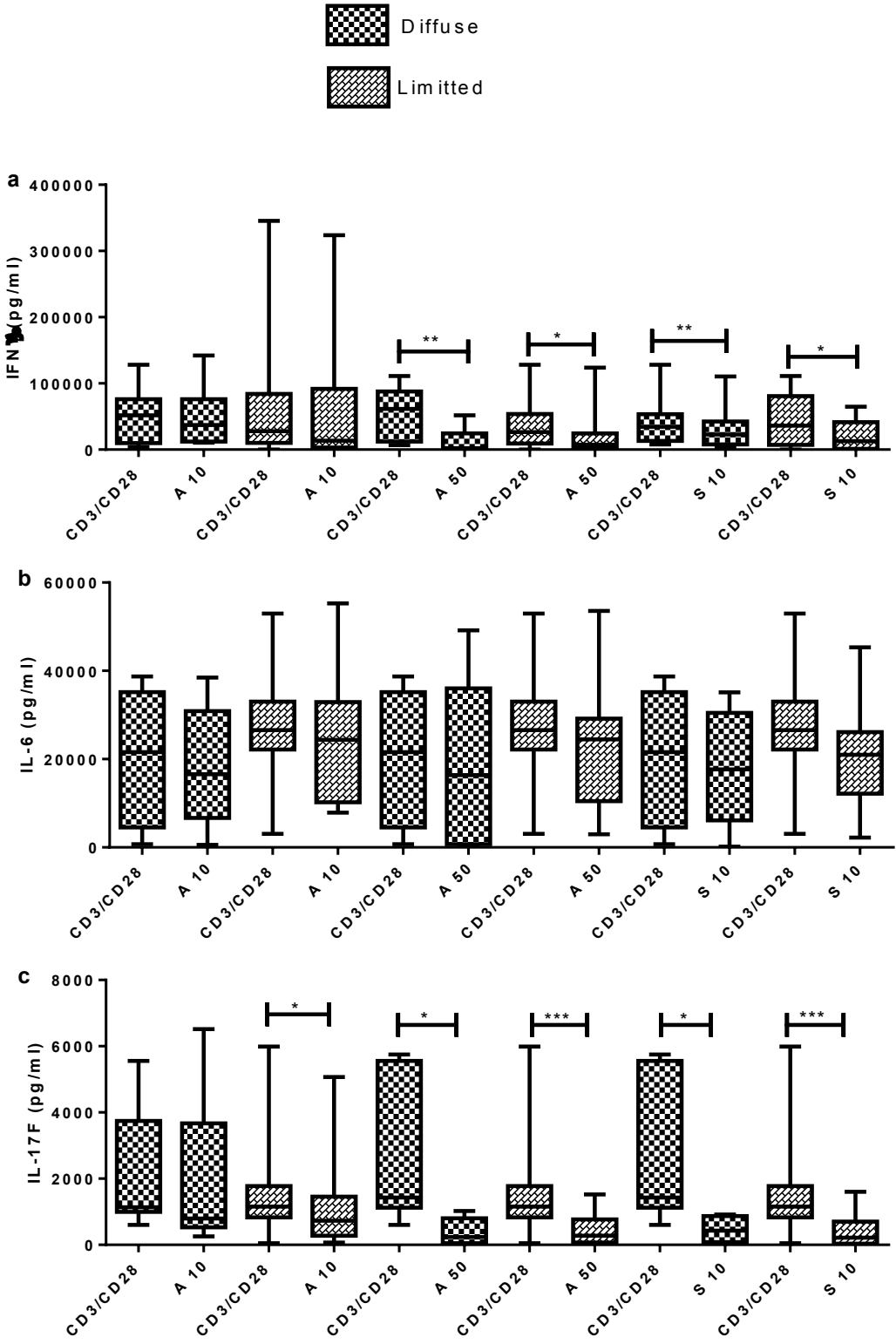


Fig 2. Evaluation of the response to treatment of simvastatin 10 μ M in PBMC cultures of patients with dcSSc and lcSSc. (a) Simvastatin at 10 μ M and atorvastatin at 50 μ M induced decrease in IFN γ levels secretion in both forms; (b) Simvastatin 10 μ M and atorvastatin 10 μ M and 50 μ M was not able to reduce IL-6 secretion from PBMCs in both clinical forms. (c) Atorvastatin at 10 μ M only reduced IL-17F secretion in lcSSc. CD3/CD28= monoclonal antibodies CD3 and CD28, A= atorvastatin, S= simvastatin



Instruções da Mediators of Inflammation

Author Guidelines

Language Editing

Hindawi has partnered with Editage to provide an English-language editing service to authors prior to submission. Authors that wish to use this service will receive a 10% discount on all editing services provided by Editage. To find out more information or get a quote, please [click here](#).

Submission

Manuscripts should be submitted by one of the authors of the manuscript through the online [Manuscript Tracking System](#). Regardless of the source of the word-processing tool, only electronic PDF (.pdf) or Word (.doc, .docx, .rtf) files can be submitted through the MTS. There is no page limit. Only online submissions are accepted to facilitate rapid publication and minimize administrative costs. Submissions by anyone other than one of the authors will not be accepted. The submitting author takes responsibility for the paper during submission and peer review. If for some technical reason submission through the MTS is not possible, the author can contact mi@hindawi.com for support.

Terms of Submission

Papers must be submitted on the understanding that they have not been published elsewhere and are not currently under consideration by another journal published by Hindawi or any other publisher. The submitting author is responsible for ensuring that the article's publication has been approved by all the other coauthors. It is also the authors' responsibility to ensure that the articles emanating from a particular institution are submitted with the approval of the necessary institution. Only an acknowledgment from the editorial office officially establishes the date of receipt. Further correspondence and proofs will be sent to the author(s) before publication unless otherwise indicated. It is a condition of submission of a paper that the authors permit editing of the paper for readability. All inquiries concerning the publication of accepted papers should be addressed to mi@hindawi.com.

Peer Review

All manuscripts are subject to peer review and are expected to meet standards of academic excellence. If approved by the editor, submissions will be considered by peer-reviewers, whose identities will remain anonymous to the authors.

Concurrent Submissions

In order to ensure sufficient diversity within the authorship of the journal, authors will be limited to having two manuscripts under review at any point in time. If an author

already has two manuscripts under review in the journal, he or she will need to wait until the review process of at least one of these manuscripts is complete before submitting another manuscript for consideration. This policy does not apply to Editorials or other non-peer reviewed manuscript types.

Article Processing Charges

Mediators of Inflammation is an open access journal. Open access charges allow publishers to make the published material available for free to all interested online visitors. For more details about the article processing charges of Mediators of Inflammation, please visit the [Article Processing Charges](#) information page.

Units of Measurement

Units of measurement should be presented simply and concisely using System International (SI) units.

Title and Authorship Information

The following information should be included

- Paper title
- Full author names
- Full institutional mailing addresses
- Email addresses

Abstract

The manuscript should contain an abstract. The abstract should be self-contained and citation-free and should not exceed 200 words.

Introduction

This section should be succinct, with no subheadings.

Materials and Methods

This part should contain sufficient detail so that all procedures can be repeated. It can be divided into subsections if several methods are described.

Results and Discussion

This section may each be divided by subheadings or may be combined.

Conclusions

This should clearly explain the main conclusions of the work highlighting its importance and relevance.

Acknowledgments

All acknowledgments (if any) should be included at the very end of the paper before the references and may include supporting grants, presentations, and so forth.

Supplementary Materials

Supplementary materials are the additional parts to a manuscript, such as audio files, video clips, or datasets that might be of interest to readers. Authors can submit one file of supplementary materials along with their manuscript through the Manuscript Tracking System. If there is more than one file, they can be uploaded as a .ZIP file.

A section titled “Supplementary Materials” should be included before the references list with a concise description for each supplementary material file. Supplementary materials are not modified by our production team. Authors are responsible for providing the final supplementary materials files that will be published along with the article.

References

Authors are responsible for ensuring that the information in each reference is complete and accurate. All references must be numbered consecutively and citations of references in text should be identified using numbers in square brackets (e.g., “as discussed by Smith [9]”; “as discussed elsewhere [9, 10]”). All references should be cited within the text; otherwise, these references will be automatically removed.

Preparation of Figures

Upon submission of an article, authors are supposed to include all figures and tables in the PDF file of the manuscript. Figures and tables should not be submitted in separate files. If the article is accepted, authors will be asked to provide the source files of the figures. Each figure should be supplied in a separate electronic file. All figures should be cited in the paper in a consecutive order. Figures should be supplied in either vector art formats (Illustrator, EPS, WMF, FreeHand, CorelDraw, PowerPoint, Excel, etc.) or bitmap formats (Photoshop, TIFF, GIF, JPEG, etc.). Bitmap images should be of 300 dpi resolution at least unless the resolution is intentionally set to a lower level for scientific reasons. If a bitmap image has labels, the image and labels should be embedded in separate layers.

Preparation of Tables

Tables should be cited consecutively in the text. Every table must have a descriptive title and if numerical measurements are given, the units should be included in the column heading. Vertical rules should not be used.

Proofs

Corrected proofs must be returned to the publisher within 2-3 days of receipt. The publisher will do everything possible to ensure prompt publication. It will therefore be appreciated if the manuscripts and figures conform from the outset to the style of the journal.

Copyright

Open Access authors retain the copyrights of their papers, and all open access articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided that the original work is properly cited.

The use of general descriptive names, trade names, trademarks, and so forth in this publication, even if not specifically identified, does not imply that these names are not protected by the relevant laws and regulations.

While the advice and information in this journal are believed to be true and accurate on the date of its going to press, neither the authors, the editors, nor the publisher can accept any legal responsibility for any errors or omissions that may be made. The publisher makes no warranty, express or implied, with respect to the material contained herein.

Conflicts of Interest

Conflicts of interest (COIs, also known as ‘competing interests’) occur when issues outside research could be reasonably perceived to affect the neutrality or objectivity of the work or its assessment. For more information, see our publication ethics policy. Authors must declare all potential interests – whether or not they actually had an influence – in a ‘Conflicts of Interest’ section, which should explain why the interest may be a conflict. If there are none, the authors should state “The author(s) declare(s) that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.” Submitting authors are responsible for co-authors declaring their interests. Declared conflicts of interest will be considered by the editor and reviewers and included in the published article.

Authors must declare current or recent funding (including for article processing charges) and other payments, goods or services that might influence the work. All funding, whether a conflict or not, must be declared in the ‘Acknowledgments’. The involvement of anyone other than the authors who 1) has an interest in the outcome of the work; 2) is affiliated to an organization with such an interest; or 3) was employed or paid by a funder, in the commissioning, conception, planning, design, conduct, or analysis of the

work, the preparation or editing of the manuscript, or the decision to publish must be declared.

Clinical Study

When publishing clinical studies, Hindawi aims to comply with the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) on trials registration. Therefore, authors are requested to register the clinical trial presented in the manuscript in a public trials registry and include the trial registration number at the end of the abstract. Trials initiated after July 1, 2005 must be registered prospectively before patient recruitment has begun. For trials initiated before July 1, 2005, the trial must be registered before submission.

Ethical Guidelines

In any studies that involve experiments on human or animal subjects, the following ethical guidelines must be observed. For any experiments on humans, all work must be conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (1964). Papers describing experimental work which carries a risk of harm to human subjects must include a statement that the experiment was conducted with the human subjects' understanding and consent, as well as a statement that the responsible Ethical Committee has approved the experiments. In the case of any animal experiments, the authors must provide a full description of any anesthetic or surgical procedure used, as well as evidence that all possible steps were taken to avoid animal suffering at each stage of the experiment

APÊNDICE E
ARTIGO DE REVISÃO SUBMETIDO NA *AUTOIMMUNITY*: IL-17 AND
RELATED CYTOKINES INVOLVED IN SYSTEMIC SCLEROSIS: PRESENT
AND FUTURE PERSPECTIVES; ACEITO NA REVISTA CITADA DOI:
10.1080/08916934.2017.1416467

Artigo de revisão: publicado na *Autoimmunity*

**IL-17 and Related Cytokines Involved in Systemic Sclerosis: Present
and Future Perspectives**

Rafaela Silva Guimarães Gonçalves^{1,2}, Michelly. C. Pereira², Andréa Tavares Dantas^{1,2}, Anderson Ferreira de Almeida², Claudia Diniz Lopes Marques¹, Moacyr J. B. M. Rego², Ivan R. Pitta², Angela Luzia Branco Pinto Duarte^{1,2}, Maira Galdino R. Pitta²

¹Hospital das Clínicas de Pernambuco, ²Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas Suely Galdino, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

e-mails:

rafa_sgg@hotmail.com, angelabduarte@hotmail.com,
 claudia_reumatologia@terra.com.br, andreatdantas@gmail.com,
 andersonr.almeida@hotmail.com, moacyroraculo@gmail.com, mgrpitta@gmail.com,
 michelly2305@yahoo.com.br, irpitta@gmail.com

Phones numbers:

Rafaela +55 81 987057316; Angela +55 81 999288550; Claudia +55 81 992945459;
 Andrea +55 81 991721582; Anderson +55 87991111492; Moacyr +55 81 997943799;
 Maira +55 81 996717788; Michelly +55 81 993274256; Ivan +55 81984361944

Abstract

Systemic sclerosis (SSc) is a multisystemic, complex and rare disease of connective tissue, with high morbidity and mortality, and without specific treatment. The disease is characterized by three main principles: vascular disease, autoantibody production and

inflammation, and fibrosis. Since it is well defined that SSc is characterized by elevated production of TGF- β , IL-6 and IL-1, all of them cytokines related to Th17 differentiation, the hypothesis is that this disease may be strongly related to a polarization of the immune response toward the Th17 pathway. Considering the importance of a better understanding of the pathophysiology of Th17 pathway in SSc, this article aims to propose an update for a better understanding of current knowledge on main cytokines secreted by the Th17 cells (IL-17A, IL-21 and IL-22) and the future prospects in the current disease.

Keywords: CD4(+) T cells, fibroblasts, Th17 cells, fibrosis

Systemic sclerosis (SSc) is an autoimmune disease of unknown etiology, characterized by vascular abnormalities and fibrosis of the skin and internal organs. Despite being rare, it is considered extremely important in rheumatology, because of its significant impact on the quality of life of the affected individual. SSc is associated with the prognosis reserved and is considered the most serious of the collagen diseases [1, 2].

SSc pathogenesis involves three main features: vascular impairment, autoantibodies production/inflammation and fibrosis [3]. Fibrosis is characterized by excessive deposition of extracellular matrix (ECM), resulting in a type of scar tissue. In SSc, there is a dysregulation of the fibrosis process that culminates in a multisystemic pathological fibrosis that may affect any organ in the body. Until now there is no effective disease-modifying therapy.

Previous evidence has indicated that immune cells may be among the initiators of the complex process culminating in fibrosis, although the factors driving their activation remain unknown. Activated T cells may trigger activation of fibroblasts by direct contact or by action of secreted cytokines and chemokines. The pathogenesis of SSc involves cytokine secretion by Th1 and Th2 cells. Th1 proinflammatory cytokines participate by mediating the inflammatory process in the

early stages of the disease, whereas Th2 cytokines actively promote the fibrotic response by secreting profibrotic mediators, correlating with the extent of fibrosis and with visceral impairment [4, 5].

Th17 cells were first described in 2005 [6] and appear to coordinate the body's defense against extracellular bacteria and fungi in some specific sites, such as the gastrointestinal barrier, respiratory tract and skin [7]. Due to strong stimulation of chemokines, Th17 cells act linking innate and adaptive immunity, and induce the attraction of other types of Th cells at infection sites [8, 9]. It seems to be involved in the pathogenesis of many

autoimmune-mediated inflammatory diseases such as encephalomyelitis, inflammatory bowel disease, systemic lupus erythematosus, Sjögren's syndrome, rheumatoid arthritis and psoriasis/psoriatic arthritis [10, 11, 12, 13, 14, 15].

In humans, Th17 differentiation requires the presence of IL-6, IL-21, IL-23, IL-1 β and transforming growth factor beta (TGF- β) [16]. The transcription factor retinoic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma (*ROR γ t* that is the protein encoded by *RORc* gene) is the key transcriptional factor for the development of Th17 cells [17], and this transcription factor is necessary and sufficient for Th17 cell induction [18]. The orphan nuclear receptor *ROR γ t* is uniquely expressed in Th17 but not in Th1 cell development [17, 19]. Therefore, Th17 cells are characterized by the expression of the transcription factor *ROR γ t* and the IL-23 receptor (IL-23R) [16].

In addition to interleukin-17A (IL-17A), Th17 cells also secrete IL-21, IL-22 [20, 21], IL-26 [22] and IL-6 under Th17-polarizing conditions [8]. IL-17A, IL-21 and IL-22 have, respectively, the mainly receptors IL-17RA, IL-21R and IL-22R1. Figure 1 shows a schematic drawing about Th1, Th2, Th17 and their main produced cytokines.

Since it is well defined that SSc is characterized by elevated production of TGF- β , IL-6 and IL-1, all of them cytokines related to Th17 differentiation, the hypothesis is that this disease may be strongly related to a polarization of the immune response toward the Th17 pathway. Considering the importance of a better understanding of the pathophysiology of Th17 pathway in SSc, this article aims to propose a review of current knowledge on main cytokines secreted by the Th17 cells (IL-17A, IL-21 and IL-22) and the future prospects in the current disease.

IL-17

Human IL-17 is a homodimeric glycoprotein of 155 amino acids, mainly produced by CD4-activated memory Th17 cells [23]. IL-17 comprises a family of six cytokines: IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (IL-25) and IL-17F. IL-17A and IL-17F can be secreted as disulfide-bound homo- or hetero-dimers that bind to the same heterodimeric receptor IL-17RA and IL-17RC and share some functions [24, 25].

The role of IL-17A in SSc is not yet established. Some evidence of its involvement has been suggested from the assessment of the skin and blood of SSc patients. IL-17A high serum levels and increased mRNA IL-17A expression in peripheral blood lymphocytes and compromised skin have been reported in patients with SSc [26, 27, 28, 29]. Also, some studies have demonstrated a higher proportion of Th17 cells in peripheral blood and skin of SSc patients [28, 29, 30, 31, 32]. Elevated levels of IL-17 were associated

with early disease [26, 28, 33], disease activity [28, 34] and some clinical manifestations such as lung involvement [33, 35], skin score [27, 32, 36], telangiectasias [34] and pitting scar [37]. These studies strongly suggest that IL-17A plays a pivotal role in SSc.

In the meantime, other studies have not observed increased measure of IL-17A levels in serum or skin of SSc patients when compared with healthy controls [31, 33, 34, 38, 39]. These conflicting results may be explained by some variation in the methodological aspects of the studies, such as sample size and technique used for quantification of IL-17, or by differences in the population studied, regarding disease duration or inclusion of patients undergoing immunosuppressive treatment. Evidence of IL-17A participation in SSc pathogenesis is summarized in Table 1 and Table 2.

Table 1. Evidences of IL-17A participation in systemic sclerosis pathogenesis

Biomarker	↑ serum levels	Kurasawa, 2000 (26) Murata, 2008 (27) Nakashima, 2012 (37) Yang, 2014 (98) Rolla, 2016 (35)
	↑ IL-17 PBMC production	Kurasawa, 2000 (26) Radstake, 2009 (31) Yang, 2014 (28)
	↑ IL-17 lung expression	Kurasawa, 2000 (26)
	↑ IL-17 skin expression	Kurasawa, 2000 (26) Nakashima, 2012 (37) Zhou, 2015 (36)
	↑ Th17 cells in skin	Yang, 2014 (28) Truchetet, 2013 (32) Bremblia, 2013 (40)
	↑ Th17 cells in peripheral blood	Radstake, 2009 (31) Fenoglio, 2011 (29) Rodriguez-Reyna, 2012 (30) Yang, 2014 (28)
	↑ mRNA expression IL17 and <i>RORγt</i> in PBMC	Yang, 2014 (28)

3Clinical associations	Early disease	Kurasawa, 2000 (26) Yang, 2014 (28) Olewicz, 2014 (33)
	Lower Rodnan score	Murata, 2008 (27) Truchetet, 2013 (32)
	Higher Rodnan score	Zhou, 2015 (36)
	Disease activity	Yang, 2014 (28) Balanesu, 2015 (34)
	Lung disease	Olewicz, 2014 (33) Rolla, 2016 (35)
	Telangiectasia	Balanesu, 2015 (34)
	Pitting scar	Nakashima, 2012 (37)
In vitro effects of IL-17 in human studies	Stimulates the proliferation of fibroblasts	Kurasawa,2000 (26) Yang, 2014 (28) Yoshizaki, 2010 (41)
	↑ collagen expression and secretion in SSc fibroblasts	Yang, 2014 (28) Okamoto, 2012 (42)
	Do not increasead collagen expression	Truchetet,2013 (32) Kurasawa, 2000 (26) Brembilla, 2013 (40) Nakashima, 2012 (37)
	↑ collagen expression and secretion by lung epithelial cells	Mi, 2011 (43)
	↑ CTGF and TFGB expression in fibroblasts	Yoshizaki, 2010 (41) Okamoto, 2012 (42)
	↓CTGF	Nakashima, 2012 (37)
	↑MMP-1	Truchetet, 2013 (32) Brembilla, 2013 (40)
	↑ ICAM-1 and VCAM-1	Kurasawa, 2000 (26) Zhou, 2015 (36) Yoshizaki, 2010 (41)
	↑ MCP-1 and IL-8	Brembilla, 2013 (40)

	Promotes EMT	Mi, 2011 (43)
--	--------------	---------------

CTGF: connective tissue growth factor; EMT: epithelial–mesenchymal transition; ICAM: intercellular adhesion molecule; IL: interleukin; MCP: monocyte chemoattractant protein; MMP: matrix metalloproteinase; PBMC: peripheral blood mononuclear cell; SSc: systemic sclerosis; SMA: smooth muscle actin; TGF: transforming growth factor; VCAM: vascular cell adhesion molecule

Table 2. Fibrotic responses induced by IL-17A in animal models

IL17 effect	Model	Reference
IL-17A increased collagen, TGF- β and CTGF production by skin fibroblasts; Reduction of fibrosis in IL-17 knockout mice	BLM-induced skin fibrosis and TSK/+ mouse	[42]
IL-17 stimulation increased fibroblast proliferation and expression of TGF- β 1 and COL1A2 in dermal fibroblasts	BLM-induced skin fibrosis	[41]
Increased Th17 cell counts and IL-17A levels in peripheral blood, skin and lungs and this increase was correlated with indices of inflammation and fibrosis in the skin and lungs	BLM-induced skin and lung fibrosis	[44]
Reduction of fibrosis and inflammation in IL-17A knockout mice	Model of hypersensitivity pneumonitis in IL-17A ^{-/-} mice	[45]
Increased synthesis and secretion of collagen Promoted EMT in alveolar epithelial cells IL-17A blockade reduced inflammation and fibrosis in lung tissue	BLM- and silica induced lung fibrosis	[43]
Reduction of inflammation and pulmonary fibrosis in IL-17A knockout mice	BLM- and IL1-induced fibrosis	[46]
Reduction of pulmonary fibrosis in IL-17A knockout mice	BLM-lung fibrosis	[47]

BLM: bleomycin; CTGF: connective tissue growth factor; EMT: epithelial–mesenchymal transition; IL: interleucin; TGF: transforming growth factor; WT: wild type.

In animal models of scleroderma, increased expression of IL-17 in serum and bronchoalveolar lavage has been demonstrated as well as a higher number of Th17 cells in peripheral blood, skin and lungs [41, 44]. Also, Th17 cell counts in peripheral blood, skin, and lungs were positively correlated with inflammatory and fibrotic lesions in both skin and lungs [44]. These findings suggest the participation of this cytokine in the pathogenesis of fibrosis.

In vitro study has demonstrated that IL-17 stimulates the proliferation of SSc fibroblasts,

but has no effect on collagen synthesis [26]. Yang et al. demonstrated that IL-17 produced by Th17 cells from patients with active SSc induced fibroblast growth and collagen synthesis and secretion [28]. In animal models, stimulation with IL-17A increased fibroblast proliferation [41] and COL1A1, CTGF and TGFB1 expression by fibroblasts [41, 42]. These findings indicate that IL- 17 can be an important stimulus for fibrosis development.

It was also demonstrated that induction of fibrosis by bleomycin (BLM) was able to increase skin IL-17A expression and, on the other hand, IL-17A knockout mice showed amelioration of skin fibrosis in two animal models of fibrosis (bleomycin-induced and TSK) [42]. Furthermore, skin expression of the profibrogenic molecules TGF β and CTGF was decreased in bleomycin- treated IL-17A knockout mice [42]. Since these molecules are central mediators in the fibrotic process, induction of these cytokines by IL-17A is likely important for the development of fibrosis in vivo.

Some evidence of IL-17A in the pathogenesis lung fibrosis also exists. IL-17A, *ROR γ t* and IL- 17R were upregulated in an animal model of lung fibrosis bleomycin-induced [43, 47]. In alveolar epithelial cells, IL-17A enhanced collagen production and stimulated epithelial- mesenchymal transition in a TGF- β 1-dependent manner [43]. Finally, the blockade of IL-17A suppressed the recruitment and infiltration of inflammatory cells, the expression of the inflammatory cytokines (IL-17A, TGF- β 1, IL-6 and IL-23) and reversed pulmonary fibrosis in BLM- and silica-induced pulmonary fibrosis [43, 47]. Both studies demonstrated that these effects of IL-17A on lung fibrosis were TGF- β -dependent, suggesting cooperative roles for IL- 17A and TGF- β in the development of fibrosis [43, 47].

In contrast, based on the failure of IL-17A to induce α -smooth muscle actin (α -SMA) expression in cultured fibroblasts from SSc patients, Truchetet et al. hypothesized that IL-17A has a direct

negative-regulatory effect in the development of dermal fibrosis in humans [32]. In line with this, other studies have failed to demonstrate increased collagen production after stimulation with IL- 17 [26, 40] and Nakashima et al. suggested an antifibrogenic effect of IL-17A by downregulating CTGF and α 1(I) collagen protein expression [37]. It also showed decreased protein expression of IL-17 receptor in SSc skin tissue and SSc fibroblasts, and they suggested that this could be caused by intrinsic TGF- β activation in these cells [37].

Another anti-fibrotic effect of IL-17 may be related to its ability to increase matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) production by dermal fibroblasts [32, 40]. MMP-1 is the

main collagenase synthesized by skin fibroblasts and plays an important role in the degradation of extracellular matrix in response to proinflammatory cytokines [48]. Decreased MMP-1 appears to be implicated in the imbalance of collagen metabolism in SSc [49].

IL-17 enhanced expression of intercellular adhesion molecule -1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and the production of IL-1 by human endothelial cells [26]. ICAM-1 is an adhesion molecule expressed on the surface of human endothelial cells and it is associated with proinflammatory activation of human endothelial cells in SSc [41]. Zhou et al. demonstrated that IL-17RA was found in keratinocytes of scleroderma epidermis and mRNA levels of IL-17A and IL-17RA were positively correlated with ICAM-1 [36]. Th17 cells and IL-17A also enhanced the production of the proinflammatory mediators monocyte chemoattractant protein (MCP-1) and IL-8 by fibroblasts [40]. IL-17A was able to activate endothelial cells to secrete IL-6 [50, 51] and this one is up-regulated by cytokines such as IL-1 and platelet-derived growth factor (PDGF) [52]. Serum IL-17A from SSc patients can promote proliferation, migration, collagen synthesis and secretion of SSc patient-derived dermal vascular smooth muscle cells (DVSMCs), which likely further aggravates vasculopathy in SSc [53, 54]. Taken together, these findings indicate a possible role of IL-17 in the early phase of SSc, which is characterized by activation of endothelial cells and inflammatory changes.

Recently, Fava have developed a reliable method to identify and quantify topoisomerase-I- specific CD4⁺ T cells with high specificity and precision. This study determined that in SSc patients with topo-I-specific T cells there are strongly polarization toward a proinflammatory Th17 phenotype and quantitatively association with the presence and progression of lung damage [55]. In SSc, the presence of specific autoantibodies is strongly associated with distinct clinical phenotypes [56]. In particular, anti-topoisomerase-I (topo-I) antibodies have high specificity for scleroderma, and are present in 20–45 % of patients [57, 58].

In summary, the role of IL-17A in SSc pathogenesis is quite conflicting (Figure 2). Although some authors have suggested an anti-fibrotic action for IL-17 (only in human studies), most studies tend to aggregate a pro-fibrotic and proinflammatory role for IL-17A (in both human and animal studies), making this cytokine a potential therapeutic target in SSc.

IL-21

IL-21 is mainly secreted by activated CD4⁺ T cells Th2, Th17 and natural killer (NK) T

cells, but also by B cells, and is a member of the type I cytokine family, which includes IL-2, IL-4 and IL-15 [59, 60, 61, 62, 63]. IL-21 exerts its function through the IL-21 receptor (IL-21R) and potently induces the differentiation of CD4⁺ T cells into Th17 cells in the TGF- β presence and IL-6 absence [44, 64, 65, 66, 67].

One previous study supported the influence of IL-2/IL-21 locus on the genetic susceptibility to SSc [65]. In SSc patients, increased levels of IL-21 in serum and exhaled breath condensate were detected [33, 35]. Besides, Zhou et al. demonstrated higher IL-21 and IL-21R mRNA expression in SSc skin, and this increase was more frequent in patients with diffuse cutaneous form and it was positively correlated with the modified Rodnan score [36]. In a model of fibrosis bleomycin- induced, Lei et al. found increased serum levels of IL-21 and higher CD4⁺ IL-21⁺/IL-21R⁺T cells in peripheral blood and skin and a positive correlation with dermal and pulmonary inflammation and fibrosis [8, 44]. In vitro, IL-21 promoted the differentiation of Th17 cells from CD4⁺ cells isolated from the spleen of BLM-induced mice [8]. Taken together, these findings suggest that IL-21 has a role in the fibrosis development, inducing the differentiation of Th17 cells [8, 44].

A recent report provided evidence for VEGF as a molecular link between vasculopathy and fibrosis in the pathogenesis of SSc, because this molecule was able to induce collagen synthesis in dermal fibroblasts [68]. Zhou et al. showed a positive correlation between mRNA of vascular endothelial growth factor A (VEGFA) and IL-21 and IL-21R [36]. In line with this, Distler found an up-regulation of IL-21R mRNA expression in the epidermis and keratinocytes from SSc

patients compared with healthy controls and a coexpression of IL-21R and VEGF in the skin of patients with SSc [64]. They also demonstrated a moderate expression of VEGF after IL-21 stimulation in cultured keratinocytes [64]. These findings suggest a role of IL-21 in vascular abnormalities and fibrosis in SSc. They also found a positive association between mRNA levels of IL-4 and IL-21/IL-21R, suggesting that this cytokine can promote fibrosis by facilitating the development of Th2 response [36, 69].

On the other hand, studies with cancer patients suggest an opposite role for IL-21 to that observed in SSc studies. In these studies, it has been observed that IL-21 seems to have angiostatic properties, and a decrease in expression of VEGF-A was demonstrated when endothelial cells had been exposed to IL-21, thus reducing angiogenesis in vitro and in vivo [70, 71].

In view of the above, although the role of IL-21 has not yet been elucidated, the studies suggest a profibrotic and proinflammatory role in SSc. The real role of IL-21 in SSc

pathogenesis needs to be better characterized.

IL-22

IL-22 is a member of IL-10 family cytokine, preferentially produced by Th17 and Th22 cells and signals via a heterodimeric receptor consisting of IL-22RA and IL-10RB subunits [72]. The IL-22 receptor is expressed in non-hematopoietic cells of the outer body barriers, in particular, in epithelial cells of the digestive/respiratory tract and keratinocytes in the skin [72]. The real role of IL-22 in autoimmune diseases is still uncertain. It is known that it has a dual nature, protective versus inflammatory, in modulating the responses of the tissue during an immune response [36]. IL-22 may have an important function in the regulation of inflammatory responses, particularly in the skin where it mediates keratinocyte migration and differentiation and epithelial hyperplasia [73, 74, 75, 76].

Mathian et al. observed that a significantly increased proportion of SSc patients had circulating IL-22 levels above detection threshold, as compared with healthy controls [38]. Similarly, increased levels of IL-22 were found in serum and exhaled breath condensate in SSc patients [35]. IL-22⁺ cells were over-represented in the epidermis of SSc patients [77]. Moreover, IL-22 transcripts were found more elevated in SSc skin samples than in healthy controls and their levels were positively correlated with extension of skin involvement [38]. Th22 cells were increased in SSc peripheral blood and there was a correlation with lung involvement [78]. Finally, an association of IL-10RB polymorphisms to diffuse SSc and the presence of the autoantibody anti-topoisomerase I have been reported [79]. All these findings suggest a potential role of IL-22 in SSc pathogenesis.

Brembilla et al. demonstrated the presence of IL-22R in SSc dermal fibroblasts [77]. Besides, IL-22RA expression was up-regulated by TNF and down-regulated by profibrotic cytokines such as IL-4, IL-13, IL-1 β and especially TGF- β , similar to that found in the study of Zhou et al. [36, 77]. In the animal model of lung fibrosis, BLM-treated mice showed a decreased level of IL-22 in lung tissues, the administration of recombinant IL-22 to alveolar epithelial cells ameliorated EMT and the blockage of IL-22 enhanced EMT and intensified lung fibrosis BLM-induced [80].

In contrast lung damage BLM-induced was also reduced in IL22 knockout mice or after anti-IL-22 monoclonal antibody treatment [81]. However, this latter study in particular evidences the complex interrelationship between IL-17A and IL-22, where IL-22 worsen inflammation and epithelial injury in IL-17 competent mice, while has protective effects in IL-17 deficient mice. IL-17A could regulate the expression, proinflammatory

properties, and tissue-protective functions of IL-22, and indicate that the presence or absence of IL-17A probably governs the proinflammatory versus tissue-protective properties of IL-22 in a model of airway damage and inflammation. In view of this, these studies suggested that IL-22/IL-22R1 might play a protective role in SSc fibrosis.

On the other hand, IL-22 can promote fibroblast inflammatory response by enhancing the responses to TNF and keratinocytes in fibroblasts. This was suggested by the increased levels of proinflammatory cytokines MCP-1, IL-8 and MMP-1 in fibroblasts cultured in the presence of IL-22 in conjunction with TNF and by the amplified capacity of the TNF-activated keratinocytes to stimulate fibroblasts [77].

From the foregoing, it is clear that the role of IL-22 in the development of fibrosis in SSc is still uncertain. Although IL-22 may have a direct anti-fibrotic effect, a proinflammatory action may result in the indirect stimulus to the development of fibrosis. More research should guide us to

the real role of IL-22 in SSc pathogenesis.

IL-23

IL-23 belongs to the IL-12 family of cytokines, itself part of the IL-6 superfamily [82]. IL-23 is expressed in macrophages and dendritic cells, and IL-23R is found in memory T cells, natural killer T cells, macrophages, dendritic cells, and naive T cells upon activation by TGF- β and IL-6 [83]. IL-23 is composed of p40 and p19-subunits [84] and signaling requires the engagement of both the IL-12 receptor beta 1 subunit (IL-12R β 1), specific for the p40 subunit of the cytokine, and an interleukin-23 receptor (IL-23R) subunit specific for the unique p19-subunit of IL-23 [83, 85, 86].

IL-23 is known as a survival and proliferative factor for Th17 cells [87] and may have a critical role in stabilization of the Th17 phenotype [88, 89, 90]. In human cells, the IL-23 and IL-1 β seems to induce the Th-17 cells differentiation by expression of IL-17, IL-22, IL-26, interferon, the chemokine CCL20 and *ROR γ t* [91].

Some authors have described elevated serum IL-23 levels in SSc patients [35, 85, 92]. However, this finding was not reproduced in other studies [33, 39]. Serum IL-23 levels were negatively correlated with lung fibrosis, diffusing capacity of the lung for carbon monoxide (DLCO), total lung capacity and the 6-min walk test distance, findings compatible with worse lung disease [33, 35, 92]. Also, concentration of IL-23 has been reported to be elevated in SSc patients with early-stage disease [92]. Polymorphisms in IL23R were associated with anti-topoisomerase I antibody and protective against development of pulmonary hypertension in patients with SSc [93]. However, other

studies did not reveal an association between the IL23R gene and SSc susceptibility and clinical phenotype [85]. IL-23 is expressed in dermal fibroblasts of scleroderma patients [94] and IL-23R expression is increased in T effector cells from SSc patients [31].

The role of the IL-23/IL-17 axis in the establishment of pulmonary and skin inflammation and subsequent fibrosis has been investigated in vitro and in vivo. It has demonstrated increased IL-23p19 and IL-17A expression early in lung tissue after bleomycin stimulation [46]. In IL-23p19 deficient mice, there was impaired lung inflammation and fibrosis, with a reduction in neutrophil

recruitment, TIMP-1 production, MMP-2 activity and collagen content [46]. In line with this, IL-23 injection increased dermal thickness and collagen content in bleomycin-treated mice [94]. Interestingly, while IL-23 decreased expression of type I collagen protein in normal dermal fibroblasts, it up-regulated collagen expression in SSc fibroblasts [94].

These findings support the pro-fibrotic role of IL-23, either by direct action or by stimulating the differentiation of the Th17 pathway, emphasizing this molecule as a potential therapeutic target in SSc.

Future Perspectives

Given the potential participation of Th-17-related cytokines in the pathophysiology of SSc, it has been suggested that they could be a useful biomarker SSc. Evaluation of cytokines levels on serum, skin and lung tissue can reflect some aspects of the disease, suggesting a role as diagnostic and prognostic marker [26, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37]. However, the results are still discrepant and the differences can be explained by several aspects, including heterogeneity within SSc population, differences in disease duration, influence of systemic treatment, sample size, and various quantification methods used.

Modulation of the Th17 pathway has been demonstrated with the use of some medications used in the treatment of SSc. Truchetet et al. showed that PGI₂ analogues, used in the treatment of digital ulcers in scleroderma patients, increased the IL-17A and IL-22 production in vitro and the frequency of Th17 cells in vivo [95]. Dantas et al. found that corticosteroid treatment was not able to change serum concentrations or the in vitro production of IL-17A and IL-6 [96].

Clinical trials have been carried out with biological therapy using as targets IL-17A or IL-17 receptor in other autoimmune and inflammatory disorders such as psoriasis, psoriatic arthritis, inflammatory bowel disease and ankylosing spondylitis, some of them

with good clinical response and already approved for treatment of these diseases [97, 98, 99, 100]. However, as far as we know, there is no ongoing clinical trial evaluating anti-IL-17 drugs in systemic sclerosis (www.clinicaltrials.gov). Once further studied, and the real role of IL17-A established, this target could be tested in clinical trial testing in patients with SSc.

In addition, blocking Th17-inducing cytokines, such as IL-6 and IL-23, may also represent a therapeutic target in SSc. Recently, a phase 2 trial evaluated the safety and efficacy of tocilizumab, an antagonist of IL-6 receptor, showing a tendency to reduce skin thickening and less decline in forced vital capacity in treated patients [101]. A phase III study is currently ongoing (clinicaltrials.gov NCT02453256). Interestingly, a case report of a patient with SSc and psoriasis treated with ustekinumab, an IL-12/IL-23 inhibitor, demonstrated improvement of skin tightening [102]. The role of Th17 cells and cytokines related in the pathophysiology of SSc remains uncertain, and more research studies are required to confirm their real role in the pathogenesis of this disease. In addition to studies using a larger number of populations, we need to standardize cultures in vitro and in vivo, simulating micro-environments in a way more similar to the reality of SSc disease, since Th17 cytokines could be markers of the disease, or even targets for treatment.

Disclosure of interest

The authors report no conflicts of interest

References

1. Hesselstrand R, Scheja A, Akesson A. Mortality and causes of death in a Swedish series of systemic sclerosis patients. *Annals of the rheumatic diseases*. 1998;57:682-6.
2. Steen VD, Medsger TA, Jr. Severe organ involvement in systemic sclerosis with diffuse scleroderma. *Arthritis and rheumatism*. 2000;43:2437-44.
3. Abraham DJ, Varga J. Scleroderma: from cell and molecular mechanisms to disease models. *Trends Immunol*. 2005;26:587-95.
4. O'Reilly S, Hugel T, van Laar JM. T cells in systemic sclerosis: a reappraisal. *Rheumatology*. 2012;51:1540-9.
5. Brembilla NC, Chizzolini C. T cell abnormalities in systemic sclerosis with a focus on Th17 cells. *Eur Cytokine Netw*. 2012;23:128-39.
6. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature immunology*. 2005;6:1123-32.

7. Weaver CT, Elson CO, Fouser LA, Kolls JK. The Th17 pathway and inflammatory diseases of the intestines, lungs, and skin. *Annual review of pathology*. 2013;8:477-512.
8. Lei L, He ZY, Zhao C, Sun XJ, Zhong XN. Elevated frequencies of CD4(+) IL-21(+) T, CD4(+) IL-21R(+) T and IL-21(+) Th17 cells, and increased levels of IL-21 in bleomycin- induced mice may be associated with dermal and pulmonary inflammation and fibrosis. *International journal of rheumatic diseases*. 2016;19:392-404.
9. Stockinger B, Veldhoen M, Martin B. Th17 T cells: linking innate and adaptive immunity. *Seminars in immunology*. 2007;19:353-61.
10. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA, Gorman D, Kastelein RA, Sedgwick JD. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*. 2003;421:744-8.
11. Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, Sedgwick JD, Cua DJ. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *The Journal of experimental medicine*. 2003;198:1951-7.
12. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of experimental medicine*. 2005;201:233-40.
13. Singh RP, Hasan S, Sharma S, Nagra S, Yamaguchi DT, Wong DT, Hahn BH, Hossain A. Th17 cells in inflammation and autoimmunity. *Autoimmunity reviews*. 2014;13:1174-81.
14. Karczewski J, Dobrowolska A, Rychlewska-Hanczewska A, Adamski Z. New insights into the role of T cells in pathogenesis of psoriasis and psoriatic arthritis. *Autoimmunity*. 2016;49:435-50.
15. Egeberg A, Ottosen MB, Gniadecki R, Broesby-Olsen S, Dam TN, Bryld LE, Rasmussen MK, Skov L. Safety, efficacy, and drug survival of biologics and biosimilars for moderate-to- severe plaque psoriasis. *Br J Dermatol*. 2017.
16. Volpe E, Servant N, Zollinger R, Bogiatzi SI, Hupe P, Barillot E, Soumelis V. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and

proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nature immunology*. 2008;9:650-7.

17. Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*. 2006;126:1121-33.

18. Jin D, Zhang L, Zheng J, Zhao Y. The inflammatory Th 17 subset in immunity against self and non-self antigens. *Autoimmunity*. 2008;41:154-62.

19. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor ROR γ . *Nature immunology*. 2008;9:641-9.

20. Duhon T, Geiger R, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nature immunology*. 2009;10:857-63.

21. Trifari S, Kaplan CD, Tran EH, Crellin NK, Spits H. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nature immunology*. 2009;10:864-71.

22. Donnelly RP, Sheikh F, Dickensheets H, Savan R, Young HA, Walter MR. Interleukin- 26: an IL-10-related cytokine produced by Th17 cells. *Cytokine & growth factor reviews*. 2010;21:393-401.

23. Yao Z, Painter SL, Fanslow WC, Ulrich D, Macduff BM, Spriggs MK, Armitage RJ. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *Journal of immunology*. 1995;155:5483-6.

24. Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol*. 2009;9:556-67.

25. Aggarwal S, Gurney AL. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J Leukoc Biol*. 2002;71:1-8.

26. Kurasawa K, Hirose K, Sano H, Endo H, Shinkai H, Nawata Y, Takabayashi K, Iwamoto I. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis and rheumatism*. 2000;43:2455-63.

27. Murata M, Fujimoto M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K, Komura K, Sato S. Clinical association of serum interleukin-17 levels in systemic sclerosis: is systemic sclerosis a Th17 disease? *Journal of dermatological science*. 2008;50:240-2.
28. Yang X, Yang J, Xing X, Wan L, Li M. Increased frequency of Th17 cells in systemic sclerosis is related to disease activity and collagen overproduction. *Arthritis research & therapy*. 2014;16:R4.
29. Fenoglio D, Battaglia F, Parodi A, Stringara S, Negrini S, Panico N, Rizzi M, Kalli F, Conteduca G, Ghio M, De Palma R, Indiveri F, Filaci G. Alteration of Th17 and Treg cell subpopulations co-exist in patients affected with systemic sclerosis. *Clin Immunol*. 2011;139:249-57.
30. Rodriguez-Reyna TS, Furuzawa-Carballeda J, Cabiedes J, Fajardo-Hermosillo LD, Martinez-Reyes C, Diaz-Zamudio M, Llorente L. Th17 peripheral cells are increased in diffuse cutaneous systemic sclerosis compared with limited illness: a cross-sectional study. *Rheumatol Int*. 2012;32:2653-60.
31. Radstake TR, van Bon L, Broen J, Hussiani A, Hesselstrand R, Wuttge DM, Deng Y, Simms R, Lubberts E, Lafyatis R. The pronounced Th17 profile in systemic sclerosis (SSc) together with intracellular expression of TGFbeta and IFNgamma distinguishes SSc phenotypes. *PloS one*. 2009;4:e5903.
32. Truchetet ME, Brembilla NC, Montanari E, Lonati P, Raschi E, Zeni S, Fontao L, Meroni PL, Chizzolini C. Interleukin-17A⁺ cell counts are increased in systemic sclerosis skin and their number is inversely correlated with the extent of skin involvement. *Arthritis and rheumatism*. 2013;65:1347-56.
33. Olewicz-Gawlik A, Danczak-Pazdrowska A, Kuznar-Kaminska B, Gornowicz-Porowska J, Katulska K, Trzybulska D, Batura-Gabryel H, Silny W, Poplawski D, Hrycaj P. Interleukin-17 and interleukin-23: importance in the pathogenesis of lung impairment in patients with systemic sclerosis. *International journal of rheumatic diseases*. 2014;17:664- 70.
34. Balanescu P, Ladaru A, Balanescu E, Nicolau A, Baicus C, Dan GA. IL-17, IL-6 and IFN- gamma in Systemic Sclerosis Patients. *Rom J Intern Med*. 2015;53:44-9.
35. Rolla G, Fusaro E, Nicola S, Bucca C, Peroni C, Parisi S, Cassinis MC, Ferraris A,

Angelino F, Heffler E, Boita M, Brussino L. Th-17 cytokines and interstitial lung involvement in systemic sclerosis. *J Breath Res.* 2016;10:046013.

36. Zhou Y, Hou W, Xu K, Han D, Jiang C, Mou K, Li Y, Meng L, Lu S. The elevated expression of Th17-related cytokines and receptors is associated with skin lesion severity in early systemic sclerosis. *Human immunology.* 2015;76:22-9.

37. Nakashima T, Jinnin M, Yamane K, Honda N, Kajihara I, Makino T, Masuguchi S, Fukushima S, Okamoto Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Ihn H. Impaired IL-17 signaling pathway contributes to the increased collagen expression in scleroderma fibroblasts. *Journal of immunology.* 2012;188:3573-83.

38. Mathian A, Parizot C, Dorgham K, Trad S, Arnaud L, Larsen M, Miyara M, Hie M, Piette JC, Frances C, Yssel H, Amoura Z, Gorochoff G. Activated and resting regulatory T cell exhaustion concurs with high levels of interleukin-22 expression in systemic sclerosis lesions. *Annals of the rheumatic diseases.* 2012;71:1227-34.

39. Gourh P, Arnett FC, Assassi S, Tan FK, Huang M, Diekman L, Mayes MD, Reveille JD, Agarwal SK. Plasma cytokine profiles in systemic sclerosis: associations with autoantibody subsets and clinical manifestations. *Arthritis research & therapy.* 2009;11:R147.

40. Brembilla NC, Montanari E, Truchetet ME, Raschi E, Meroni P, Chizzolini C. Th17 cells favor inflammatory responses while inhibiting type I collagen deposition by dermal fibroblasts: differential effects in healthy and systemic sclerosis fibroblasts. *Arthritis research & therapy.* 2013;15:R151.

41. Yoshizaki A, Yanaba K, Iwata Y, Komura K, Ogawa A, Akiyama Y, Muroi E, Hara T, Ogawa F, Takenaka M, Shimizu K, Hasegawa M, Fujimoto M, Tedder TF, Sato S. Cell adhesion molecules regulate fibrotic process via Th1/Th2/Th17 cell balance in a bleomycin-induced scleroderma model. *Journal of immunology.* 2010;185:2502-15.

42. Okamoto Y, Hasegawa M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Huu DL, Iwakura Y, Fujimoto M, Takehara K. Potential roles of interleukin-17A in the development of skin fibrosis in mice. *Arthritis and rheumatism.* 2012;64:3726-35.

43. Mi S, Li Z, Yang HZ, Liu H, Wang JP, Ma YG, Wang XX, Liu HZ, Sun W, Hu ZW. Blocking IL-17A promotes the resolution of pulmonary inflammation and fibrosis via TGF-beta1- dependent and -independent mechanisms. *Journal of immunology.*

2011;187:3003-14.

44. Lei L, Zhong XN, He ZY, Zhao C, Sun XJ. IL-21 induction of CD4⁺ T cell differentiation into Th17 cells contributes to bleomycin-induced fibrosis in mice. *Cell Biol Int*. 2015;39:388-99.

45. Simonian PL, Roark CL, Wehrmann F, Lanham AK, Diaz del Valle F, Born WK, O'Brien RL, Fontenot AP. Th17-polarized immune response in a murine model of hypersensitivity pneumonitis and lung fibrosis. *Journal of immunology*. 2009;182:657-65.

46. Gasse P, Riteau N, Vacher R, Michel ML, Fautrel A, di Padova F, Fick L, Charron S, Lagente V, Eberl G, Le Bert M, Quesniaux VF, Huaux F, Leite-de-Moraes M, Ryffel B, Couillin I. IL-1 and IL-23 mediate early IL-17A production in pulmonary inflammation leading to late fibrosis. *PloS one*. 2011;6:e23185.

47. Wilson MS, Madala SK, Ramalingam TR, Gochuico BR, Rosas IO, Cheever AW, Wynn TA. Bleomycin and IL-1 β -mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. *The Journal of experimental medicine*. 2010;207:535-52.

48. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:221-33.

49. Brown M, Postlethwaite AE, Myers LK, Hasty KA. Supernatants from culture of type I collagen-stimulated PBMC from patients with cutaneous systemic sclerosis versus localized scleroderma demonstrate suppression of MMP-1 by fibroblasts. *Clin Rheumatol*. 2012;31:973-81.

50. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, Pin JJ, Garrone P, Garcia E, Saeland S, Blanchard D, Gaillard C, Das Mahapatra B, Rouvier E, Golstein P, Banchereau J, Lebecque S. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *The Journal of experimental medicine*. 1996;183:2593-603.

51. Asano Y, Sato S. Vasculopathy in scleroderma. *Seminars in immunopathology*. 2015;37:489-500.

52. Sakkas LI, Platsoucas CD. Is systemic sclerosis an antigen-driven T cell disease? *Arthritis and rheumatism*. 2004;50:1721-33.

53. Liu M, Yang J, Xing X, Cui X, Li M. Interleukin-17A promotes functional activation of systemic sclerosis patient-derived dermal vascular smooth muscle cells by extracellular- regulated protein kinases signalling pathway. *Arthritis research & therapy*. 2014;16:4223.
54. Liu M, Yang J, Li M. Tanshinone IIA attenuates interleukin-17A-induced systemic sclerosis patient-derived dermal vascular smooth muscle cell activation via inhibition of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. *Clinics (Sao Paulo)*. 2015;70:250-6.
55. Fava A, Cimbri R, Wigley FM, Liu QR, Rosen A, Boin F. Frequency of circulating topoisomerase-I-specific CD4 T cells predicts presence and progression of interstitial lung disease in scleroderma. *Arthritis research & therapy*. 2016;18:99.
56. Boin F, Rosen A. Autoimmunity in systemic sclerosis: current concepts. *Current rheumatology reports*. 2007;9:165-72.
57. Reveille JD, Solomon DH, American College of Rheumatology Ad Hoc Committee of Immunologic Testing G. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: anticentromere, Scl-70, and nucleolar antibodies. *Arthritis and rheumatism*. 2003;49:399- 412.
58. Walker UA, Tyndall A, Czirjak L, Denton C, Farge-Bancel D, Kowal-Bielecka O, Muller-Ladner U, Bocelli-Tyndall C, Matucci-Cerinic M. Clinical risk assessment of organ manifestations in systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials And Research group database. *Annals of the rheumatic diseases*. 2007;66:754-63.
59. Wurster AL, Rodgers VL, Satoskar AR, Whitters MJ, Young DA, Collins M, Grusby MJ. Interleukin 21 is a T helper (Th) cell 2 cytokine that specifically inhibits the differentiation of naive Th cells into interferon gamma-producing Th1 cells. *The Journal of experimental medicine*. 2002;196:969-77.
60. Wei L, Laurence A, Elias KM, O'Shea JJ. IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL- 17 production in a STAT3-dependent manner. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282:34605-10.
61. Parrish-Novak J, Foster DC, Holly RD, Clegg CH. Interleukin-21 and the IL-21 receptor: novel effectors of NK and T cell responses. *J Leukoc Biol*. 2002;72:856-63.
62. Ozaki K, Spolski R, Ettinger R, Kim HP, Wang G, Qi CF, Hwu P, Shaffer DJ,

- Akilesh S, Roopenian DC, Morse HC, 3rd, Lipsky PE, Leonard WJ. Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *Journal of immunology*. 2004;173:5361-71.
63. Mehta DS, Wurster AL, Grusby MJ. Biology of IL-21 and the IL-21 receptor. *Immunological reviews*. 2004;202:84-95.
64. Distler JH, Jungel A, Kowal-Bielecka O, Michel BA, Gay RE, Sprott H, Matucci-Cerinic M, Chilla M, Reich K, Kalden JR, Muller-Ladner U, Lorenz HM, Gay S, Distler O. Expression of interleukin-21 receptor in epidermis from patients with systemic sclerosis. *Arthritis and rheumatism*. 2005;52:856-64.
65. Diaz-Gallo LM, Simeon CP, Broen JC, Ortego-Centeno N, Beretta L, Vonk MC, Carreira PE, Vargas S, Roman-Ivorra JA, Gonzalez-Gay MA, Tolosa C, Lopez-Longo FJ, Espinosa G, Vicente EF, Hesselstrand R, Riemekasten G, Witte T, Distler JH, Voskuyl AE, Schuerwegh AJ, Shiels PG, Nordin A, Padyukov L, Hoffmann-Vold AM, Scorza R, Lunardi C, Airo P, van Laar JM, Hunzelmann N, Gathof BS, Kreuter A, Herrick A, Worthington J, Denton CP, Zhou X, Arnett FC, Fonseca C, Koeleman BP, Assasi S, Radstake TR, Mayes MD, Martin J, Spanish Scleroderma G. Implication of IL-2/IL-21 region in systemic sclerosis genetic susceptibility. *Annals of the rheumatic diseases*. 2013;72:1233-8.
66. Jones JL, Phuah CL, Cox AL, Thompson SA, Ban M, Shawcross J, Walton A, Sawcer SJ, Compston A, Coles AJ. IL-21 drives secondary autoimmunity in patients with multiple sclerosis, following therapeutic lymphocyte depletion with alemtuzumab (Campath-1H). *The Journal of clinical investigation*. 2009;119:2052-61.
67. Zhou L, Ivanov, II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, Levy DE, Leonard WJ, Littman DR. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nature immunology*. 2007;8:967-74.
68. Maurer B, Distler A, Suliman YA, Gay RE, Michel BA, Gay S, Distler JH, Distler O. Vascular endothelial growth factor aggravates fibrosis and vasculopathy in experimental models of systemic sclerosis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2014;73:1880-7.
69. Frohlich A, Marsland BJ, Sonderegger I, Kurrer M, Hodge MR, Harris NL, Kopf M. IL-21 receptor signaling is integral to the development of Th2 effector responses in vivo. *Blood*. 2007;109:2023-31.

70. Castermans K, Tabruyn SP, Zeng R, van Beijnum JR, Eppolito C, Leonard WJ, Shrikant PA, Griffioen AW. Angiostatic activity of the antitumor cytokine interleukin-21. *Blood*. 2008;112:4940-7.
71. Moroz A, Eppolito C, Li Q, Tao J, Clegg CH, Shrikant PA. IL-21 enhances and sustains CD8⁺ T cell responses to achieve durable tumor immunity: comparative evaluation of IL-2, IL-15, and IL-21. *Journal of immunology*. 2004;173:900-9.
72. Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, Pallotta S, Cianfarani F, Odorisio T, Traidl-Hoffmann C, Behrendt H, Durham SR, Schmidt-Weber CB, Cavani A. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119:3573-85.
73. Zenewicz LA, Flavell RA. Recent advances in IL-22 biology. *International immunology*. 2011;23:159-63.
74. Wolk K, Haugen HS, Xu W, Witte E, Waggie K, Anderson M, Vom Baur E, Witte K, Warszawska K, Philipp S, Johnson-Leger C, Volk HD, Sterry W, Sabat R. IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN-gamma are not. *J Mol Med (Berl)*. 2009;87:523-36.
75. Aden N, Shiwen X, Aden D, Black C, Nuttall A, Denton CP, Leask A, Abraham D, Stratton R. Proteomic analysis of scleroderma lesional skin reveals activated wound healing phenotype of epidermal cell layer. *Rheumatology*. 2008;47:1754-60.
76. Van Praet JT, Smith V, Haspeslagh M, Degryse N, Elewaut D, De Keyser F. Histopathological cutaneous alterations in systemic sclerosis: a clinicopathological study. *Arthritis research & therapy*. 2011;13:R35.
77. Brembilla NC, Dufour AM, Alvarez M, Hugues S, Montanari E, Truchetet ME, Lonati P, Fontao L, Gabrielli A, Vettori S, Valentini G, Boehncke WH, Meroni P, Chizzolini C. IL-22 capacitates dermal fibroblast responses to TNF in scleroderma. *Annals of the rheumatic diseases*. 2016;75:1697-705.
78. Truchetet ME, Brembilla NC, Montanari E, Allanore Y, Chizzolini C. Increased frequency of circulating Th22 in addition to Th17 and Th2 lymphocytes in systemic sclerosis: association with interstitial lung disease. *Arthritis research & therapy*. 2011;13:R166.
79. Hikami K, Ehara Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Matsushita M, Oka T, Takehara K, Sato S, Tokunaga K, Tsuchiya N. Association of IL-10 receptor 2 (IL10RB) SNP with

systemic sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;373:403-7.

80. Liang M, Wang J, Chu H, Zhu X, He H, Liu Q, Qiu J, Zhou X, Guan M, Xue Y, Chen X, Zou H. Interleukin-22 inhibits bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:209179.

81. Sonnenberg GF, Nair MG, Kirn TJ, Zaph C, Fouser LA, Artis D. Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. *The Journal of experimental medicine*. 2010;207:1293-305.

82. Duvallet E, Semerano L, Assier E, Falgarone G, Boissier MC. Interleukin-23: a key cytokine in inflammatory diseases. *Ann Med*. 2011;43:503-11.

83. Parham C, Chirica M, Timans J, Vaisberg E, Travis M, Cheung J, Pflanz S, Zhang R, Singh KP, Vega F, To W, Wagner J, O'Farrell AM, McClanahan T, Zurawski S, Hannum C, Gorman D, Rennick DM, Kastelein RA, de Waal Malefyt R, Moore KW. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *Journal of immunology*. 2002;168:5699-708.

84. Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, Zonin F, Vaisberg E, Churakova T, Liu M, Gorman D, Wagner J, Zurawski S, Liu Y, Abrams JS, Moore KW, Rennick D, de Waal-Malefyt R, Hannum C, Bazan JF, Kastelein RA. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*. 2000;13:715-25.

85. Rueda B, Broen J, Torres O, Simeon C, Ortego-Centeno N, Schrijvenaars MM, Vonk MC, Fonollosa V, van den Hoogen FH, Coenen MJ, Sanchez-Roman J, Aguirre-Zamorano MA, Garcia-Portales R, Pros A, Camps MT, Gonzalez-Gay MA, Martin J, Radstake TR. The interleukin 23 receptor gene does not confer risk to systemic sclerosis and is not associated with systemic sclerosis disease phenotype. *Annals of the rheumatic diseases*. 2009;68:253- 6.

86. Wines BD, Yap ML, Powell MS, Tan PS, Ko KK, Orlowski E, Hogarth PM. Distinctive expression of Interleukin-23 receptor subunits on human Th17 and gammadelta T cells. *Immunol Cell Biol*. 2016.

87. Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278:1910-4.

88. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006;441:235-8.
89. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*. 2006;441:231-4.
90. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006;24:179-89.
91. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, Basham B, Smith K, Chen T, Morel F, Lecron JC, Kastelein RA, Cua DJ, McClanahan TK, Bowman EP, de Waal Malefyt R. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nature immunology*. 2007;8:950-7.
92. Komura K, Fujimoto M, Hasegawa M, Ogawa F, Hara T, Muroi E, Takehara K, Sato S. Increased serum interleukin 23 in patients with systemic sclerosis. *The Journal of rheumatology*. 2008;35:120-5.
93. Agarwal SK, Gourh P, Shete S, Paz G, Divecha D, Reveille JD, Assassi S, Tan FK, Mayes MD, Arnett FC. Association of interleukin 23 receptor polymorphisms with anti-topoisomerase-I positivity and pulmonary hypertension in systemic sclerosis. *The Journal of rheumatology*. 2009;36:2715-23.
94. Nakayama W, Jinnin M, Tomizawa Y, Nakamura K, Kudo H, Inoue K, Makino K, Honda N, Kajihara I, Fukushima S, Ihn H. Dysregulated interleukin-23 signalling contributes to the increased collagen production in scleroderma fibroblasts via balancing microRNA expression. *Rheumatology*. 2017;56:145-55.
95. Truchetet ME, Allanore Y, Montanari E, Chizzolini C, Brembilla NC. Prostaglandin I(2) analogues enhance already exuberant Th17 cell responses in systemic sclerosis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2012;71:2044-50.
96. Dantas AT, de Almeida AR, Sampaio M, Cordeiro MF, da Rocha LF, Jr., de Oliveira PSS, Pereira MC, de Melo Rego MJB, Marques CDL, da Rocha Pitta I, Duarte A, da Rocha Pitta MG. Corticosteroid inhibits chemokines production in systemic sclerosis patients. *Steroids*. 2017;127:24-30.

97. Leonardi CL. Antibodies in the Treatment of Psoriasis: IL-12/23 p40 and IL-17a. *Semin Cutan Med Surg*. 2016;35:S74-7.
98. Lebwohl M, Leonardi C, Griffiths CE, Prinz JC, Szapary PO, Yeilding N, Guzzo C, Li S, Hsu MC, Strober B. Long-term safety experience of ustekinumab in patients with moderate- to-severe psoriasis (Part I of II): results from analyses of general safety parameters from pooled Phase 2 and 3 clinical trials. *J Am Acad Dermatol*. 2012;66:731-41.
99. Kavanaugh A, Ritchlin C, Rahman P, Puig L, Gottlieb AB, Li S, Wang Y, Noonan L, Brodmerkel C, Song M, Mendelsohn AM, McInnes IB, Psummit, Study G. Ustekinumab, an anti-IL-12/23 p40 monoclonal antibody, inhibits radiographic progression in patients with active psoriatic arthritis: results of an integrated analysis of radiographic data from the phase 3, multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled PSUMMIT-1 and PSUMMIT-2 trials. *Annals of the rheumatic diseases*. 2014;73:1000-6.
100. Menter A, Cather JC, Jarratt M, Meng X, Guana A, Nyirady J. Efficacy of Secukinumab on Moderate-to-severe Plaque Psoriasis Affecting Different Body Regions: a Pooled Analysis of Four Phase 3 Studies. *Dermatol Ther (Heidelb)*. 2016.
101. Khanna D, Denton CP, Jahreis A, van Laar JM, Frech TM, Anderson ME, Baron M, Chung L, Fierlbeck G, Lakshminarayanan S, Allanore Y, Pope JE, Riemekasten G, Steen V, Muller-Ladner U, Lafyatis R, Stifano G, Spotswood H, Chen-Harris H, Dziadek S, Morimoto A, Sornasse T, Siegel J, Furst DE. Safety and efficacy of subcutaneous tocilizumab in adults with systemic sclerosis (faSScinate): a phase 2, randomised, controlled trial. *Lancet*. 2016;387:2630-40.
102. Ichihara A, Jinnin M, Ihn H. Treatment of psoriasis with ustekinumab improved skin tightening in systemic sclerosis. *Clinical and experimental rheumatology*. 2017.

Legends

Figure 1. Th naïve cells when stimulated by IL-12 are Th1-polarized, and IFN is the major secreted cytokine. On the other hand, iL-12 down-regulated the expression of RORc Under the effect of IL-4, Th2 mainly produces IL-5, IL-4 and IL-13. These last ones appear to be stimulated by IL- 21 to induce Th2-dependent fibrotic response. Th naïve cells on the effect of specific cytokines like IL-23, IL1, TGF and IL-6 drive the expression of RORc, the transcription factor of the Th17 pathway ((pronounced Th17).)

Once activated, ROR γ c induces the production of the interleukin 17A/F and 22 transcripts, and STAT3 induces IL-21 production. Th17 pathway products appear to influence both fibrosis and inflammation. Note is made to the appearance of Th22 cells. **IL=interleukin; IFN: interferon; Th: T helper**

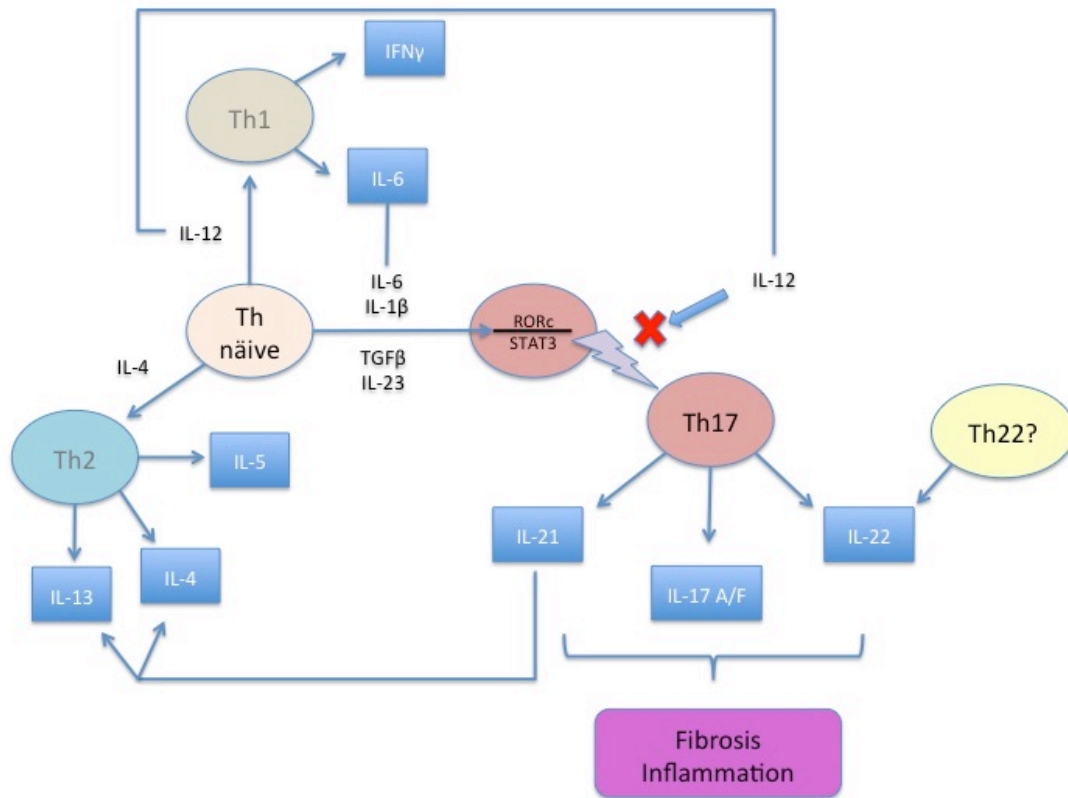
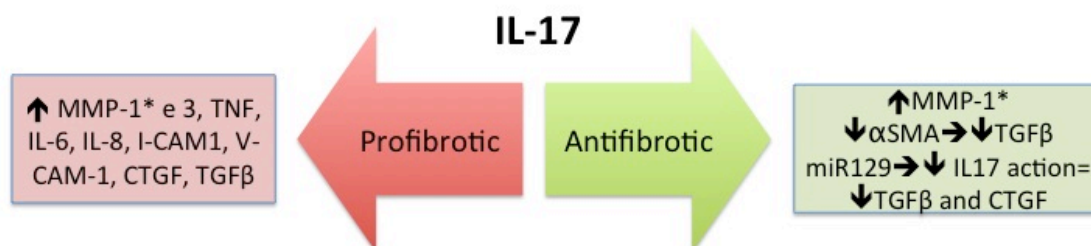


Figure 2. The figure schematically represents a summary of the actions of IL-17 on the one hand as the protagonist of fibrosis, on the other hand as a protector of the fibrotic process. *MMP-1 has an uncertain role.



MMP – matrix metalloproteinases; **TNF** – tumoral necrosis fator; **I-CAM**: intercellular adhesion molecule; **V- CAM** - vascular adhesion molecule ; **CTGF**- connective tissue growth factor ; **TGF** - Transforming growth factor; **miR** – microRNA; **SMA** - smooth muscle actin

Instructions for authors to submitted articles in **Autoimmunity**

About the journal

Autoimmunity is an international, peer reviewed journal, publishing high-quality, original research. Please see the journal's [Aims & Scope](#) for information about its focus and peer-review policy.

Please note that this journal only publishes manuscripts in English.

This journal accepts the following article types: Original Articles, Review Articles, Letters to the Editor, Commentaries and Book Reviews.

Original articles should include the following distinct sections:

6. Introduction: This section should state the background to and purpose of the study.

7. Methods: Please identify the methods, mechanisms, and procedures in sufficient detail to allow others to reproduce the results, and describe statistical methods with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. Autoimmunity requires that studies involving animals/humans be approved by an institutional review board, in accordance with approved published guidelines, prior to actually performing the research

and publishing the data. This approval should be explicitly stated in the methods section.

8. Results: Please present your results concisely and accurately. For studies reporting clinical trials, include the sample size of each data point, with p-values and confidence intervals quoted for both significant and non-significant findings.
9. Discussion and Conclusions: This should include implications of the findings and their limitations, with reference to other relevant studies and the possibilities these suggest for future research.

The body of a **Review Article** should be a comprehensive, scholarly evidence-based review of the literature, accompanied by critical analysis and leading to reasonable conclusions. Wherever appropriate, details of the literature search methodology should be provided, i.e. the databases searched, the search terms and inclusive dates, and any selectivity criteria imposed. Wherever possible, use primary resources, avoiding "Data on File", "Poster" or other unpublished references.

Letters to the Editor will be considered for publication subject to editor approval and provided that the content relates to articles published in the journal. Letters should be received less than six months after publication of the original work in question. Pending editor approval, letters will be submitted to the author of the original paper in order that a reply be published simultaneously.

Commentaries: All commentary topics must be checked with the editor prior to submission. Commentaries should be knowledge-based or consensus-type articles (e.g. working group statement) expressing objective opinions, experiences or perspectives on an important area related to autoimmunity.

Book Reviews: Autoimmunity considers a limited number of book reviews. Book review ideas must be checked with the editor prior to submission.

Peer review

Taylor & Francis is committed to peer-review integrity and upholding the highest standards of review. Once your paper has been assessed for suitability by the editor, it will then be single blind peer-reviewed by independent, anonymous expert referees. Find out more about [what to expect during peer review](#) and read our guidance on [publishing ethics](#).

Preparing your paper

All authors submitting to medicine, biomedicine, health sciences, allied and public health journals should conform to the [Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals](#), prepared by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE).

Structure

Your paper should be compiled in the following order: title page; abstract; keywords; main text to be structured in this order introduction, methods, results, discussion and conclusion; acknowledgments; declaration of interest statement; references; appendices (as appropriate); table(s) with caption(s) (on individual pages); figures; figure captions (as a list).

Word limits

Please include a word count for your paper.

A typical paper for this journal should be no more than 6000 words; this limit does not include tables, references, figure captions, footnotes, endnotes.

Style guidelines

Please refer to these [style guidelines](#) when preparing your paper, rather than any published articles or a sample copy.

Please use American spelling style consistently throughout your manuscript.

Please use double quotation marks, except where "a quotation is 'within' a quotation". Please note that long quotations should be indented without quotation marks. Autoimmunity conforms to the CSE style guidelines, using the NLM style for references. For general abbreviations and nomenclature, authors should consult the latest edition of the *Scientific Style and Format: The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers*. Authors should write in clear, concise English. Language and grammar should be consistent with Fowler's *English Usage*; spelling and meaning of words should conform to Webster's Dictionary. If English is not your native language, please ensure the manuscript has been reviewed by a native speaker. **Please note: extensive rewriting of the text will not be undertaken by the editorial staff.**

For editing resources available to authors please see [Taylor & Francis Editing Services](#). Please note the following general style guidelines:

Do not use the term "significant" unless p-values are provided. Show p-values as <0.001 or to 2 or 3 decimal places.

Units and Measurement: the *Système International* (SI) system should be used for all scientific units. Authors can refer to the SI Conversion Calculator to convert conventional units into SI units. Please refer to the *The CSE Manual for Authors* for appropriate metric symbols.

When a trademarked pharmaceutical or other product is named in the research, it must be accompanied by the generic name as well. According to journal style, after first mention, only the generic name should be used. Do not use proprietary names in article titles or in the abstract.

Latin terminology, including microbiological and species nomenclature, should be italicized. However, for gene symbols, please favour accepted abbreviations rather than full spellings (see the specific nomenclature guidelines below).

Upper case characters in headings and references should be used sparingly, e.g. only the first word of paper titles, subheadings and any proper nouns begin upper case; similarly for the titles of papers from journals in the references and elsewhere.

All acronyms for national agencies, examinations, etc., should be spelled out the first time they are introduced in text or references. Thereafter the acronym can be used if appropriate, e.g. "The work of the Assessment of Performance Unit (APU) in the early 1980s ..." and subsequently, "The APU studies of achievement ...", in a reference "(Department of Education and Science [DES] 1989a)"

Wherever possible, please do not label people according to their disability or disease. Instead, use person-first language (persons with diabetes, children with asthma, etc)

Please do not use commas in numbers with more than three digits. In 4-digit numbers, the digits are set closed up. For numbers of 10 000 or greater, a half-space or thin space is used to separate every digit from the right-most integer or decimal point. For decimals, use the form 0.05 (not .05, $\times 05$ or 0×05)

Please note the specific nomenclature guidelines below:

Use the gene symbols recommended by HUGO Gene Nomenclature Committee (HGN C). For more information, please visit www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature

For chemical nomenclature, please use the Subject Index of Chemical Abstracts.

Formatting and templates

Papers may be submitted in any standard format, including Word and LaTeX. Figures should be saved separately from the text. To assist you in preparing your paper, we provide formatting templates.

A [LaTeX template](#) is available for this journal.

[Word templates](#) are available for this journal. Please save the template to your hard drive, ready for use.

If you are not able to use the templates via the links (or if you have any other template queries) please contact authortemplate@tandf.co.uk

References

Please use this [reference style guide](#) when preparing your paper. An [EndNote output style](#) is also available to assist you.

Checklist: what to include

Author details. Please ensure everyone meeting the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) [requirements for authorship](#) is included as an author of your paper. Please include all authors' full names, affiliations, postal addresses, telephone numbers and email addresses on the title page. Where available, please also include [ORCID identifiers](#) and social media handles (Facebook, Twitter or LinkedIn). One author will need to be identified as the corresponding author, with their email address normally displayed in the article PDF (depending on the journal) and the online article. Authors' affiliations are the affiliations where the research was conducted. If any of the named co-authors moves affiliation during the peer-review process, the new affiliation can be given as a footnote. Please note that no changes to affiliation can be made after your paper is accepted. [Read more on authorship](#).

A non-structured **abstract** of no more than 500 words. Read tips on [writing your abstract](#).

Graphical abstract (Not mandatory). This is an image to give readers a clear idea of the content of your article. It should be a maximum width of 525 pixels. If your image is narrower than 525 pixels, please place it on a white background 525 pixels wide to ensure the dimensions are maintained. Save the graphical abstract as a .jpg, .png, or .gif. Please do not embed it in the manuscript file but save it as a separate file, labelled GraphicalAbstract1.

You can opt to include a **video abstract** with your article. [Find out how these can help your work reach a wider audience, and what to think about when filming](#).

At least five (5) **keywords**. Read [making your article more discoverable](#), including information on choosing a title and search engine optimization.

Funding details. Please supply all details required by your funding and grant-awarding bodies as follows:

For single agency grants: This work was supported by the[Funding Agency] under Grant [number xxxx].

For multiple agency grants: This work was supported by the [funding Agency 1]; under Grant [number xxxx]; [Funding Agency 2] under Grant [number xxxx]; and [Funding Agency 3] under Grant [number xxxx].

Disclosure statement. This is to acknowledge any financial interest or benefit that has arisen from the direct applications of your research. [Further guidance on what is a conflict of interest and how to disclose it](#).

Biographical note (Not mandatory) . Please supply a short biographical note for each author. This could be adapted from your departmental website or academic networking profile and should be relatively brief.

Geolocation information (Not mandatory) . Submitting a geolocation information section, as a separate paragraph before your acknowledgements, means we can index your paper's study area accurately in JournalMap's geographic literature database and [make your article more discoverable to others](#).

Supplemental online material. Supplemental material can be a video, dataset, fileset,

sound file or anything which supports (and is pertinent to) your paper. We publish supplemental material online via Figshare. Find out more about [supplemental material and how to submit it with your article](#).

Figures. Figures should be high quality (1200 dpi for line art, 600 dpi for grayscale and 300 dpi for color, at the correct size). Figures should be saved as TIFF, PostScript or EPS files. More information on [how to prepare artwork](#).

Tables. Tables should present new information rather than duplicating what is in the text. Readers should be able to interpret the table without reference to the text. Please supply editable files.

Equations. If you are submitting your manuscript as a Word document, please ensure that equations are editable. More information about [mathematical symbols and equations](#).

Units. Please use [SI units](#) (non-italicized).

Using third-party material in your paper

You must obtain the necessary permission to reuse third-party material in your article. The use of short extracts of text and some other types of material is usually permitted, on a limited basis, for the purposes of criticism and review without securing formal permission. If you wish to include any material in your paper for which you do not hold copyright, and which is not covered by this informal agreement, you will need to obtain written permission from the copyright owner prior to submission. More information on [requesting permission to reproduce work\(s\) under copyright](#).

Disclosure statement

Please include a disclosure of interest statement, using the subheading "Disclosure of interest." If you have no interests to declare, please state this (suggested wording: The authors report no conflicts of interest). For all NIH/Wellcome-funded papers, the grant number(s) must be included in the disclosure of interest statement. [Read more on declaring conflicts of interest](#).

Clinical Trials Registry

In order to be published in a Taylor & Francis journal, all clinical trials must have been registered in a public repository at the beginning of the research process (prior to patient enrolment). Trial registration numbers should be included in the abstract, with full details in the methods section. The registry should be publicly accessible (at no charge), open to all prospective registrants, and managed by a not-for-profit organization. For a list of registries that meet these requirements, please visit the [WHO International Clinical Trials Registry Platform \(ICTRP\)](#). The registration of all clinical trials facilitates the sharing of information among clinicians, researchers, and patients, enhances public confidence in research, and is in accordance with the [ICMJE guidelines](#).

Complying with ethics of experimentation

Please ensure that all research reported in submitted papers has been conducted in an ethical and responsible manner, and is in full compliance with all relevant codes of experimentation and legislation. All papers which report in vivo experiments or clinical trials on humans or animals must include a written statement in the Methods section. This should explain that all work was conducted with the formal approval of the local human subject or animal care committees (institutional and national), and that clinical trials have been registered as legislation requires. Authors who do not have formal ethics review committees should include a statement that their study follows the principles of the [Declaration of Helsinki](#).

Consent

All authors are required to follow the [ICMJE requirements](#) on privacy and informed consent from patients and study participants. Please confirm that any patient, service

user, or participant (or that person's parent or legal guardian) in any research, experiment, or clinical trial described in your paper has given written consent to the inclusion of material pertaining to themselves, that they acknowledge that they cannot be identified via the paper; and that you have fully anonymized them. Where someone is deceased, please ensure you have written consent from the family or estate. Authors may use this [Patient Consent Form](#), which should be completed, saved, and sent to the journal if requested.

Health and safety

Please confirm that all mandatory laboratory health and safety procedures have been complied with in the course of conducting any experimental work reported in your paper. Please ensure your paper contains all appropriate warnings on any hazards that may be involved in carrying out the experiments or procedures you have described, or that may be involved in instructions, materials, or formulae.

Please include all relevant safety precautions; and cite any accepted standard or code of practice. Authors working in animal science may find it useful to consult the [International Association of Veterinary Editors' Consensus Author Guidelines on Animal Ethics and Welfare and Guidelines for the Treatment of Animals in Behavioural Research and Teaching](#). When a product has not yet been approved by an appropriate regulatory body for the use described in your paper, please specify this, or that the product is still investigational.

Submitting your paper

This journal uses ScholarOne Manuscripts to manage the peer-review process. If you haven't submitted a paper to this journal before, you will need to create an account in the submission centre. Please read the guidelines above and then [submit your paper in the relevant author centre](#) where you will find user guides and a helpdesk.

If you are submitting in LaTeX, please convert the files to PDF beforehand (you may also need to upload or send your LaTeX source files with the PDF).

Please note that Autoimmunity uses [Crossref™](#) to screen papers for unoriginal material. By submitting your paper to Autoimmunity you are agreeing to originality checks during the peer-review and production processes.

On acceptance, we recommend that you keep a copy of your Accepted Manuscript. Find out more about [sharing your work](#).

Publication charges

There are no submission fees or page charges for this journal.

Color figures will be reproduced in color in your online article free of charge. If it is necessary for the figures to be reproduced in color in the print version, a charge will apply.

Charges for color figures in print are £250 per figure (\$395 US Dollars; \$385 Australian Dollars; €315). For more than 4 color figures, figures 5 and above will be charged at £50 per figure (\$80 US Dollars; \$75 Australian Dollars; €63). Depending on your location, these charges may be subject to local taxes.

Copyright options

Copyright allows you to protect your original material, and stop others from using your work without your permission. Taylor & Francis offers a number of different license and reuse options, including Creative Commons licenses when publishing open access. [Read more on publishing agreements](#).

Complying with funding agencies

We will deposit all National Institutes of Health or Wellcome Trust-funded papers into PubMedCentral on behalf of authors, meeting the requirements of their respective open access (OA) policies. If this applies to you, please tell our production team when you

receive your article proofs, so we can do this for you. Check funders' OA policy mandates [here](#). Find out more about [sharing your work](#).

Open access

This journal gives authors the option to publish open access via our [Open Select publishing program](#), making it free to access online immediately on publication. Many funders mandate publishing your research open access; you can check [open access funder policies and mandates here](#).

Taylor & Francis Open Select gives you, your institution or funder the option of paying an article publishing charge (APC) to make an article open access. Please contact openaccess@tandf.co.uk if you would like to find out more, or go to our [Author Services website](#).

For more information on license options, embargo periods and APCs for this journal please search for the journal in our [journal list](#).

Accepted Manuscripts Online (AMO)

This journal publishes manuscripts online as rapidly as possible, as a PDF of the final, accepted (but unedited and uncorrected) paper. This is clearly identified as an unedited manuscript and is referred to as the Accepted Manuscript Online (AMO). No changes will be made to the content of the original paper for the AMO version but, after copy-editing, typesetting, and review of the resulting proof, the final corrected version (the Version of Record [VoR]), will be published, replacing the AMO version.

The VoR is the article version that will appear in an issue of the journal. Both the AMO version and VoR can be cited using the same DOI (digital object identifier). To ensure rapid publication, we ask you to return your signed publishing agreement as quickly as possible, and return corrections within 48 hours of receiving your proofs.

My Authored Works

On publication, you will be able to view, download and check your article's metrics (downloads, citations and Altmetric data) via [My Authored Works](#) on Taylor & Francis Online. This is where you can access every article you have published with us, as well as your [free eprints link](#), so you can quickly and easily share your work with friends and colleagues.

We are committed to promoting and increasing the visibility of your article. Here are some tips and ideas on how you can work with us to [promote your research](#).

Article reprints

You will be sent a link to order article reprints via your account in our production system. For enquiries about reprints, please contact the Taylor & Francis Author Services team at reprints@tandf.co.uk. You can also [order print copies of the journal issue in which your article appears](#).

Queries

Should you have any queries, please visit our [Author Services website](#) or contact us at authorqueries@tandf.co.uk.

Updated October 2016

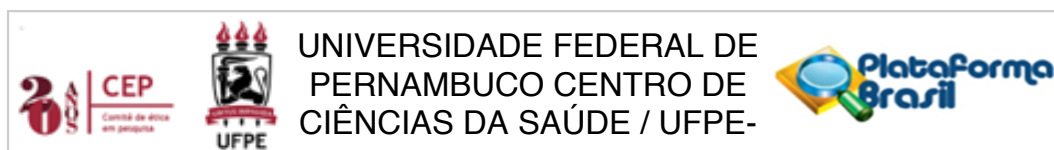
ANEXO A**CRITÉRIOS DO *AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY* (ACR)**

Critérios do *American College of Rheumatology* (ACR), 1980

Critério maior
() Esclerodermia proximal
Critérios menores
() Esclerodactilia
() Cicatrizes digitais ou perda da gordura subcutânea dos dedos
() Fibrose pulmonar bibasal

1 Maior ou 2 Menores

ANEXO B PARECER DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA E ANTIFIBRÓTICA DE ESTATINAS EM PACIENTES PORTADORES DE ESCLEROSE SISTÊMICA

Pesquisador: RAFAELA SILVA GUIMARAES GONCALVES

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 63515916.1.0000.5208

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas de Pernambuco

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

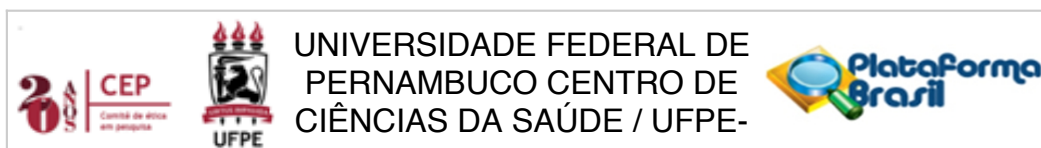
DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.040.197

Apresentação do Projeto:

A pesquisa “Avaliação da Atividade Imunomoduladora e Antifibrótica de Estatinas em Pacientes Portadores de Esclerose Sistêmica” está sob responsabilidade da pesquisadora Rafaela Silva Guimarães Gonçalves, Professora substituta da disciplina de Reumatologia na UFPE, e médica Reumatologista do ambulatório do HC/UFPE, além de mais seis pesquisadores como membros da equipe. Trata-se de um projeto de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, sob orientação da Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta e co-orientação da Dra. Michelly Cristiny Pereira. A esclerose sistêmica é uma doença fibrosante que não tem tratamento específico. A avaliação da atividade imunomoduladora e antifibrótica de estatinas em pacientes portadores de esclerose sistêmica proporciona uma opção terapêutica para a doença. O projeto propõe avaliar o efeito in vitro da sinvastatina e atorvastatina na inibição de moléculas pró-fibróticas e moléculas com potencial anti-fibrótico e de citocinas, em PBMCs e em fibroblastos cutâneos de pacientes com Esclerose Sistêmica. E avaliar o efeito na expressão de moléculas marcadores de fibrose e na expressão dos fatores de transcrição, em PBMCs e fibroblastos cutâneos. A viabilidade financeira deste Projeto está garantida uma vez que os recursos, no valor de R\$ 63.998,97, para o seu desenvolvimento foram concedidos no Projeto “Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para a Inovação Farmacêutica, INCT_if”, coordenado

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.040.197

pelo Prof. Ivan da Rocha Pitta, aprovado no Edital 015/2008, Programa Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O objetivo geral desta proposta é investigar a atividade imunomoduladora e antifibrótica de estatinas em células mononucleadas do sangue periférico e em fibroblastos de pacientes com Esclerose Sistêmica.

Objetivos Secundários:

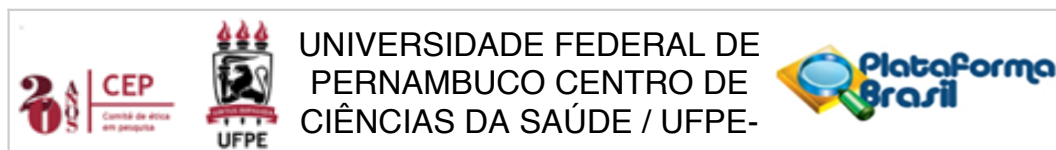
- Descrever o perfil clínico dos pacientes portadores de Esclerose Sistêmica (ES).
- Avaliar o efeito in vitro da sinvastatina e atorvastatina na inibição de moléculas pró-fibróticas (IL-4, IL-13) e moléculas com potencial anti-fibrótico (IL-7 e IFN gama) e de citocinas da via Th17 (IL-6, IL-17 A e F, IL-22, IL-23), em PBMCs de pacientes com ES.
- Avaliar o efeito in vitro da sinvastatina e atorvastatina na inibição de moléculas pró-fibróticas (IL-4, IL-13) e moléculas com potenciais anti-fibróticos (IL-7 e IFN gama), e de citocinas da via Th17 (IL-6, IL-17 A e F, IL-22, IL-23) em fibroblastos cutâneos de pacientes com ES.
- Avaliar o efeito da sinvastatina e atorvastatina na expressão dos fatores de transcrição (RORgt, FOXP3 e GATA3) em PBMCs e fibroblastos cutâneos.
- Avaliar o efeito da sinvastatina e atorvastatina na expressão de moléculas marcadores de fibrose (COL1A1, COL1A2 e ACTA2).
- Correlacionar os dados clínicos com a magnitude da resposta em relação às citocinas e fatores de transcrição após o tratamento com a sinvastatina e atorvastatina.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos envolvidos nesse projeto se referem à coleta de sangue, que pode ser desconfortável e o braço pode ficar um pouco dolorido e apresentar hematoma que é uma área arroxeadada no local da coleta, e para tanto os voluntários serão orientados a comprimir o local durante 2 minutos e realizar crioterapia em domicílio. Com relação a biópsia, há um pequeno risco de infecção, sangramento, e por precisar de colocação de pontos, pode deixar cicatriz. Para minimizar estes riscos, o procedimento será realizado por profissional especializado, com cuidados de assepsia, orientação quanto ao uso de analgésicos, e reavaliações após o procedimento para monitorar eventuais complicações.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.040.197

Benefícios:

Além de promover ao melhor entendimento da fisiopatologia da doença de base, permite a descoberta de biomarcadores e de tratamento específico para fibrose, o que reduzirá a morbi-mortalidade destes pacientes. Com relação aos benefícios para os voluntários, eles serão submetidos a uma avaliação clínica e, caso seja detectada alguma alteração sugestiva de doença auto-imune no voluntário saudável, será encaminhado para um acompanhamento adequado.

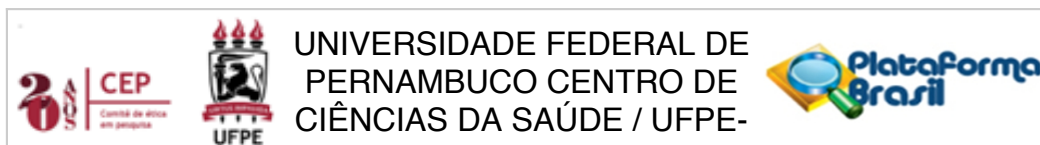
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo está bem fundamentado teoricamente e apresenta referências bibliográficas pertinentes. Serão selecionados 40 pacientes do sexo feminino ou masculino, com idade acima de 18 anos, atendidos no Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, com diagnóstico de Esclerose Sistêmica segundo os critérios preliminares do American College of Rheumatology ou os critérios de ES precoce. Os pacientes serão classificados, de acordo com a extensão do comprometimento cutâneo, na forma cutânea limitada e cutânea difusa. O grupo controle consistirá de 40 voluntários saudáveis, pareados por sexo e idade, sem diagnóstico de outra doença reumatológica imunoinflamatória ou de imunodeficiências, escolhidos aleatoriamente no Hospital das Clínicas da UFPE. Como controles para as biópsias cutâneas, serão obtidas sobras de pele de indivíduos submetidos a cirurgias plásticas de pequeno porte no Serviço de Cirurgia Plástica do HC/UFPE. Esses indivíduos serão também submetidos a entrevista realizada por Reumatologista para a exclusão de portadores de doença reumática auto-imune. Para os portadores de esclerose sistêmica as amostras de pele serão obtidas a partir de biópsias de pele com punch de 5mm, com retirada 1 fragmento do antebraço dos indivíduos. Serão coletados 15mL de sangue em tubo contendo o anticoagulante heparina e 4mL de sangue em tubo a seco com gel. As coletas serão feitas por profissionais competentes e devidamente treinados para reduzir os riscos para o paciente. Nenhuma coleta será realizada sem a autorização prévia dos voluntários.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora responsável anexou folha de rosto com assinatura do Vice-Coordenador do PPGIT/CCB - UFPE, projeto de pesquisa, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para maiores de 18 anos ou emancipados, Termo de Compromisso de Confidencialidade, os currículos de todos os pesquisadores envolvidos no projeto, três cartas de anuência aceitando a pesquisadora para desenvolver o projeto, do Líder do NUPIT-SG/UFPE, do Chefe do Ambulatório de Cirurgia Plástica do HC/UFPE e da Chefe do Ambulatório de Reumatologia do HC/UFPE, além de uma Carta de

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.040.197

Autorização de Uso de Dados dos prontuários dos pacientes, da Gerente de Ensino e Pesquisa do HC/UFPE e do Histórico Escolar da pesquisadora.

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma.

Considerações Finais a critério do CEP:

As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

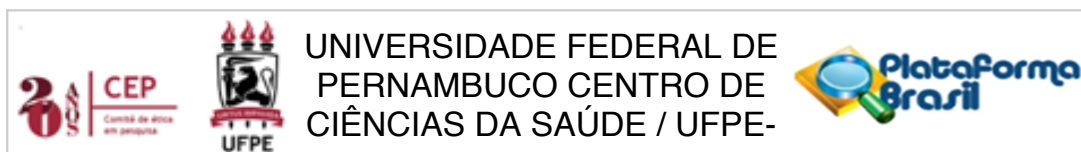
Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
----------------	---------	----------	-------	----------

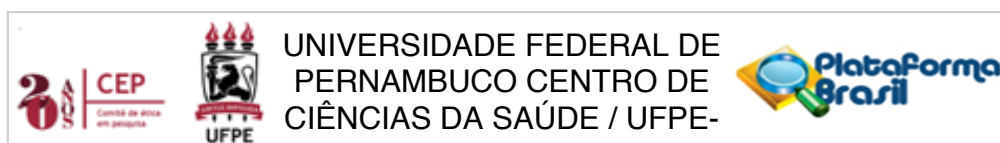
Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.040.197

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_822674.pdf	25/04/2017 20:36:55		Aceito
Outros	CARTA_DE_RESPOSTA_PENDENCIA_S_CEP_3_modif.pdf	25/04/2017 20:36:16	RAFAELA SILVA GUIMARAES GONCALVES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_doutorado_cep_modificado.doc	25/04/2017 20:32:10	RAFAELA SILVA GUIMARAES GONCALVES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_rafa_doutorado_modificado.doc	25/04/2017 20:28:09	RAFAELA SILVA GUIMARAES GONCALVES	Aceito
Outros	CARTA_DE_RESPOSTA_PENDENCIA_S_CEP.pdf	13/03/2017 17:03:39	RAFAELA SILVA GUIMARAES GONCALVES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_doutorado_cep.doc	18/02/2017 14:32:28	RAFAELA SILVA GUIMARAES GONCALVES	Aceito
Outros	termo_confidencialidade_doutorado.pdf	24/12/2016 10:43:18	RAFAELA SILVA GUIMARAES GONCALVES	Aceito
Outros	autorizacao_uso_dados.pdf	24/12/2016 10:29:59	RAFAELA SILVA GUIMARAES GONCALVES	Aceito
Outros	Lattes_Rayssa_Maria_de_Melo_Wanderley_Feitosa.pdf	20/12/2016 11:56:42	RAFAELA SILVA GUIMARAES GONCALVES	Aceito
Outros	Lattes_Michelly_Cristiny_Pereira.pdf	20/12/2016 11:54:50	RAFAELA SILVA GUIMARAES GONCALVES	Aceito
Outros	Lattes_Moacyr_Jesus_Barreto_de_Melo_Rego.pdf	20/12/2016 11:54:28	RAFAELA SILVA GUIMARAES GONCALVES	Aceito
Outros	LattesAndersonRodriguesdeAlmeida.pdf	20/12/2016 11:53:22	RAFAELA SILVA GUIMARAES GONCALVES	Aceito
Outros	LattesAndreaTavaresDantas.pdf	20/12/2016 11:52:45	RAFAELA SILVA GUIMARAES GONCALVES	Aceito
Outros	LattesClaudiaDinizLopesMarques.pdf	20/12/2016 11:52:18	RAFAELA SILVA GUIMARAES GONCALVES	Aceito
Outros	LattesMairaGaldinodaRochaPitta.pdf	20/12/2016 11:51:46	RAFAELA SILVA GUIMARAES GONCALVES	Aceito
Outros	Lattes_Rafaela_Silva_GuimaraesGoncalves.pdf	20/12/2016 11:48:53	RAFAELA SILVA GUIMARAES GONCALVES	Aceito

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.040.197

Outros	historico.pdf	20/12/2016 11:33:27	RAFAELA SILVA GUIMARAES GONCALVES	Aceito
Outros	carta_anuencia_nupit.pdf	20/12/2016 11:27:05	RAFAELA SILVA GUIMARAES GONCALVES	Aceito
Outros	carta_anuencia_draangela.pdf	20/12/2016 11:25:16	RAFAELA SILVA GUIMARAES GONCALVES	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto_rafa.pdf	20/12/2016 11:05:32	RAFAELA SILVA GUIMARAES GONCALVES	Aceito
Outros	carata_anuencia_plastica.pdf	20/12/2016 11:00:35	RAFAELA SILVA GUIMARAES GONCALVES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 02 de Maio de 2017

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br