



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

LÍLIAN DAVID DE AZEVEDO VALADARES

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA SINVASTATINA NA MODULAÇÃO DA
RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA ESCLEROSE SISTÊMICA:
um ensaio clínico randomizado**

Recife
2022

LÍLIAN DAVID DE AZEVEDO VALADARES

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA SINVASTATINA NA MODULAÇÃO DA
RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA ESCLEROSE SISTÊMICA:
um ensaio clínico randomizado**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde.

Orientador: Profa. Dra. Ângela Luzia Branco Pinto Duarte.
Coorientador: Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo
Coorientador: Profa. Dra. Andréa Tavares Dantas.

Recife
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Valadares, Lílian David de Azevedo

Avaliação da eficácia da sinvastatina na modulação de resposta inflamatória na esclerose sistêmica: um ensaio clínico randomizado/ Lílian David de AzevedoValadares – 2022.

124 f. : il., fig., tab.

Orientadora: Ângela Luzia Branco Pinto Duarte.

Coorientadores: Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo e Andréa Tavares Dantas.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2022.

Inclui referências, apêndices e anexo.

1. Estatinas (agentes cardiovasculares) 2. Citocinas 3. Quimiocinas I. Duarte, Ângela Luzia Branco Pinto (orient.) II. Rêgo, Moacyr Jesus Barreto de Melo (coorient.) III. Dantas, Andréa Tavares (coorient.) IV. Título

615.1

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022 -224

Elaborado por Elaine C Barroso - CRB-4/1728

Lílian David de Azevedo Valadares

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA SINVASTATINA NA MODULAÇÃO DA
RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA ESCLEROSE SISTÊMICA:
um ensaio clínico randomizado**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde.

Aprovada em: 19/08/2022.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ângela Luzia Branco Pinto Duarte (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Anderson Rodrigues de Almeida (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Henrique Ataíde Mariz (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Michelly Christiny Pereira (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Rafaela Silva Guimarães Gonçalves (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Valéria Pereira (Examinador Externo)
Fiocruz

Dedico esse trabalho, a todos os pacientes do ambulatório de Esclerose Sistêmica do Hospital das Clínicas da UFPE, pois sem a sua confiança em nós depositada e a sua dedicação, jamais seria possível estarmos aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que me permitiu ter saúde e determinação para alcançar esse sonho, e enfrentar todos os obstáculos encontrados no meu caminho.

A Mozart, meu marido, meus filhos, Victor e Maria Luísa, fonte da renovação constante dos meus ideais, e onde eu sempre pude descansar a cada tropeço imposto pelos caminhos que escolhi.

A Silvio, Cristiane e Pedro, meu irmão, cunhada e irmã que Deus me deu, meu afilhado muito amado. A Paulo e João David, meu irmão e meu tio muito queridos.

À minha inesquecível e saudosa mãe, Maria Luiza e meu pai, Sylvio, os quais guardo para sempre em meu coração, repleto de saudade, com a certeza de sua eterna bênção onde estiverem.

À minha mestra, orientadora, mentora intelectual, Profa. Ângela Duarte, a quem dedico toda a minha gratidão por sempre me escolher para acompanhá-la e por ter ao meu lado, na caminhada do exercício da especialidade que escolhi para minha vida.

Aos queridos coorientadores Andréa Dantas e Moacyr Rêgo, pelas vezes que necessitei de suas opiniões, orientações, sugestões e decisões, entremeadas de todo o conhecimento técnico e sabedoria, qualidades inerentes dos grandes pesquisadores.

Aos colegas, hoje amigos dessa jornada, Anderson Rodrigues, Eudes Cunha e Maria Andreza Correia, com quem compartilhei boa parte das horas dedicadas a esse estudo, algumas dessas inesquecíveis, e que me serviram como um aprendizado. Serei para sempre grata a eles, individualmente e coletivamente, pois sem esse convívio inestimável, a realização desse estudo, seria uma tarefa mais difícil de ser executada.

À Caroline Magnata A. da Fonte, amiga, colega de especialidade, minha chefe no Hospital Getúlio Vargas, pela compreensão das minhas várias ausências diante das necessidades impostas pelo exercício do doutorado.

À Profa. Maira Pitta, meu especial agradecimento, pelo acolhimento como sua doutoranda e por tantas vezes contar com sua compreensão, com a cessão dos insumos necessários para a condução execução desse estudo.

Ao Prof. Emídio pelas análises estatísticas dos resultados, pelas orientações fundamentais na finalização desse estudo.

Aos pacientes do ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFPE, meu carinho e a minha imensa gratidão, por toda a dedicação, compreensão, presteza e confiança. Sem a colaboração deles, seria impossível a realização desse trabalho.

Ao apoio financeiro da Sociedade Brasileira de Reumatologia e à Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

RESUMO

A Esclerose Sistêmica (ES) é uma doença reumatológica autoimune, progressiva, que se caracteriza pelo comprometimento vascular, pela produção de auto anticorpos com inflamação, e fibrose. Dada a sua variabilidade clínica e fenotípica não possui um tratamento eficaz, capaz de promover o controle da doença, o que atualmente dispomos, visa diminuir o impacto na qualidade de vida desses pacientes, visando uma maior e melhor sobrevida. As estatinas, substâncias utilizadas há décadas na prevenção e tratamento das doenças cardiovasculares, através de estudos *in vitro*, têm sido observado um possível perfil imunomodulador dessas substâncias na ES. Esse ensaio clínico randomizado, triplo cego, placebo controlado, avaliou o efeito nos níveis séricos das citocinas IL-4, IL-6, IL-8, IL-13, IL-17A, CCL-2, IL-29 e IP-10, nos desfechos clínicos utilizados, o *Health Assessment Questionnaire* (HAQ), o *Scleroderma Health Assessment Questionnaire* (S-HAQ), e o *Modified Rodnan Skin Score* (mRSS), em 32 pacientes portadores de ES, sendo 16 do grupo da intervenção, que utilizaram a sinvastatina 20 mg ao dia, e 16 pacientes do grupo placebo por um período de 180 dias. A quantificação da expressão das citocinas no soro desses pacientes, foi realizada através da técnica *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA). Dentre as citocinas e quimiocinas investigadas, constatamos que a sinvastatina foi capaz de diminuir significativamente os níveis séricos da IL-6 ($p=0,009$) de oito dos pacientes (50%) do grupo de intervenção ao compará-los com dois do grupo placebo (12,5%), conforme a categorização dos pacientes que apresentaram diminuição da secreção de acordo com os valores da mediana durante o tempo do estudo. As análises estatísticas do grupo que apresentou a redução, demonstraram que, esse resultado pode estar relacionado ao uso da sinvastatina por esses pacientes. As demais citocinas e quimiocinas avaliadas, IL-4, IL-8, IL-13, IL-17A, CCL-2, IL-29 e IP-10, apesar de apresentarem variações numéricas, não foram observadas diferenças estatísticas quando correlacionada aos desfechos clínicos propostos. O ensaio clínico randomizado avaliando o uso da sinvastatina em pacientes ES demonstrou, portanto, ser útil no estudo do papel das estatinas na ES, no entanto, essa intervenção precisa ser mais investigada para melhor compreender esse efeito. Além disso, novos direcionamentos são necessários para confirmar essa hipótese, através de pesquisas multicêntricas que possibilitem incluir um maior número de pacientes, além de outros desfechos.

Palavras-chave: Esclerose Sistêmica; Estatinas; Sinvastatina; Citocinas; Quimiocinas.

ABSTRACT

Systemic Sclerosis (SSc) is a progressive, autoimmune rheumatologic disease characterized by vascular compromise, the production of autoantibodies with inflammation, and fibrosis. Given its clinical and phenotypic variability, it does not have an effective treatment capable of promoting disease control, which we currently have, aims to reduce the impact on the quality of life of these patients, aiming at a greater and better survival. Statins, substances used for decades in the prevention and treatment of cardiovascular diseases, through in vitro studies, have been observed a possible immunomodulatory role of these substances in SSc. This randomized, triple-blind, placebo-controlled clinical trial evaluated the effect on serum levels of the cytokines IL-4, IL-6, IL-8, IL-13, IL-17A, CCL-2, IL-29 and IP-10, in the clinical outcomes used, the health assessment questionnaire (HAQ), the scleroderma health assessment questionnaire (S-HAQ), and the modified Rodnan skin score (mRSS), in 32 patients with SSc, 16 of whom were in the intervention group, who used simvastatin 20 mg daily, and 16 patients in the placebo group for a period of 180 days. The quantification of cytokine expression in the serum of these patients was performed using the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) technique. Statistical analyzes showed that the randomization of patients was efficient, so that there was no significant difference between the groups in terms of clinical and demographic characteristics. Among the investigated cytokines and chemokines, we found that simvastatin was able to significantly decrease IL-6 secretion ($p=0.009$) in eight of the patients (50%) in the intervention group when compared with two in the placebo group (12.5%), according to the categorization of patients who had decreased secretion according to the median values during the time of the study. The statistical analyzes of the group that presented the reduction showed that this result may be related to the use of simvastatin by these patients. The other evaluated cytokines and chemokines, IL-4, IL-8, IL-13, IL-17A, CCL-2, IL-29 and IP-10, despite presenting numerical variations, no statistical differences were observed when correlated with the outcomes proposed clinicians. The randomized clinical trial evaluating the use of simvastatin in SSc patients proved, therefore, to be useful in the study of the role of statins in SSc, however, this intervention needs to be further investigated to better understand this effect. In addition, new directions are needed to confirm this hypothesis, through multicenter research that makes it possible to include a greater number of patients, in addition to other outcomes.

Keywords: Systemic Sclerosis; Statin;. Simvastatin; Cytokines; Chemokines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TESE

Figura 1 –	Paciente portador de ES: forma cutâneo difusa	24
Figura 2 –	Paciente portador de ES: forma cutâneo limitada.....	24
Figura 3 –	Aparência clínica da calcinose (seta vermelha) e telangiectasias na ponta do dedo (seta amarela) de paciente com ESCL	28
Figura 4 -	Paciente ES apresentando telangiectasias	29
Quadro 1-	Critérios classificatórios ACR/EULAR-2013	31
Figura 5 –	Representação esquemática dos mecanismos patogênicos na esclerose sistêmica.....	35
Quadro 2-	Esquematização de tratamento das manifestações clínicas para a ES.....	44
Figura 6 –	Estatinas disponíveis no mercado certificadas pelo Estados Unidos FDA (Administração de Alimentos e Medicamentos)	45
Figura 7 –	Desenho esquemático do delineamento do estudo	50

LISTA DE TABELAS

TESE

Tabela 1 –	Classificação das formas clínicas da Esclerose sistêmica....	23
Tabela 2 –	Os principais autoanticorpos para esclerose sistêmica e seus correlatos clínicos	30
Tabela 3 -	Dados dos tipos dos kits utilizados para as dosagens da citocinas e quimiocinas, com seus limites máximo e mínimo	56
Tabela 4 –	Dados descritivos e características clínicas laboratoriais do grupo intervenção (G1) e controle (G2) dos pacientes ES participantes do ensaio clínico.....	60
Tabela 5 –	Níveis séricos das citocinas e quimiocinas investigadas no grupo intervenção.....	62
Tabela 6 –	Resultados do cruzamento entre os grupos intervenção (G1) e controle (G2) nos quatro tempos investigados	63
Tabela 7–	Resultados das associações investigadas na secreção de citocinas e quimiocinas separadas categoricamente em grupos (diminuiu, aumentou e inalterada)	65
Tabela 8 –	Comparações da IL-6 entre as variáveis clínicas e os tratamentos nos diferentes tempos de intervenção com a sinvastatina nos pacientes com ES que apresentem diminuição da secreção da citocina.....	66

ARTIGO: TRATAMENTO COM A SINVASTATINA E A SECREÇÃO DE IL-6 NA ESCLEROSE SISTÊMICA: RESULTADOS DO ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO, TRIPLO-CEGO E CONTROLADO POR PLACEBO

Tabela 1	Características clínicas e laboratoriais, manifestações clínicas e tratamentos nos grupos intervenção (G1) e controle (G2) dos pacientes ES participantes do ensaio clínico randomizado	78
----------	---	----

Material suplementar 1	Resultados do cruzamento entre os grupos intervenção (G1) e controle (G2) nos quatro tempos investigados dos pacientes ES participantes do ensaio clínico randomizado	90
Material suplementar 2	Resultados das associações investigadas na secreção de citocinas e quimiocinas dicotomizadas categoricamente em grupos (diminuída, aumentada e inalterada)	91

LISTA DE SIGLAS

AAS	ÁCIDO ACETILSALICÍLICO
ACA	ANTICORPO ANTICENTROMERO
ACR	COLÉGIO AMERICANO DE REUMATOLOGIA DO INGLÊS - <i>AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY</i>
AINE	ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDES
ANA	ANTICORPO ANTINUCLEARES
Anti RNP	ANTICORPO ANTIRIBONUCLEOPROTEINA
Anti SCL-70	ANTICORPO ANTI-DNA TOPOISOMERASE
AZA	AZATIOPRINA
BCC	BLOQUEADOR DE CANAL DE CÁLCIO
BRA	BLOQUEADORES DOS RECEPTORES DA ANGIOTENSINA
CCL-2	LIGANTE DE QUIMIOCINA (C-C MOTIF) 2
DPI	DOENÇA PULMONAR INTERSTICIAL
ED-1	ENDOTELINA 1
ELISA	DO INGLÊS- <i>ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY</i>
ES	ESCLEROSE SISTÊMICA
ESCD	ESCLEROSE SISTÊMICA CUTÂNEA DIFUSA
ESCL	ESCLEROSE SISTÊMICA CUTÂNEA LIMITADA
EULAR	DO INGLÊS- <i>EUROPEAN LEAGUE AGAINST RHEUMATISM</i>
EUSTAR	DO INGLÊS- <i>EUROPEAN LEAGUE AGAINST SCLERODERMA TRIALS AND RESEARCH GROUP</i>
FPP	FARNESIL PIROFOSFATO
FRy	FENÔMENO DE RAYNAUD
GGPP	PIROFOSFATO DE GERANILGERANIL
GP-130	GLICOPROTEINA-130
HAQ	DO INGLÊS- <i>HEALTH ASSESSMENT QUESTIONNAIRE</i>
HAP	HIPERTENSAO ARTERIAL PULMONAR
HMG-CoA	HIDROXI-3-METILGLUTAMIL COENZIMA A
IBP	INIBIDORES DA BOMBA DE PRÓTONS
ICAM-1	<i>INTERCELLULAR ADHESION MOLECULE-1</i>
IECA	INIBIDORES DA ENZIMA CONVERSORA DA ANGIOTENSINA

IFN- γ	INTERFERON GAMA
IL	INTERLEUCINA
IP-10	PROTEÍNA INDUZIDA POR INTERFERON GAMA
MCP-M	PROTEINA-1 QUIMIOATRAENTE DE MONOCITO
MEC	MATRIZ EXTRACELULAR
MMF	MICOFENOLATO
MRSS	DO INGLÊS - <i>MODIFIED RODNAN SKIN SCORE</i>
MTX	METOTREXATO
OMS	ONCOSTATINA M
PCR-hs	DO INGLÊS- <i>PROTEÍN C RECTIVE HIGH SENSIVITY</i>
ROMS	RECEPTOR DA ONCOSTATINA M
ROS	DO INGLÊS- <i>REACTIVE OXYGEN SPECIES</i>
SHAQ	DO INGLÊS - <i>SCLERODERMA HEALTH ASSESSMENT QUESTIONNAIRE</i>
SGP130	RECEPTOR DA GLICOPROTEINA 130
TGF- β	FATOR DE TRANSFORMADOR DO CRESCIMENTO BETA
VEGF	FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.2	OBJETIVOS.....	20
1.2.1	Objetivo geral.....	20
1.2.2	Objetivos específicos.....	20
2	REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1	ESCLEROSE SISTÊMICA	21
2.1.1	Epidemiologia.....	21
2.1.2.	Classificação/ Formas Clínicas	23
2.1.3	Manifestações clínicas.....	25
2.1.4	Autoanticorpos.....	29
2.1.5	Diagnóstico	30
2.1.6	Etiologia.....	32
2.2	FISIOPATOLOGIA DA ESCLEROSE SISTÊMICA	33
2.3	TRATAMENTOS DA ESCLEROSE SISTÊMICA.....	42
2.3.1	Tratamentos convencionais	42
2.3.2	Novas terapias.....	43
2.3.2.1	Estatinas	44
3.	MÉTODO	50
3.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO	50
3.2	TIPO E LOCAL DO ESTUDO	50
3.3	RECRUTAMENTO DOS PACIENTES.....	51
3.3.1	Critérios de inclusão e exclusão.....	51
3.3.1.1	Critérios de inclusão	51
3.3.1.2	Critérios de exclusão	51
3.4	PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS	52

3.4.1	Inclusão, avaliação inicial e seguimento	52
3.4.2	Randomização	54
3.4.3	Acompanhamento.....	55
3.5	COLETA E OBTENÇÃO DE AMOSTRAS.....	55
3.6	QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NO SORO DE PACIENTES PORTADORES DE ES EM USO DE SINVASTATINA E PLACEBO	55
3.6.1	Ensaio Elisa referente ao kit da BD.....	56
3.6.2	Ensaio Elisa referente ao kit da Invitrogen.....	57
3.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	57
3.8	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS CONFORME A RESOLUÇÃO 466/12 DO CNS.....	58
4	RESULTADOS.....	59
5	DISCUSSÃO	67
6	ARTIGO: TRATAMENTO COM A SINVASTATINA E A SECREÇÃO DE IL-6 NA ESCLEROSE SISTÊMICA: RESULTADOS DO ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO, TRIPLO-CEGO E CONTROLADO POR PLACEBO.....	73
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	93
	REFERÊNCIAS.....	94
	APÊNDICE A- FICHA CLÍNICA DE AVALIAÇÃO/ACOMPANHAMENTO DOS PACIENTES	103
	APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	106
	APÊNDICE C - ARTIGO PUBLICADO PELA REVISTA BRAZILIAN JOURNAL OF HEALTH REVIEW: NÍVEIS SÉRICOS DA IL-13 NA ESCLEROSE SISTÊMICA: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA COM META-ANÁLISE	110
	ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP/UFPE)	117

1 INTRODUÇÃO

A esclerose sistêmica (ES) é uma doença reumatológica, crônica, progressiva, autoimune, que apresenta três características principais: comprometimento vascular, produção de auto anticorpos com inflamação e fibrose. Apesar de rara, é de extrema importância na reumatologia em decorrência do seu impacto na qualidade de vida nos indivíduos acometidos, além do seu prognóstico reservado, sendo por isso, considerada das mais graves doenças autoimunes sistêmicas (BAGNATO et al., 2013).

Caracteriza-se pelo acometimento inicial de pequenos vasos de forma disseminada, pela desregulação imunológica com produção de autoanticorpos e por um estado de inflamação permanente, que resultam em fibrose multissistêmica excessiva, que acomete pele e os órgãos internos. Essa combinação de características diferencia a ES de quaisquer outras doenças, pela progressão de dano tecidual irreversível, uma vez que, não possui um tratamento específico, considerado eficaz no controle dessas desregulações (DENTON; KHANNA, 2017).

As estatinas são substâncias que, farmacologicamente, bloqueiam a conversão da hidroxil-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) em mevalonato, e têm sido administradas com sucesso no tratamento da hipercolesterolemia e da doença cardiovascular, devido a sua ação hipolipemiante e anti-aterosclerótica (ZHANG et al.). Apesar de não estar bem esclarecido o mecanismo, outros ensaios clínicos têm demonstrado o benefício das estatinas no tratamento da vasculopatia, através da diminuição dos níveis de marcadores da disfunção endotelial (ONG; DENTON, 2010). Outros autores, também sugerem a utilização das estatinas para dano vascular na ES (ABOU-RAYA; ABOU-RAYA; HELMII, 2007, 2008; ALEKPEROV et al., 2011; BLAGOJEVIC; MATUCCI-CERINIC, 2009; DEL PAPA et al., 2008; KUWANA et al., 2006; KUWANA; OKAZAKI; KABURAKI, 2009; ROSSI et al., 2012).

Resultados *in vitro* realizados por nossa equipe de trabalho, publicado recentemente, demonstraram a modulação pelas estatinas (sinvastatina e atorvastatina) sobre a secreção de citocinas IL-6, IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ , TNF, IL-17A e IL-17F, onde comparando com a condição estimulada, a sinvastatina e a atorvastatina 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. Os achados descritos sugerem um efeito imunomodulador dos inibidores da HMG-CoA redutase (GONÇALVES, 2017), o que justifica o objetivo do nosso estudo.

Ladak e Pope (2015) propõem que as estatinas são seguras e bem toleradas na ES e que ensaios randomizados devem ser realizados para determinar melhor seu papel. Estudos pré-clínicos *in vivo/in vitro*, são necessários na demonstração desses mecanismos. Neste contexto, o presente trabalho buscou avaliar os efeitos imunomoduladores da sinvastatina através de um ensaio clínico randomizado, controlado por placebo com pacientes com esclerose sistêmica. Este estudo visa investigar a atividade imunomoduladora de estatinas em níveis séricos das citocinas IL-4, IL-6, IL-8, IL-13, IL-17; IL-29, e quimiocinas CCL-2 e IP-10 em pacientes com ES, correlacionando com desfechos clínicos, o Health Assessment Questionnaire (HAQ), o Scleroderma Health Assessment Questionnaire (S-HAQ), e o Modified Rodnan Skin Score (mRSS).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

O objetivo geral desta proposta, é avaliar a atividade imunomoduladora da sinvastatina, em níveis séricos de citocinas em pacientes com Esclerose Sistêmica (ES), através de ensaio clínico randomizado.

1.2.2 Objetivos específicos

- Descrever a características clínicas e demográficas dos pacientes portadores de ES participantes da pesquisa;
- Quantificar os níveis séricos das citocinas IL-4, IL-6, IL-8, IL-13, IL-17, IL-29, CCL-2, e IP-10 antes e durante o tratamento com sinvastatina e em uso de placebo, em diferentes intervalos de tempo (D0, D60, D120, D180) pacientes com Esclerose Sistêmica;
- Correlacionar os resultados da resposta e das citocinas após o tratamento com a sinvastatina com os dados dos pacientes e suas manifestações clínicas.
- Correlacionar os resultados das respostas das citocinas após a intervenção com os desfechos clínicos (HAQ, SHAQ e mRSS), nos intervalos de tempo (D0, D60, D120 e D180).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ESCLEROSE SISTÊMICA

A ES é uma doença rara, imune mediada, progressiva, detentora da maior taxa de mortalidade entre as doenças na reumatologia. Em virtude de seu importante impacto na qualidade de vida e do prognóstico reservado, é considerada a mais grave dentre as doenças autoimunes sistêmicas (BROWN; O'REILLY, 2019). Caracteriza-se por fibrose multissistêmica excessiva que acomete pele e os órgãos internos, pelo acometimento de pequenos vasos de forma disseminada, e pela desregulação imunológica com produção de autoanticorpos. Essa combinação dessas características, vai diferenciar a ES de quaisquer outras doenças. Além do que, a progressão por vezes intratável dos danos aos órgãos acompanhados pela fibrose, é responsável pela morbidade e pela alta mortalidade, que promove a busca de terapias efetivas para essa doença (DENTON; KHANNA, 2017).

2.1.1 Epidemiologia

Escassos estudos de registros foram desenvolvidos mundialmente. A exemplo disso, encontramos no Reino Unido, na Alemanha, nos EUA, no Brasil e na Austrália exemplos desses estudos. Existe também um registro internacional estabelecido pela European League Against Rheumatism Scleroderma Trial e Pesquisa (EUSTAR) incluindo um conjunto mínimo de dados essenciais (MEDS) online, que coletaram dados de mais de 8.000 pacientes de 92 centros em todo o mundo, incluindo 21 centros europeus e 9 em outros continentes, auxiliando na análise e divulgação dos dados sobre a progressão da doença além de respostas dos pacientes a questionários pré-estabelecidos. Esses registros ajudaram a melhorar a compreensão da doença e a manter os profissionais atualizados, sobre os últimos avanços a cerca da ES.(GALLUCCIO et al., 2011). No Reino Unido, estima-se que a prevalência da ES seja de 8,2 para 100.00 habitantes (ALLCOCK et al., 2004). Assim como ocorre em outras doenças reumatológicas, o gênero feminino é o mais frequente, variando em uma razão de 3:1 até 8:1. Apesar de comumente iniciar-se entre 20 e 50 anos de idade, pode ocorrer mais raramente em crianças (VALENTINI; BLACK, 2002). No

entanto, um estudo de registro do Reino Unido, revelou que a ES teria um início mais tardio, entre 55 e 69 anos de idade (ROYLE et al., 2018). No Brasil temos dados de um estudo epidemiológico conduzido pela Sociedade Brasileira de Reumatologia através do GEPRO (Pronuclear Project SSC Study Group), onde em um protocolo comum de investigação, incluindo aspectos demográficos e imunológicos, aplicado em 28 diferentes centros universitários, em diferentes áreas geográficas do país entre os anos de 2003 e 2006. Esse estudo de registro, demonstrou que no país tínhamos cerca de 1.139 pacientes, onde 508(44,6%) tinham a ESCL (Esclerose Sistêmica Cutâneo Limitada), 504 (44,2%) a forma ESCD (Esclerose Sistêmica Cutâneo Difusa), 73 desses indivíduos com a Síndrome de Sobreposição ou Overlap (6,4%) e 54 com a forma Sine Escleroderma (4,8%). Além disso, comprovou e confirmou a predominância do gênero feminino (87,4%), da raça caucasiana (65%), e com uma doença mais grave no gênero masculino, inclusive nos afro-brasileiros (GALLUCCIO et al, 2011; ZIMMERMANN, et al, 2013).

Um estudo de prevalência e incidência na ES desenvolvido por HORIMOTO (2017), na cidade de Campo Grande no estado do Mato Grosso do Sul, realizado entre 2014 e 2015, onde o autor observou dados de incidência e prevalência (11,9 caso/milhão de habitante, 105,6 caso/milhão de habitante respectivamente) semelhantes àqueles observados nos estudos europeus, sendo também uma doença que afeta mais as mulheres, variando numa proporção de 7.7 - 32 mulheres para cada homem, e com uma média de idade de aparecimento da doença em torno de 50.5 anos. Trinta e um pacientes (34,8%) com ES nasceram na cidade de Campo Grande, 31 pacientes (34,8%) nasceram no interior de Mato Grosso do Sul e 27 pacientes (30,4%) nasceram em outros estados. Em relação à raça informada pelos pacientes, houve prevalência da cor branca nos pacientes com ES, no entanto deve-se considerar a possibilidade de um viés de classificação racial, devido ao alto grau de miscigenação, caracteristicamente encontrada na população brasileira. No Sul e Sudeste deste país, houve maior prevalência de brancos com ES. Por outro lado, na região Nordeste, observou-se alta prevalência de pardos e afro-descendentes, provavelmente porque o estudo foi realizado em um estado com predominância conhecida de negros como é o estado da Bahia, por exemplo (HORIMOTO et al., 2017).

2.1.2 Classificação/ Formas Clínicas

A ES de acordo com a extensão e o envolvimento do tecido cutâneo, pode se classificar em duas formas (Tabela 1): a difusa (Figura 1), ou seja, quando o acometimento cutâneo é extenso e generalizado, e a forma localizada (Figura 2), quando se limita às extremidades distais até os cotovelos e/ou joelhos com ou sem o envolvimento da face e do pescoço (WIRZ et al., 2016).

Tabela 1 - Classificação das formas clínicas da Esclerose sistêmica

Esclerose sistêmica cutânea limitada (ESCL)	Esclerose sistêmica cutânea difusa (ESCD)
Fenômeno de Raynaud por muitos anos (>1 ano) antes do início do espessamento da pele	Recente início do Fenômeno de Raynaud (antes ou depois) do início (<1 ano) do aparecimento do espessamento da pele
Envolvimento distal da pele (mãos, antebraços, pés e pernas abaixo dos joelhos, face e pescoço)	Além do acometimento distal, acomete também proximamente membros superiores e inferiores, além do tronco
Início tardio de Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP)	Envolvimento precoce cardíaco, pulmonar e renal
Telangiectasias	Presença de <i>tendon friction rubs</i> associada a crise renal esclerodérmica
Presença de anti-centrômero positivo, associado com HAP	Presença de Anti Scl-70 (Anti topo isomerase) associada com fibrose pulmonar, ou a presença de Anti RNA-polimerase III, associada a crise renal esclerodérmica ou câncer

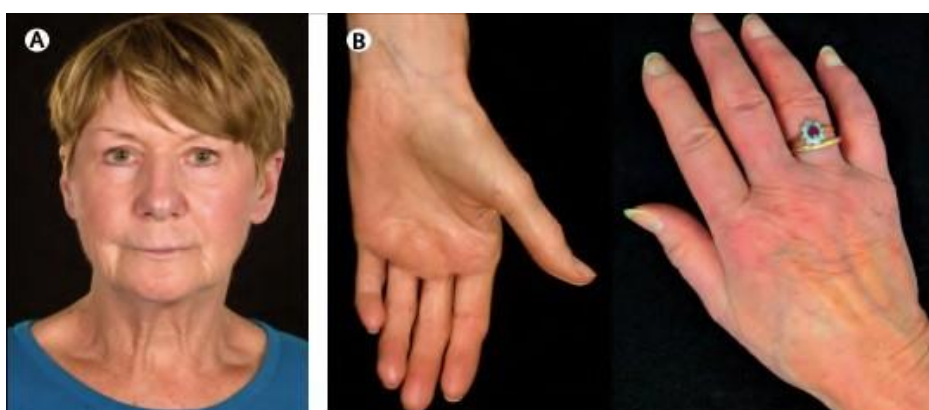
Fonte: LEFLOY et al. (1988).

Figura 1 – Paciente portador de ES: forma cutâneo difusa



Fonte: A autora, autorizada pela paciente (2021) (A); Denton, 2017 (B)

Figura 2 - Paciente portador de ES: forma cutâneo limitada



Fonte: Denton, 2017.

Apesar da divisão dicotômica das formas clínicas, existem, no entanto, outras formas subclínicas associadas a perfis de auto anticorpos séricos que visam refinar e aprimorar a classificação da ES. A exemplo disso, citamos a Sine Escleroderma, que leva essa denominação, quando se encontra a ES associada a úlceras digitais e à hipertensão arterial pulmonar, mas sem haver o acometimento da pele (DIAB et al., 2014). Entretanto, os padrões de anticorpo antinuclear (ANA) podem ser somados a outras características clínicas, e serem utilizados para a identificação de pacientes, os quais mais adiante, poderão desenvolver a ESCD (KRANENBURG et al., 2016; LEPRI et al., 2015; MOINZADEH et al., 2012) e a síndrome de sobreposição, essa assim denominada, ao se encontrar a associação da ES a outras doenças autoimunes, e

dessa maneira apresentar-se com qualquer uma das outras formas da ES, embora seja mais comumente encontrado em pacientes com a forma ESCL (FOOCHAROEN et al., 2016; PENN et al., 2007).

No entanto, todas as formas clínicas são igualmente graves, apesar de que, a forma difusa está mais frequentemente associada a um pior prognóstico e a uma maior mortalidade (STEEN, 2005). Algumas características podem ser mais comumente encontradas, em cada uma das formas clínicas. A exemplo disso, na forma ESCL se observa frequentemente a presença precoce do fenômeno de Raynaud (FRy), podendo apresentar-se por anos antes do próprio espessamento da pele. Enquanto o anticorpo anticentrômero (ACA) frequentemente associado à hipertensão arterial pulmonar (HAP), aparece mais tardiamente nesse grupo de pacientes. Já na forma ESCD, o FRy é tardio, além do que, surge concomitantemente ou após o espessamento cutâneo, já o acometimento visceral nessa forma clínica, seja cardíaco, gastrointestinal ou renal costumam ser precoces. Quantos aos anticorpos Anti Scl-70 (anti topo isomerase) e RNA polimerase, ambos são mais frequentes nos pacientes com ESCD, no entanto, enquanto o Anti Scl-70 está fortemente associado ao acometimento pulmonar através da ocorrência de fibrose pulmonar, o RNA polimerase, está, para o acometimento renal, através da crise renal esclerodérmica (HUGHES, 2018; LEROY et al., 1988).

2.1.3 Manifestações clínicas

2.1.3.1 Acometimento Vascular

O FRy, é uma manifestação marcante da ES, que varia desde ataques episódicos em crises, à isquemia do tecido na área acometida, podendo evoluir com o aparecimento de pequenas cicatrizes digitais e até úlceras. Mais de 95% dos pacientes com ES descrevem o FRy, como um sintoma, e os autores concordam que, esse pode se desenvolver e acontecer durante anos, e até décadas antes do início do espessamento da pele. Ataques do FRy, se apresentam sob a forma de uma mudança da coloração das extremidades, de forma episódica com ou sem sintomas sensoriais, geralmente desencadeados por fatores como a exposição ao frio ou até por fatores emocionais. Os dedos são comumente afetados, apesar de ocorrerem em outros

locais, como língua, lábios e bordos das orelhas. Classicamente apresenta-se sob três fases de coloração: esbranquiçada (isquemia), azulada (cianose) e avermelhada (hiperemia). O FRY tem um impacto importante na qualidade de vida do paciente com ES e tende a ser a manifestação mais precoce da doença (HUGHES et al., 2015; HUGHES; HERRICK, 2017).

2.1.3.2 Acometimento pulmonar

O envolvimento pulmonar na ES ocorre de duas maneiras, seja pelo envolvimento vascular, com a ocorrência da hipertensão arterial pulmonar (HAP), seja pelo aparecimento e progressão, da fibrose do parênquima pulmonar. Em se tratando da HAP, sua prevalência na ES ocorre de 7,8 a 30% (LE PAVEC et al., 2010). Existem marcadores clínicos que podem estar associados a uma maior prevalência dessa grave complicação, isso inclui, aqueles indivíduos portadores da forma limitada da doença (ESCL), pacientes que apresentem uma ES prolongada, com mais de 10 anos de duração (COX et al., 2005), aqueles iniciaram a ES em idade avançada (CHANG et al., 2006), pacientes que apresentem refratariedade e longa duração ao tratamento do FRY (PLASTIRAS et al., 2007; STEEN, 2003), ou até mesmo aqueles indivíduos que possuam uma reduzida densidade da capilaridade, observada na capilaroscopia ungueal (COX et al., 2005). O quadro clínico inclui comumente tosse seca, dor torácica e dispneia progressiva (WELLS; STEEN; VALENTINI, 2009). Quanto à fibrose pulmonar, essa, pode ser vista em até 80% dos pacientes portadores de ES, podendo até ser assintomática em até um terço deles nas fases iniciais da doença (DENTON et al., 2016).

2.1.3.3 Acometimento renal

O envolvimento renal decorrente da crise renal da ES costumava ser a principal causa de morte. A chamada crise renal esclerodérmica, tipicamente se apresenta como uma emergência hipertensiva, acompanhada de edema pulmonar agudo e anemia hemolítica micro angiopática, tendo como início uma insuficiência renal aguda, afetando cerca de 5 a 10% dos pacientes com ES. Os fatores de risco incluem, tratamento com corticosteroides com doses acima de 15 mg ao dia, doença de início

precoce (menos de 4 anos), presença de doença cutânea difusa e de rápida progressão, além da presença do anticorpo Anti-RNA polimerase III (DENTON et al., 2009).

Pacientes com crise renal normotensiva, podem ter apresentação tardia, talvez devido à ausência dos clássicos sintomas de alerta, tais como, além das alterações dos níveis de pressóricos, edemas periféricos, ou podem também estar associados à exposição prévia aos inibidores da enzima conversora de angiotensina, substâncias farmacológicas muito utilizadas como coadjuvantes no próprio tratamento da ES (BRUNI et al., 2018). O seu reconhecimento precoce, além do tratamento imediato dessas manifestações, são fundamentais para o manejo adequado dessa grave complicação da ES. A função renal, no entanto, pode restabelecer-se mesmo após a ocorrência da crise renal, permitindo em alguns casos, até a descontinuação do tratamento (PENN et al., 2007). Outras formas de envolvimento renal podem também ser encontradas na ES, podendo ser subestimadas ou mal interpretadas dada a variabilidade clínica característica da ES. A essas se incluem: proteinúria, albuminúria e glomerulonefrite relacionada ao anticorpo citoplasmático antineutrófilo (BRUNI et al., 2018).

2.1.3.4 Acometimento gastrointestinal

O envolvimento gastrointestinal é muito frequente, podendo acometer toda a extensão do tubo digestivo, cerca de 90% dos pacientes com ES apresentam algum tipo de sintoma. Os pacientes podem desenvolver características relacionadas à motilidade esofágica reduzida ou gastroparesia, sendo comuns também a disfagia e sintomas de refluxo gastrointestinal. Sangramentos podem ocorrer a partir de ectasias vasculares, que quando se localizam em região antral do estômago, são conhecidas como "estômago de melancia". A desnutrição, é uma manifestação que ocorre na doença prolongada, de origem frequentemente multifatorial, seja em consequência da abertura oral reduzida, causada pela fibrose perioral, seja pela má absorção, causada principalmente pela prolongada estase alimentar, decorrente da fibrose que compromete o intestino delgado, resultando em supercrescimento bacteriano secundário, ou ainda, pela dificuldade de locomoção desses indivíduos, acarretada

pela fibrose cutânea nos membros superiores e inferiores presente na doença avançada. A incontinência fecal também é um sintoma comum (HUGHES, 2018).

2.1.3.5 Acometimento cutâneo

O envolvimento cutâneo se define na prática pelo espessamento e pelo endurecimento progressivo da pele, é a alteração mais marcante da doença, podendo ser quantificado, utilizando-se o escore de Rodnan (FURST et al., 1998; KHANNA, 2017) além de ser considerado um preditor independente da evolução da doença e de mortalidade nesses pacientes (DOMSIC et al., 2011).

Outras manifestações cutâneas podem ser observadas nesses pacientes, essas incluem: calcinose (figura 3) e as telangiectasias (figura 3/4). As calcinose podem ser vistas até em radiografias simples, e podem provocar ulcerações e infecções na pele adjacente. Prurido pode ocorrer especialmente nos pacientes com a forma ESCD recente. A hipo ou a hiperpigmentação das lesões, podem causar mudanças estéticas marcantes (HUGHES, 2018).

Figura 3 - Aparência clínica da calcinose (seta vermelha) e telangiectasias na ponta do dedo (seta amarela) de paciente com ESCL



Fonte: Hughes (2018).

Figura 4. Paciente ES apresentando telangiectasias



Fonte: Denton, 2017

2.1.4 Autoanticorpos

Autoanticorpos associados com ES têm sido estudados desde os anos de 1960, quando foram identificados por Rothfield. Apesar de não possuírem um papel completamente esclarecido na ES, são conhecidos por fazerem parte na patogênese da doença, e parecem funcionar como marcadores de certas características dela, sejam clínicas, genéticas ou possivelmente demográficas. O alvo desses anticorpos são componentes específicos da célula, incluindo proteínas ribonucleares, topo isomerase e enzimas RNA polimerase (ROTHFIELD; RODNAN, 1968). De acordo com Steen (2005), a maioria dos pacientes com ES apresenta o anticorpo antinuclear positivo (ANA), sendo que os autoanticorpos específicos e associados à ES são observados em pelo menos metade desses pacientes e têm associações clinicamente relevantes (Tabela 2). Outros autoanticorpos, são vistos em outras condições reumatológicas, podendo estar também associados à ES, a exemplo disso, temos o Anti-Ro, e o anticorpo Anti-Ribonucleoproteína (anti-RNP), esse último é descrito em associação à síndrome de sobreposição (HUGHES, 2018).

Tabela 2 - Os principais autoanticorpos para Esclerose Sistêmica e seus correlatos clínicos

ACA	Associada à ESCL e hipertensão arterial pulmonar. Protetor contra fibrose pulmonar e crise renal de esclerodermia
ANTI-SCL-70	Associada a ESCD, fibrose pulmonar e vasculopatia digital
ANTI-RNP	Associada a ESCD e crise renal de esclerodermia

ACA: Anticorpo anti-centrômero; ANTI-SCL-70: Anticorpo Anti-topoisomerase; ANTI-RNP: Anticorpo Anti Polimerase; ESCL: Esclerose Sistêmica Limitada; ESCD: Esclerose Sistêmica Difusa. Fonte: Hughes (2018).

2.1.5 Diagnóstico

Uma vez o diagnóstico de ES seja suspeitado, para a sua definição, requer usualmente o preenchimento dos critérios classificatórios de 2013 *European League Against Rheumatism* (EULAR) e do *American College of Rheumatology* (ACR) (DENTON; KHANNA, 2017) (quadro 1). Sabemos que esses critérios, são considerados importantes para o diagnóstico precoce da ES, uma vez que, nos últimos 15 anos têm sido bastante estudados, reconhecendo o envolvimento de órgãos internos mesmo nos estágios mais precoces da doença (LAMBOVA; HERMANN; MULLER-LADNER, 2014; MINIER et al., 2014).

A ES não possui critérios diagnósticos validados (MINIER et al., 2014). No entanto, Steen e Medsger (2000), em um estudo com quase 1000 pacientes portadores de ESCD, pôde demonstrar que, um severo acometimento afetando pele, rins, coração, pulmões e trato gastrointestinal, podem ocorrer precocemente no curso da doença com menos de 3 anos do seu início (STEEN; MEDSGER, 2000). Reconhecendo isso, o EULAR e o EUSTAR (do inglês- *Scleroderma Trials and Research Group*), através de um estudo multicêntrico, concluíram que, a presença do

FRy, do anticorpo antinuclear e de doença inflamatória músculo esquelética (*puffy hands*), esses dois últimos considerados preditores independentes e iniciais da evolução de FRy na ES, contribuíram na suspeita para o diagnóstico precoce da ES (LUGGEN et al., 1995; MINIER et al., 2014). Estes dados quando comparados ao critério classificatório proposto por LeRoy e Medsger em 2001, possuem uma alta especificidade e sensibilidade para o diagnóstico dos pacientes, dessa forma, servindo como importantes ferramentas que auxiliam os estudos clínicos (HUDSON; FRITZLER, 2014; LEROY; MEDSGER, 2001).

Quadro 1 - Critérios classificatórios ACR/EULAR-2013

Item	Subitem (s)	Score
Espessamento de pele nos dedos das mãos estendendo-se as articulações metacarpo falangeanas [#]	nenhum	9
Espessamento de pele nos dedos ^{##}	<i>Puffy fingers</i>	2
	Esclerodactilia (distal para as art. metacarpo falangeanas, mas proximal para as interfalangianas proximais)	4
<i>Fingertip lesions</i> ^{##}	Úlceras digitais	2
	<i>Fingertip pitting scars</i>	3
Telangiectasia	nenhum	2
Alterações na capilaroscopia	nenhum	2
HAP e/ou doença pulmonar intersticial (máx. score 2)	HAP e/ou doença pulmonar intersticial	2
Fenômeno de Raynaud	nenhum	3
Auto anticorpos relacionados à ES (máx. score 3)	Anti-centrômero e/ou Anti-topoisomerase I e/ou Anti-RNA polimerase III	3

*Um escore total é obtido somando-se o escore máximo de cada categoria. Pacientes com um escore igual ou maior que 9 são classificados como tendo o diagnóstico definitivo de ES.

A presença desse critério é suficiente para o diagnóstico classificatório de ES

Apenas atribuído ao maior escore. HAP: Hipertensão arterial pulmonar

Fonte: VAN DEN HOOGEN et al. (2013).

Manifestações sistêmicas e o acometimento de órgãos alvo são uma marca registrada da ES, sendo importante essa avaliação para o diagnóstico precoce da doença. Em se tratando de doença cutânea difusa, a rigidez da pele e o prurido são as manifestações iniciais. Alguns pacientes, no entanto, apresentam dor musculoesquelética, outros no entanto, apresentam-se inicialmente com os *puffy fingers*, junto ao acometimento da pele, e ainda, podem apresentar sintomas constitucionais como febre, fadiga, fraqueza muscular e até mesmo perda do apetite (BELLANDO-RANDONE; GUIDUCCI; MATUCCI-CERINIC, 2012) determinando a importância da precocidade na investigação clínica da extensão sistêmica dessa doença (ALLANORE et al., 2015; CODULLO et al., 2015).

Certas manifestações clínicas, no entanto, são consideradas cardinais na ES, podemos citar como exemplo o FRy e o refluxo gastresofágico (RONGIOLETTI et al., 2015; VAN DEN HOMBERGH et al., 2016). Entretanto, esses sintomas podem ser encontrados em outras doenças, e por isso, devemos estar atentos para as características específicas que quando associados a esses, possam indicar o diagnóstico preciso da ES, quando na presença do ANA (GUIDUCCI; BELLANDO-RANDONE; MATUCCI-CERINIC, 2016).

2.1.6 Etiologia

A etiologia da esclerose sistêmica ainda é desconhecida (HAUSTEIN, 2000). Fatores genéticos possuem o seu papel na suscetibilidade à essa doença, e podem também explicar parte da heterogeneidade com que ela se apresenta (DENTON; KHANNA, 2017). Estudos de identificação de polimorfismo genético envolvendo a regulação imune são descritos por vários grupos de pesquisadores, que inclui um painel de genes já identificados, dentre eles o *BANK1*, o *C8orf13-BLK*, o *IL-23R*, o *IRF5*, o *STAT4*, o *TBX21*, e o *TNFSF4*, alguns desses, compartilhados com outras doenças autoimunes como vemos no LES (Lúpus Eritematoso Sistêmico) e na Artrite Reumatoide (KATSUMOTO, 2011).

Considerando o papel das citocinas nesse contexto, a interleucina-6 (IL-6), um mediador da proliferação de células T e de eventos fibróticos na ES, a identificação de polimorfismo da IL-6, é considerado fator importante na melhor compreensão da suscetibilidade ao desenvolvimento de ES, quando se descreve, um aumento da expressão de alguns alelos gênicos da IL-6 quando comparados à indivíduos

saudáveis, a exemplo disso citamos o alelo C, tendo sido demonstrado a sua correlação com certas manifestações clínicas da doença (ZEKOVIC, 2018). E nessa linha de pesquisa, autores como ZIMMERMANN (2013) em seu estudo de revisão, descreveu a associação positiva com certos haplótipos do sistema HLA, HLA-DRB1_1104, DQA1_0501, DQB1_0301, e ao contrário, como um fator protetor, os haplótipos HLA-DRB1_0701, DQA1_0201, DQB1_0202, e DRB1_1501 em brancos e hispânicos com ES, enquanto em negros, a associação foi com outros alelos HLA-DRB1_0804, DQA1_0501 e DQB1_0301. Além disso, esse mesmo estudo aponta a associação com anticorpos anti-Scl70 e o antígeno HLA-DPB1_1301, dos anticorpos anticentrômero (ACA) com os HLA-DQB1_0501 e HLA-DQB1_26 e dos anticorpos anti- RNA polimerase com os alelos HLA-DRB1_0404, HLA- DRB1_11 e HLA-DQB1_03, justificando uma correlação com as manifestações clínicas e o perfil imunológico nesses indivíduos (ZIMMERMANN, 2013).

Alguns agentes infecciosos tais como, o citomegalovírus e o parvovírus B-19, têm sido hipoteticamente correlacionados ao aparecimento da ES, no entanto essa hipótese não tem sido confirmada cientificamente na atualidade (KATSUMOTO, 2011).

Agentes químicos também podem estar envolvidos na patogênese dessa doença, e a exemplo disso, temos estudos que demonstram que, a exposição a solventes orgânicos e ao vinil clorídrico, possam funcionar como possíveis gatilhos ao desenvolvimento da ES-like em indivíduos com perfil genético susceptível (ASSASSI et al., 2013; MURDACA et al., 2016). Outras substâncias também têm sido relacionadas ao desencadeamento dessa grave doença, Ogawa (2016) e Hong (2015) descrevem a associação da ES com agentes antineoplásicos, como a gemcitabina e implantes mamários de silicone, em indivíduos susceptíveis respectivamente (HONG et al., 2015; OGAWA et al., 2017).

2.2 FISIOPATOLOGIA DA ESCLEROSE SISTÊMICA

É provável que uma combinação de mecanismos possa explicar a patogênese da doença, ainda não inteiramente compreendida, que envolvam fundamentalmente a seguinte tríade: vasculopatia, inflamação com ativação de células imunes e fibrose. Apesar de que muitos estudos relacionarem as alterações imunológicas como um

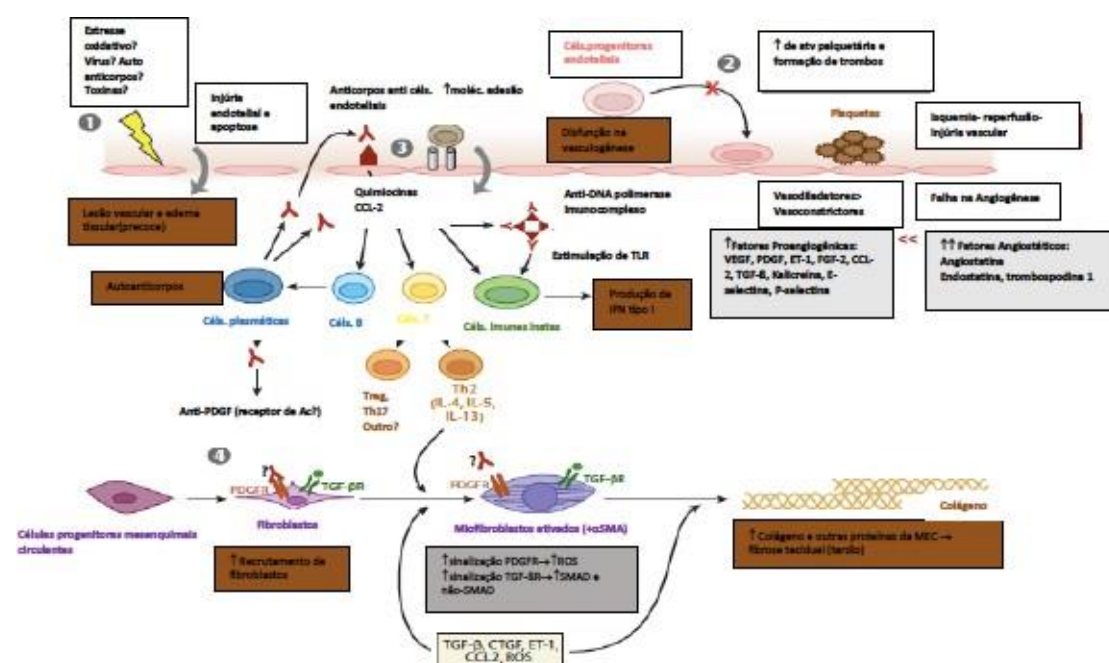
importante fator responsável pela fibrose na doença, a própria fibrose, parece contribuir para a ativação das células imunológicas. Essa por sua vez, ocorre principalmente na pele, mas pode progredir para órgãos viscerais, incluindo coração e pulmões, resultante da ativação de fibroblastos e da deposição excessiva da matriz extracelular. O estudo de Asano e Sato (2015), salienta o quanto a fibrose e a vasculopatia, possam estar inter-relacionadas, além do que, isso parece não ocorrer através de um simples ou único mecanismo. Essa hipótese pode ser justificada, quando o produto resultante da ativação dos fibroblastos e da deposição da matriz extracelular (MEC), passa a ser considerado como o marco final da fisiopatogênese na ES (ASANO; SATO, 2015; BROWN; O'REILLY, 2019).

A doença, no entanto, parece possuir um evento tido como inicial, reconhecido por vários grupos de pesquisadores (Figura 5). Esse acontece, a partir da ação, que pode ser decorrente de uma infecção por vírus, ou de uma toxina ou de um auto anticorpo, que acarrete em uma lesão no endotélio vascular, seguida de edema tecidual (Etapa 1). No estágio seguinte, encontramos uma desregulação na angiogênese e na vasculogênese, que se estabelece a partir daí, uma vez que poucas células progenitoras endoteliais migram para o nicho ou local da agressão inicial a fim de reparar o dano vascular, isso se intensifica quando também passa a existir, a liberação *in loco* de agentes vasoconstrictores em detrimento de vasodilatadores, agravando a isquemia, gerando a liberação e/ou produção dos ROS (*Reactive Oxygen Species*) (Etapa 2). O aumento de moléculas de adesão, além da liberação das primeiras quimiocinas, como a CCL2, são responsáveis por permitirem a migração de leucócitos, que conjuntamente com uma inabilidade de resposta da imunidade inata e adaptativa, acarretarão na perda da tolerância a vários antígenos oxidativos como a topo isomerase I (Etapa 3). A partir daí, observa-se que as células T, incluindo as T helper (Th2) diferenciam-se em subgrupos de outras linhagens celulares, contribuindo para um estado inflamatório persistente. Os Anti Topo isomerase I, formam complexos imunes quando são captados por meio de receptores Fc (FcRs), e ativam os receptores endossômicos, os Toll-like (TLRs), em outras células do sistema imunológico, especialmente as células dendríticas plasmocitoides, levando à produção de Interferon tipo I (IFN) bem descrito e identificado nessa fase da doença. (Etapa 4).

Finalmente, os fibroblastos são recrutados e ativados por várias citocinas e fatores de crescimento para gerar miofibroblastos. A presença de anticorpos do

receptor de Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), que podem conduzir os ROS na produção de fibroblastos e da fibrose, parece ser um achado questionável que aguarda confirmação através de estudos. No entanto, a sinalização do Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF- β) em fibroblastos e miofibroblastos é observada em vários estudos de pacientes com ES, e essa ativação de fibroblastos e miofibroblastos acarreta em uma deposição excessiva de colágeno e outras proteínas na matriz extracelular (MEC), o que resulta na fibrose tecidual observada na ES (KATSUMOTO,2011).

Figura 5 - Representação esquemática dos mecanismos patogênicos na Esclerose Sistêmica.



Fonte: Adaptado de KATSUMOTO; WHITFIELD; CONNOLLY, 2011

Vários tipos diferentes de moléculas do sistema imunológico têm sido implicados na ES, dentre elas citamos, o CTGF, Fator de Crescimento do Tecido Conjuntivo; a ET-1, Endotelina 1; o TGF (Fator de Crescimento de Transformação Desregulado), a IL, Interleucina; JNK, c-Jun N-terminal Quinase; MAPK, Proteína Quinase Ativada por Mitogênio; α -SMA, α Actina de Músculo Liso; Treg, célula T

reguladora; VEGF, Fator de Crescimento Endotelial Vascular, as células T, as células B, as células dendríticas, os mastócitos e os macrófagos. As alterações patogênicas resultantes do dano às células endoteliais podem variar, resultando na formação de um complexo de transição endotelial denominado EndoMT (Transição Endotélio Mesenquimal), sendo esse considerado, um provável percussor de miofibroblastos e fibroblastos, com produção e ativação de fibroblastos, resultante na excessiva formação da MEC (VARGA; TROJANOWSKA; KUWANA, 2017).

A fibrose, que ocorre em qualquer órgão na ES, é caracterizada pela substituição da arquitetura normal do tecido, por um tecido conectivo rígido, rico em colágeno e da matriz extracelular (MEC). Essa MEC é composta de colágenos, particularmente colágeno tipo I, juntamente com proteoglicanos, fibrilina, fibronectina, tenascina-C, sendo ela considerada, uma proteína oligomérica da matriz da cartilagem. A MEC também possui um papel de vital importância, regulando a diferenciação, proliferação, migração, adesão, capacidade biosintética e a sobrevivência de células do estroma tecidual. Além disso, também serve como reservatório para fatores de crescimento latentes (VARGA; TROJANOWSKA; KUWANA, 2017).

Os fibroblastos são células estromais que residem em tecidos de origem mesenquimal, e são capazes de sintetizar e também degradar a MEC (RINKEVICH et al., 2016). Em pacientes com ES, a superprodução de colágeno e de outras moléculas da MEC pelos fibroblastos ativados ocorre em várias regiões dos órgãos afetados. A síntese da MEC pelos fibroblastos durante a remodelação do tecido é rigidamente regulada por mediadores parácrinos e autócrinos solúveis, pelo contato célula a célula, pela hipóxia e pelos ROS (do inglês- *reactive oxygen species*), esses últimos decorrentes dos vários episódios de isquemia tissular (GABRIELLI et al., 2008), amplificando as propriedades biomecânicas da MEC no processo de degradação, e *turnover* dos fibroblastos, agravando todo o processo (HINZ, 2007).

As populações e subpopulações de linfócitos T (Th1, Th2, Th17, Th22, Treg) são também descritas, e apesar de terem funções distintas, participam na fisiopatologia das doenças reumáticas autoimunes, através de uma complexa interação entre elas (GIZINSKI; FOX, 2014). Kalogerou e colaboradores (2005) comprovaram que, células T provenientes de biópsias de pele de pacientes com ES, possuem a expressão aumentada de seu marcador de ativação celular, o CD29 (KALOGEROU et al., 2005). Alguns outros estudos já identificaram a célula Th2, como

detentora de um importante papel na ES, considerando ser ela, a maior produtora de IL-4, podendo também ser responsável pela produção de IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 nessa doença (SHARMA et al., 1996). Outras citocinas pró-inflamatórias são produzidas por populações Th1 e Th17, e participam mediando um processo inflamatório em fases precoces da doença, enquanto as Th2 promovem ativamente a resposta fibrótica, correlacionando-se com a extensão da fibrose e com o comprometimento visceral da ES (CHIZZOLINI et al., 2011; MATSUSHITA et al., 2006). Níveis séricos aumentados de citocinas Th1 e Th2, também foram descritos no estudo de Antonelli e colaboradores (2008) em pacientes com ES quando comparados com indivíduos saudáveis (ANTONELLI et al., 2008).

Pacientes com ES apresentam uma maior frequência de células Th17 no sangue periférico, quando comparado com indivíduos saudáveis (CHIZZOLINI et al., 2011; RODRÍGUEZ-REYNA et al., 2012). E as citocinas secretadas por essas células, e têm sido implicadas na ativação de fibroblastos, estimulando-os a secretar outras citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 e a CXCL8/IL-8, além de aumentar a expressão de ICAM-1, estimulam a secreção de IL-6, também pelas células endoteliais (KURASAWA et al., 2000).

Muitas citocinas encontram-se envolvidas na patogênese da ES por estarem expressas na ES, mas a IL-6, o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e a IL-4, são consideradas muito importantes por atuarem mais fortemente na fibrose, sendo por isso talvez, as mais estudadas. Brown em um estudo recente, denominou a IL-6 como uma citocina pró-inflamatória clássica, considerando-a como uma importante proteína na imunopatogênese da ES (BROWN; O'REILLY, 2019). A IL-6 é uma citocina multifuncional, pertencente a uma família que também inclui a Oncostatina M (OSM), o Receptor do Fator Inibidor de Leucemia (RFIL) e Receptores da Oncostatina M (ROSM) (DE ALMEIDA, 2020). Ela é produzida por uma larga variedade de células do sistema imune, incluindo monócitos, macrófagos, células T ativadas, células dendríticas, eosinófilos, células endoteliais, fibroblastos e hepatócitos (VARGA; TROJANOWSKA; KUWANA, 2017), sendo encontrada, em níveis elevados no soro (NEEDLEMAN; WIGLEY; STAIR, 1992), na pele de pacientes com ES (KOCH et al., 1993), nos pacientes com doença intersticial pulmonar pela ES, correlacionando-se com a severidade e a progressão do acometimento cutâneo e com o envolvimento pulmonar naqueles pacientes (VARGA; TROJANOWSKA; KUWANA, 2017).

O efeito biológico da IL-6, apesar de não estar completamente elucidado, é descrito através da Oncostatina M(OSM), sendo mediado através de subunidades de um receptor, o gp130, também conhecido como CD130. Kitaba e colaboradores (2012) demonstraram que em camundongos transgênicos, que possuem a deficiência desse receptor, apresentaram menos inflamação e menos fibrose pulmonar, quando expostos a bleomicina (KITABA et al., 2012). Em seu estudo, comparando com indivíduos saudáveis, De Almeida e colaboradores (2020), observou um aumento nos níveis séricos dos rOSM (receptor da Oncostatina M) e sgp130 nos pacientes com ES, além da sua associação com úlceras digitais, o que pode sugerir uma possível participação desse receptor na vasculopatia da ES (DE ALMEIDA, 2020). A importância da IL-6 foi igualmente comprovada por O'Reilly e colaboradores (2014), que também demonstraram níveis dessa citocina elevados no soro de pacientes com ES, além do que, os linfócitos desses pacientes quando isolados, expressam espontaneamente essa citocina. Resultados animadores foram apresentados por Shima e colaboradores (2016) em seu estudo no controle da doença, utilizando um medicamento, o tocilizumabe, um conhecido anticorpo anti receptor da IL-6, naqueles pacientes com acometimento cutâneo pela ES (SHIMA et al., 2010). Em outro estudo recentemente publicado, Khanna e colaboradores (2020) demonstrou que a inibição da sinalização do receptor da IL-6, pode melhorar a função pulmonar em pacientes com ES (KHANNA et al., 2020). Todos esses possíveis mecanismos do envolvimento da IL-6 na complexa fisiopatologia da ES, justificam a tentativa de bloqueio dessa citocina nessa linha de pesquisa.

O TGF- β , é reconhecido como um outro importante indutor de fibrose, por estimular a síntese do colágeno pelos fibroblastos e miofibroblastos. Esse fator de crescimento, secretado por várias células, incluindo os próprios fibroblastos, miofibroblastos, além de células T, monócitos, macrófagos e plaquetas, é considerado um dos principais componentes das proteínas estruturais da MEC, e é por vários autores, descrito assim, por apresentar anormalidades na sua via de sinalização em indivíduos portadores de ES (KATSUMOTO; WHITFIELD; CONNOLLY, 2011). A sua assinatura está correlacionada com certas expressões gênicas avaliadas em fibroblastos na derme desses pacientes (SARGENT et al., 2010).

Com relação a IL-4, estudos *in vitro*, apoiam a ideia de que essa citocina, promova a fibrose através do aumento da capacidade da produção de colágeno e outras proteínas da MEC, enquanto os anticorpos anti IL-4 previnam a fibrose dérmica

em modelo de *mouse tight skin* (Tsk). Brown e O' Reilly (2018) descreveram como características comuns em pacientes com ES, a elevação dos níveis de IL-4, na pele, no pulmão e também no sangue, sugerindo seu papel importante na ES (BROWN; O'REILLY, 2019). A IL-4 estimula a proliferação, quimiotaxia, síntese de colágeno e a produção de TGF- β , CTGF e TIMP em fibroblastos normais (POSTLETHWAITE et al., 1992). Em pacientes com ES foram identificados além dos níveis séricos elevados de IL-4, um aumento no número de linfócitos T que produzem também IL-4 (HASEGAWA et al., 1997; SAKKAS et al., 1999). Além disso, também foi detectada a expressão aumentada de IL-4, e o seu RNAm em fibroblastos cutâneos (BARAUT et al., 2012) demonstrando o importante papel dessa citocina nessa doença.

A IL-13, é uma citocina produzida predominantemente pelas células Th2, inicialmente descrita com destaque na asma, no entanto, parece possuir um importante papel pro fibrótico (VARGA; TROJANOWSKA; KUWANA, 2017). Destaca-se por ser decorrente da estimulação da produção de TGF- β pelos macrófagos, e pela estimulação direta da proliferação de fibroblastos e da síntese de colágeno (MEDSGER et al., 2011). Níveis séricos aumentados de IL-13 foram detectados em pacientes com ES, quando comparado com indivíduos saudáveis (HASEGAWA et al., 1997; SATO; HASEGAWA; TAKEHARA, 2001), além disso, uma expressão desregulada de IL-13 por linfócitos CD8+ efetores em pacientes com ES, apresenta uma provável correlação com formas mais graves da doença cutânea segundo demonstra o estudo de Medsger e colaboradores (2011). No modelo animal da fibrose pulmonar induzida pela bleomicina, Belperio e colaboradores (2002), encontrou níveis de IL-13 aumentados, enquanto que a sua neutralização, demonstrou atenuar a fibrose e a inflamação acarretada por aquele fármaco provando que essa citocina detém um importante papel na fibrose tecidual (BELPERIO et al., 2002; MEDSGER et al., 2011).

As quimiocinas também têm o seu destaque no processo da fibrogênese. Incluem uma grande família de citocinas, e estão envolvidas em várias funções celulares como, motilidade celular no desenvolvimento, manutenção da arquitetura tecidual, além da resposta imune e inflamatória (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). A quimiocina CCL2/MCP-1 estimula a produção de colágeno diretamente, assim como através da produção endógena do TGF- β pelos macrófagos. Ferreira e colaboradores (2006) demonstraram que, nos pacientes com ES os níveis séricos das quimiocinas

MIP-1 α , IL-8, CXCL8 e CCL18, estão elevados e podem correlacionar-se com a extensão da fibrose da pele (FERREIRA et al., 2006).

O ligante de quimiocina (C-C motif) 2 (CCL-2), também denominado de proteína-1 quimioatraente de monócito (MCP-1), é produzido por várias células imunes, tais como macrófagos, fibroblastos e células endoteliais (ROUMM et al., 1984). Seu papel principal reside na migração e na ativação dos monócitos e das células T (MATSUSHITA; TAKEHARA, 2017), mas também pode induzir a polarização das células T-helper 2, estimulando a produção de colágeno pelos fibroblastos, através da via dos receptores específicos e pela via da regulação positiva da expressão de TGF- β (BANDINELLI et al., 2012). Somando-se às funções de recrutamento de células imunes durante o processo inflamatório, as quimiocinas, também desempenham um papel importante durante a homeostase celular (WASMUTH; TACKE; TRAUTWEIN, 2010). Estudos realizados em pacientes com ES, vêm demonstrando seus níveis séricos elevados, e a sua diminuição quando se tem uma melhora na fibrose naqueles pacientes. A CCL-2/MCP-1 é facilmente detectável em sangue periférico, em comparação com outras citocinas e/ou fatores de crescimento. No estudo realizado por Bandinelli e colaboradores (2012), observaram a diminuição da secreção da CCL-2, correlacionando com as variações dos escores de Rodnan total, durante três anos de acompanhamento desses pacientes. O estudo também sugeriu que, a concentração sérica da CCL-2 pode ser utilizada para correlacionar a atividade de doença, e o efeito terapêutico por estar intimamente relacionada com a melhora da esclerose da pele (BANDINELLI et al., 2012).

Outra quimiocina investigada nas doenças autoimunes e especialmente na ES é a IP-10, também conhecida como *IFN-g-inducible protein-10*. Pesquisada por contribuir na manutenção da inflamação nessas doenças, também é estudada nos processos alérgicos (FUJII, 2004). A resposta imune dessa quimiocina, se faz principalmente pela via Th1, e encontra-se expressada fortemente em fibroblastos, queratinócitos e células mononucleares na pele dos indivíduos com ES (DISTLER, 1999). Alguns autores descreveram como uma quimiocina que esta correlacionada com o dano tecidual e o envolvimento de órgãos especialmente como dano pulmonar (HASEGAWA, 1999; FURUSE, 2003). Fujii e colaboradores detectaram níveis séricos elevados em 24/64 (38%) dos pacientes com ES em seu estudo, comparando com indivíduos normais, sendo significativamente mais elevada tanto na ESCD quanto na ESCL em comparação com controles normais (15/34, 44% e 9/30, 30%; $p < 0.0001$ e

$p < 0:005$, respectivamente), no entanto não se encontrou diferença estatística entre as formas clínicas da ES (FUJII, 2004).

A IL-8, outra citocina envolvida na patogênese da ES, é considerada pelos autores como um potente fator angiogênico, participando desde a fase mais precoce da doença. É produzida por vários tipos de células envolvidas no processo imune, como macrófagos e células endoteliais (KOCH,1993). Dados de vários estudos demonstraram o papel central do estresse oxidativo na ES na patogênese e na fibrogênese de órgãos internos nesses pacientes, destacando a interação de um estado de estresse oxidativo e ativação anormal de vias pró-inflamatórias. De fato, linfócitos, células T auxiliares, ativação de células B e citocinas pró-inflamatórias participam do dano tecidual causado por ES, através da superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS). E nesse sentido, várias linhas de evidências indicam que a interleucina (IL)-8 possa ser importante na patogênese da ES, estando elevada no sangue de pacientes com ES, sendo a sua produção/secreção fortemente sustentada por células imunes e fibroblastos (LUIGI, 2020).

A IL-17 compreende uma família de citocinas. A exemplo disso, temos IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D (também conhecida como IL-27), a IL-17E (conhecida também como IL-25) e a IL-17F (CHIZZOLINI; DUFOUR; BREMBILLA, 2018). Dentre essas, a mais estudada é a IL-17A, que quando comparada aos indivíduos saudáveis, essa citocina encontra-se aumentada tanto no soro quanto em órgãos alvo na ES. As células Th17, as quais se destacam por produzirem a IL-17A e IL-17F, apresentam, entretanto um papel controverso, e por isso têm sido motivo de revisão recentemente publicada por Krasimirova e colaboradores (2017), uma vez que, esses autores demonstraram que pode estar associada tanto a um aumento, quanto a uma diminuição da produção de colágeno entre os indivíduos portadores de ES, em relação aos saudáveis. As razões ainda não parecem definidas, podendo estar associadas também à presença de uma proteína recombinante (KRASIMIROVA et al., 2017), razões pelas quais ela faz parte de nosso estudo.

A IL-29, é uma citocina conhecida também como IFN-lambda 1 (IFN- λ 1), e é pertencente à família dos Interferons. A IL-29 costuma estar presente em vários tecidos, e pode ser produzida pelas células mononucleares periféricas (PBMC) e células dendríticas (GALLAGHER et al., 2010; WU et al., 2013). Pesquisada por participar da ativação e sinalização das vias JAK-STATs e MAPKs, e das respostas antiproliferativas, antitumorais e imunes antiviral, entretanto, o seu papel em doenças

inflamatórias crônicas e autoimunes, integra vários estudos de modelo experimental, por isso, não está completamente esclarecida (LI et al., 2009). Dantas e colaboradores (2015) encontrou um aumento dos níveis séricos de IL-29 em comparação com controles saudáveis. Em seu estudo *in vitro*, pôde também correlacionar, com manifestações clínicas, especificamente com o envolvimento muscular, esse descrito em até 70% dos pacientes com ES (DANTAS et al., 2015).

Apesar da maioria dos estudos apontarem para uma resposta predominantemente Th2 através da expressão de várias citocinas na ES, tais como as IL-4, IL-6 e IL-13, existem outros estudos sugerem que a resposta Th1 também possa ser destacada (MAVILIA et al., 1997). Dessa forma, vários autores sugerem a avaliação dessas citocinas/quimiocinas, em consonância com outras doenças autoimunes, como a artrite reumatoide e a psoríase, podendo fazer parte das citocinas a serem pesquisadas a fim de avaliar atividade e gravidade da doença (FUJII et al., 2004; PATEL; ZACHARIAH; WHICHARD, 2001), razão pela qual integra o nosso painel de citocinas pesquisadas.

2.3 TRATAMENTOS DA ESCLEROSE SISTÊMICA

2.3.1 Tratamentos convencionais

A abordagem terapêutica dos pacientes com ES de forma geral, baseia-se na extensão e gravidade das manifestações clínicas existentes, uma vez que devido a sua variabilidade clínica e fenotípica, além da escassez de uma terapia eficaz, ainda não possuímos uma terapia capaz de tratar todos os acometimentos dessa doença. O tratamento proposto, no entanto, além de possuir uma abordagem multidisciplinar, envolvendo medidas que se propõem à educação do paciente, tais como proteção ao frio, vacinação, suspensão do tabagismo, medidas antirefluxo, apoio nutricional e reabilitação cardiopulmonar, requer a utilização de um esquema terapêutico, que dependerá do fenótipo apresentado pelo paciente e de acordo com a gravidade das complicações vasculares, inflamatórias e/ou fibróticas que ele apresente. Embora, a maioria das terapias disponíveis baseie-se no alívio sintomático, expostas abaixo (Quadro 2), existem atualmente poucas opções consideradas eficazes para o controle

da doença (TYNDALL; MATUCCI-CERINIC; MÜLLER-LADNER, 2009). A figura 6 esquematiza os tratamentos de acordo com as manifestações clínicas e/ou fenótipo do paciente.

2.3.2 Novas Terapias

Estudos têm se voltado para o desenvolvimento de terapias, que atuem de uma forma melhor e mais eficiente no controle da fibrose e da vasculopatia, e dessa forma integrando o tratamento da ES. Nessa linha de pesquisa, um estudo publicado por DISTLER (2019), demonstrou que um inibidor intracelular da tirosinoquinase, importante na transformação do fibroblasto em miofibroblato e consequentemente no aumento da deposição na matriz extracelular, o Nintedanibe, foi capaz de diminuir a capacidade vital forçada nos pacientes com ES, em um estudo duplo cego, controlado por placebo com significância estatística (diferença de 41.0 ml por ano; 95%, intervalo de confiança [CI], 2.9 para 79.0; $p = 0.04$), sem no entanto se mostrar igualmente eficaz, quando se utilizou o mRSS ao final desse estudo (semana 52), não encontrando diferenças entre os grupos (95% CI, -0.94 para 0.53; $p = 0.58$) (DISTLER et al, 2019).

Em um outro estudo, porém com semelhante desenho, utilizando um anticorpo anti receptor da IL-6, o Tocilizumabe, não encontrou diferença na mudança do espessamento da pele nos pacientes com ES após seu emprego nas 48 semanas, em comparação com aqueles tratados com o placebo. No entanto, resultados no desfecho secundário, sugere estabilização da função pulmonar, por ter sido observada uma redução da capacidade vital forçada (FVC), apesar de não sido estatisticamente significativa, (-4.4 no grupo placebo e -6.1 no grupo Tocilizumabe [95% IC-3.8 para 0.3]; $p=0.10$) (KHANNA et al, 2020).

O transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas, consiste em uma alternativa terapêutica, no entanto tem sido indicado, para o tratamento de formas graves e refratárias de ES, no que se refere à piora progressiva do envolvimento cutâneo difuso ou da doença intersticial pulmonar (BURT et al, 2011).

Diante dos avanços na elucidação da fisiopatologia da ES, esforços têm sido empreendidos para o desenvolvimento de novos fármacos, bem como da aprovação de fármacos já utilizados para outras doenças que possam trazer benefícios na patogênese da ES e consequentemente no controle da progressão de dano.

Quadro 2 - Esquematização de tratamento das manifestações clínicas para a Esclerose Sistêmica:

VASCULAR	BCC (nifedipina, anlodipina), Inibidores da 5-PDE, Flouxetina, Losartana, Prostanoides venosos (iloprost*), Bosentana(úlceras digitais) tratamento de infecção secundária
PULMONAR	Se HAP: ERA(bosentana, ambrisentana), Inibidores da 5-PDE(sildenafil, tadalafil) Se Dça Intersticial: Ciclofosfamida, MMF, RTX, Pirfenidona, Transplante de cél. tronco e TCZ
RENAL	IECA em altas doses, uso de outros antihipertensivos (BRA, BCC), terapia renal substitutiva , transplante renal
GASTRO INTESTINAL	IBP e antagonista receptor H2, procinéticos, cirurgias em casos refratários, antibioticos , suporte nutricional
CUTÂNEO	Corticoide, MTX, Azatioprina, MMF, HCQ, LFN, Imunoglobulina humana, RTX , TCZ

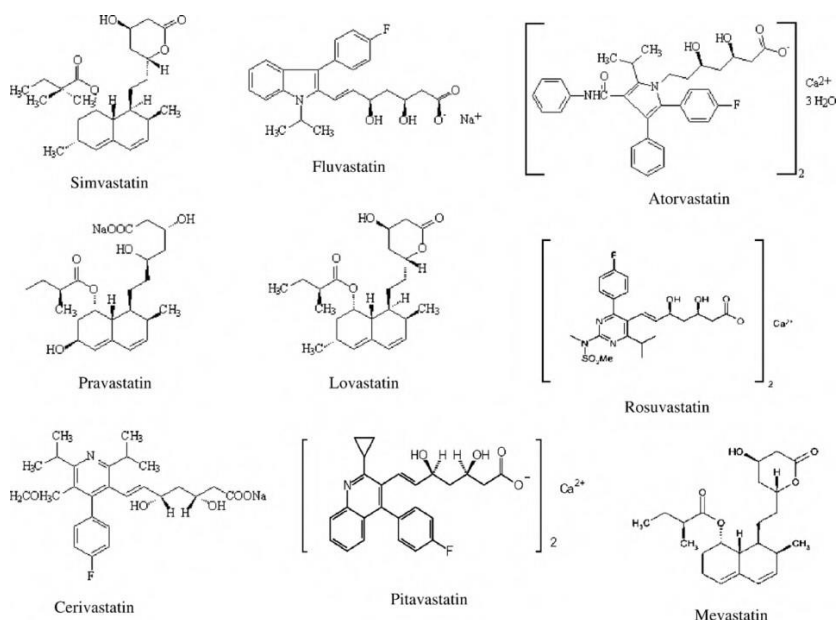
BCC: bloqueadores de canais de cálcio; inibidores da 5-PDE(5-fosfodiesterase); HAP: hipertensão arterial pulmonar; ERA: antagonista dos receptores da endotelina; MMF: micofenolato de mofetila; RTX: rituximabe; TCZ: tocilizumabe; IECA: inibidor da enzima conversora da angiotensina; BRA: bloqueador dos receptores da angiotensina; IBP: inibidor da bomba de prótons; MTX: metotrexato, HCQ: hidroxicloroquina; LFN: leflunomida
Fonte: Adaptado do Livro da Sociedade Brasileira de Reumatologia, (2021)

2.3.2.1 Estatinas

Há décadas, as estatinas têm sido utilizadas com sucesso no tratamento da dislipidemia e da doença cardiovascular, devido a sua ação hipolipemiante e anti-aterosclerótica (LAROSA; HE; VUPPUTURI, 1999). Conhecidas como um inibidor da HMG CoA redutase (do inglês- *3-hidroxi 3-methylglutaryl coenzima A*), sendo essa, a enzima responsável pela biossíntese do colesterol (figura 6) (TRISTANO; FULLER, 2006). As estatinas disponíveis incluem: sinvastatina, lovastatina, pravastatina,

fluvastatina, atorvastatina, rosuvastatina, merivastatina, pitavastatina (U.S. FOOD & DRUGS ADMINISTRATION, 2021). Figura 6.

Figura 6 - Estatinas disponíveis no mercado certificadas pelo Estados Unidos FDA (Administração de Alimentos e Medicamentos)



Fonte: Adaptado de TRISTANO, FULLER, (2006)

A família das estatinas compreende as que ocorrem naturalmente (lovastatina, mevastatina, pravastatina e sinvastatina), ou seja, aquelas que são pró fármacos da lactona inativos, que por sua vez, são hidrolisados no trato gastrointestinal em derivados β -hidroxila ativos, e as sintéticas (fluvastatina, atorvastatina, cerivastatina e rosuvastatina), diferenciando em sua lipossolubilidade, meia-vida e potência farmacológica. A atorvastatina, a fluvastatina e a rosuvastatina são congêneres que contêm flúor e são ativadas quando administradas. A absorção das doses ingeridas dos inibidores da redutase varia de 40 a 75%, à exceção da fluvastatina, cuja absorção é quase completa. Todos esses fármacos sofrem elevada extração na primeira passagem pelo fígado. A maior parte da dose absorvida é excretada na bile; 5 a 20% são excretados na urina. A meia-vida plasmática desses fármacos varia de 1 a 3 horas, à exceção da atorvastatina (14 horas), da pitavastatina (12 horas) e da rosuvastatina (19 horas). Todas as estatinas, independentemente das suas diferenças estruturais, ligam-se competitivamente à HMGCoA redutase, resultando em uma falha ao catalisar a conversão de HMG-CoA em ácido L mevalônico, por sua vez, impedindo

a biossíntese à jusante da molécula do colesterol (GREENWOOD; STEINMAN; ZAMVIL, 2006; TRISTANO; FULLER, 2006). Ocorre ainda, a diminuição dos intermediários isoprenóides, como farnesil pirofosfato (FPP) e pirofosfato de geranylgeranyl (GGPP), alguns dos quais fazem parte da composição de proteínas específicas. Estas proteínas incluem as GTPases da família Ras, Rho e Rab, que são responsáveis pelo crescimento, sobrevivência e diferenciação celular (MACKAY; HALL, 1998; SHAH et al., 2019; SOMSEL RODMAN; WANDINGER-NESS, 2000).

A importância desse mecanismo envolve a compreensão dos efeitos pleiotrópicos das estatinas, sendo esses, considerados anti-inflamatórios e imunomoduladores. Estudos *in vitro* demonstram que o efeito anti-inflamatório das estatinas, pode resultar de sua capacidade de interferir através da via do mevalonato, inibindo assim, a prenilação de certas proteínas (proteínas Rho) nas células T e no receptor ativador do fator ligante *kappa* conhecido como RANKL, além do fator de necrose tumoral alfa (anti-TNF- α), estimulando a diferenciação das células progenitoras dentro dos osteoclastos, resultando em falha nas vias de regulação das GTPases (GHITTONI et al., 2005; WOO et al., 2005).

As estatinas demonstraram serem detentoras de diferentes efeitos nas doenças autoimunes, provavelmente devido à redução da expressão do complexo maior de histocompatibilidade II (MHC-II) nos macrófagos, e a uma mudança da resposta patogênica dos linfócitos T-helper (Th1), através de uma resposta protetora do linfócito T auxiliar (Th2), seguida de apoptose celular. Essa redução na expressão de MHC-II, tanto nos macrófagos quanto nas células endoteliais, recebem o auxílio do interferon gama (IFN- γ), (KWAK et al., 2000), e se ligam diretamente ao LFA-1 (do inglês *leucocyte fuction antigen-1*), uma molécula que promove a adesão leucocitária, liberando a co-estimulação e ativação da célula T, facilitando por sua vez, a compreensão desse mecanismo (TRISTANO; FULLER, 2006). Ghittoni e colaboradores (2005) demonstrou, que a sinvastatina inibe a expressão da célula T resultando em desregulação da prenilação/isoprenilação, nome que se dá à modificação de uma proteína, através da adição de um lipídio isoprenoíde, naqueles que possuem o 15-carbono farnasyl ou o 20-carbono farnasyl na sua composição, nas moléculas proteicas chave como as GTPases Ras, Rac e Rho, além das MAP quinases, cruciais na supressão da ativação da célula T, sugerindo uma clara fundamentação científica para a realização dos estudos clínicos controlados

abordando o tratamento das doenças autoimunes com esses fármacos (GHITTONI et al., 2005; GREENWOOD; STEINMAN; ZAMVIL, 2006).

Apesar da escassez de ensaios clínicos capazes de confirmar o efeito anti-inflamatório das estatinas, daqueles observados *in vitro* e em estudos com animais, Abud - Mendoza (2003) em um estudo preliminar, demonstrou que as estatinas foram capazes de induzir uma redução rápida e significativa nos níveis de proteinúria em três pacientes com lúpus eritematoso sistêmico com envolvimento renal, além de reduzir os níveis da Proteína C Reativa (PCR), sugerindo uma possível interferência na ativação do antígeno CD29 pelas PBMCs, além de contribuir com a apoptose celular. Em outro estudo esse em modelo animal, os autores conseguiram demonstrar que, na artrite induzida por colágeno em camundongos e em células humanas estimuladas com anti-CD3/anti-CD28 (*in vitro*), a sinvastatina efetivamente suprimiu a severidade da artrite, através da redução da atividade do quadro de artrite inicial, comprovando-se isso, tanto pela redução do edema articular quanto pelo número de articulações acometidas. Além disso, nas células estimuladas, eles puderam observar a redução da produção de IL-6, IL-12, TNF-alfa e IFN-gama, levando os autores a concluir, ser a sinvastatina capaz de agir suprimindo a resposta Th1 (LEUNG et al., 2003).

Outras evidências a respeito desse efeito benéfico das estatinas, vêm de outros estudos em modelo animal (DIOMEDE et al., 2001; KIMURA et al., 1997; SPARROW et al., 2001; STALKER; LEFER; SCALIA, 2001), que demonstraram que as estatinas, podem inibir o recrutamento dos leucócitos na inflamação aguda, devido a uma desregulação entre a expressão da célula T, a MCP-1 e a IL-6 (DIOMEDE et al., 2001), com redução da agregação e a ativação das plaquetas (KIMURA et al., 1997).

Abou-Raya e colaboradores (2007), em seu estudo de intervenção, avaliou o papel das estatinas na disfunção endotelial na ES, através da importância de seus marcadores como, a Endotelina 1 (ED-1), níveis plasmáticos de nitrato e de Trombomodulina, além de dosagens de PCR e de Fibrinogênio, de Peróxido Lipídico, de Malonyladeído, através de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA- do inglês *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*), e pela avaliação do fluxo braquial mensurado através da ultrassonografia. Os autores comprovaram o efeito benéfico das estatinas, promovendo proteção ao endotélio vascular (ABOU-RAYA; ABOU-RAYA; HELMII, 2007).

Esse efeito das estatinas, denominado de pleiotrópico, é revelado em ensaios experimentais, que sugerem que, as estatinas podem assumir o papel imunomodulador na ES. Os efeitos imunomoduladores nas células da parede vascular podem modificar a progressão da lesão vascular na ES (ABOU-RAYA; ABOU-RAYA; HELMII, 2007). Em um estudo de revisão a cerca do papel das estatinas na ES, ressaltou a importância delas junto aos fatores solúveis da inflamação, esses responsáveis por alterações fisiopatológicas da ES. Nessa revisão, 13 estudos demonstraram uma redução significativa dos marcadores inflamatórios. A exemplo disso, temos a IL-6, a E-selectina, o Fator de Crescimento Endotelial, a Endotelina-1 e o Fator de Crescimento dos Fibroblastos (VEGF- *do inglês- vascular endothelial growth factor*), que tiveram redução significativa, naqueles pacientes estavam em uso de estatinas (LADAK; POPE, 2016).

No entanto, a associação entre os níveis de colesterol e a regulação imunológica, pode ser mais próxima do que se pensava anteriormente. A possibilidade do efeito imunológico observado com a utilização das estatinas sugere um papel subjacente comum, que provavelmente está associada à capacidade na redução dos níveis de colesterol através desse fármaco. A molécula de colesterol, por sua vez é uma componente chave da estrutura e da função das membranas celulares. A resposta dos linfócitos a sinais exógenos, como a um antígeno, é orquestrada por uma série de moléculas que se agrupam em áreas ricas em colesterol na membrana celular, conhecidas como verdadeiras pontes lipídicas. Essas estruturas atuam como plataformas, reunindo moléculas essenciais para a ativação de células imunes, mas também separando tais moléculas, quando as condições de ativação não sejam adequadas. A interrupção desses domínios, pela depleção do colesterol pode, entretanto, interromper as vias de sinalização das células imunológicas, sendo esse, mais um mecanismo, que poderia explicar e justificar a utilização das estatinas nas doenças imunológicas (RAZZAQ et al., 2004).

Louneva e colaboradores (2006) demonstraram *in vitro*, que a sinvastatina por sua vez, é um potente inibidor da expressão gênica do colágeno tipo I, comprovando que em indivíduos portadores de ES, os fibroblastos tratados com sinvastatina com variadas concentrações (1.25 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M e 10 μ M), o que correspondem a cerca de 50 a 100 vezes daquelas utilizadas, quando na administração oral daquele medicamento. Entretanto, observou-se também que, essas promoveram uma importante redução de colágeno tipo I (77%), já na concentração de 5 μ M e de 84% na

concentração seguinte (de 10 μ M). Esse estudo possui um particular interesse, pois mesmo utilizando concentrações diferentes desse fármaco, não se observou sinais de toxicidade nas células estudadas, sendo esse estudo semelhante a outros, que abordam o mesmo tema. Sabemos, no entanto, que *in vivo*, o efeito inibitório e a sensibilidade do fármaco possam estar relacionadas à facilidade dos compostos para na penetração celular, uma vez que, por exemplo, as membranas celulares do fígado são extremamente mais permeáveis às estatinas, enquanto as membranas de outros tipos de células são mais resistentes (LOUNEVA et al., 2006) levando em consideração que, doses elevadas da sinvastatina, associadas ou não aos demais medicamentos que esses indivíduos precisam utilizar para tratamento da complicações inerentes a ES, poderá acarretar na somação de efeitos adversos muito graves ou até mesmo irreversíveis senão fatais, limitando a elevação da dose deliberada desse fármaco em seres humanos (DALAKAS, 2012).

Os efeitos imunomoduladores das estatinas em diferentes modelos de doenças autoimunes foram, entretanto, apoiados por dados robustos de vários grupos independentes. A potência das estatinas com relação à imunossupressão é menor do que a de muitas das drogas imunossupressoras já estabelecidas e utilizadas, o que pode ser uma vantagem quando se trata de imunomodulação (ZEISER, 2018). Além disso, com base em seu modo de ação, que é principalmente o da via de inibição da geranilgeranilação e da farnesilação de proteínas, uma estratégia seria, a combinação com inibidores de diferentes vias capazes de serem úteis no tratamento da ES (TAKAI; SASAKI; MATOZAKI, 2001).

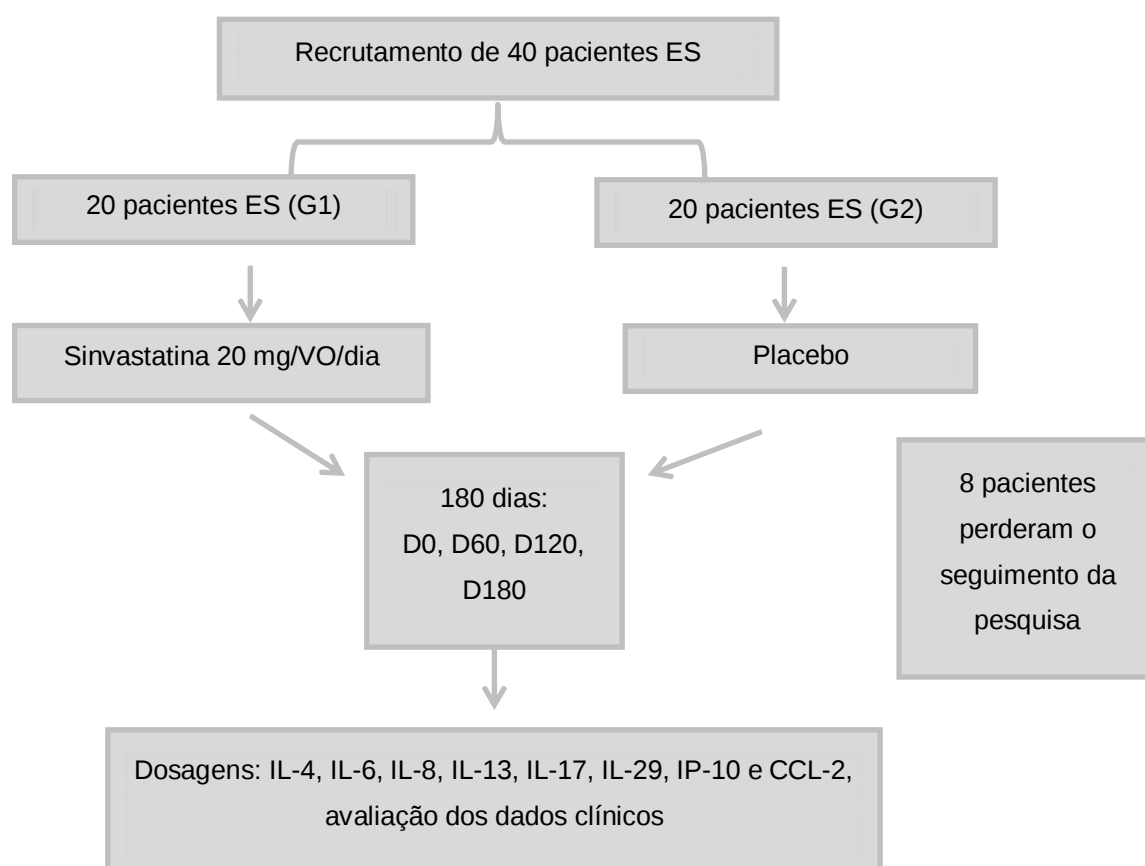
Quanto as doses preconizadas nos diversos estudos, alguns autores como Greenwood (2006), descreveram que a concentração circulante das estatinas, uma vez utilizadas em doses acima do recomendado e por períodos mais prolongados como observamos em alguns estudos, poderá acarretar em graves efeitos colaterais eventualmente fatais, como a rabdomiólise, necessitando assim, haver um controle entre a sua eficácia justificada pelos reconhecidos efeitos cardiovasculares e possível papel na imunomodulação das doenças imunomediadas e a sua toxicidade (GREENWOOD; STEINMAN; ZAMVIL, 2006). No entanto, diante dessa nova perspectiva da pluralidade do papel das estatinas nas referidas doenças imune mediadas, dada a ampla funcionalidade desse grupo farmacológico, devemos reconhecer um possível reposicionamento desse fármaco no tratamento das doenças imunomediadas.

3 MÉTODO

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Segue abaixo o desenho esquemático resumido do delineamento do ensaio clínico randomizado (figura 7) realizado durante o estudo.

Figura 7 - Desenho esquemático do delineamento do estudo



Fonte: A autora (2022)

3.2 TIPO E LOCAL DO ESTUDO

Um ensaio clínico randomizado, triplo cego, controlado por placebo, com dois grupos, realizado durante o período de agosto de 2019 a março de 2020. Nas avaliações clínicas, foram coletadas amostras de material biológico (sangue venoso periférico) de pacientes em atendimento no ambulatório de Esclerose Sistêmica do

Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFPE, que atenderam aos critérios de inclusão e aceitaram participar da pesquisa. As análises para dosagem dos soros foram realizadas no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas - LINAT/UFPE.

3.3 RECRUTAMENTO DOS PACIENTES

Foram selecionados 40 pacientes recrutados do ambulatório de Esclerose Sistêmica do Hospital das Clínicas da UFPE. Por se tratar de uma doença rara, um estudo realizado em um único centro de pesquisa, o tamanho da amostra, tende a ser pequeno e, portanto, essa pesquisa foi baseada nos dados dos estudos clínicos já desenvolvidos com o mesmo delineamento. Esses pacientes foram subdivididos em dois grupos, onde o grupo G1 foi composto por 20 pacientes utilizando sinvastatina comprimidos com 20mg para serem administrados por via oral, uma vez ao dia em horário fixo, o grupo G2 composto de 20 pacientes que utilizaram placebo também sob a apresentação de comprimidos utilizados por via oral. Os critérios de alocação dos pacientes nos grupos foram de acordo com o processo de randomização e às cegas.

3.3.1 Critérios de Inclusão e Exclusão

3.3.1.1 Critério de inclusão

- Diagnóstico de ES de acordo com o ACR/EULAR, 2013;
- Idade entre 18 e 70 anos de idade
- Níveis séricos de colesterol total até 200mg/dl
- Consentimento por escrito para participar do estudo.

3.3.1.2 Critério de exclusão

- Gestantes, intolerância ou alergia à Estatinas ou seus derivados, estar em uso de Estatinas ou ter feito uso há menos de 30 dias, diabetes mellitus, insuficiência

cardíaca, insuficiência renal, hipertensão arterial, miopatias, hipotireoidismo e tabagismo.

- Estarem em uso de imunobiológicos

3.4 PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS

3.4.1 Inclusão, Avaliação Inicial e Seguimento

Os pacientes que preencheram os critérios de inclusão e exclusão, durante seu atendimento habitual agendado no ambulatório foram convidados a participar da pesquisa. Os pacientes que aceitaram fazer parte da pesquisa, após todos os esclarecimentos acerca do estudo, realizaram a leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Os pacientes foram subdivididos em dois grupos, onde o grupo G1 foi composto por 20 pacientes utilizando sinvastatina comprimidos com 20mg para serem administrados por via oral, uma vez ao dia em horário fixo, o grupo G2 composto de 20 pacientes que utilizaram placebo também comprimidos por via oral. O tempo de tratamento total do estudo foi de 180 (cento e oitenta) dias, divididos em quatro intervalos de tempo da seguinte forma: D0, D60, D120 e D180. Todo o medicamento e o placebo foram fornecidos aos participantes do estudo. Esses eram fornecidos a cada avaliação clínica realizada nas visitas clínicas nos intervalos de tempo determinados para o estudo (D0, D60, D120, D180) após todos os procedimentos para a sua inclusão, totalizando um período de 180(cento e oitenta) dias de utilização para todos os participantes da pesquisa.

Para as avaliações clínicas dos pacientes, realizadas nos respectivos tempos (D0, D60, D120, D180) obtinha-se o preenchimento da ficha clínica criada especificamente para este estudo (apêndice B). Na ficha clínica continha dados demográficos dos pacientes, dados da doença e seus órgãos ou sistemas acometidos, medicações em já utilizadas pelos participantes da pesquisa, e as variáveis de interesse definidas, como desfechos primários o HAQ, SHAQ e o mRSS. As avaliações clínicas foram realizadas por um único médico reumatologista pesquisador do estudo. Essas variáveis são utilizadas amplamente nos estudos a cerca do tema, e no nosso estudo foram incluídas: o início e o tempo (em meses) do

FRy, o início e o tempo (em meses) do sintoma não- FRy, a data do diagnóstico da doença, a forma clínica, a presença ou não de autoanticorpos, manifestações clínicas apresentadas na avaliação inicial pelo paciente, ou durante a realização do estudo, como o envolvimento da pele, o FRy, úlceras digitais (UD), doença pulmonar intersticial (DPI), hipertensão arterial pulmonar (HAP), artrite, miopatia, comprometimento esofageano, crise renal, telangiectasias e calcinose. Foram utilizados como desfechos clínicos, o escore de Rodnan modificado-MRSS, o questionário de avaliação de saúde o HAQ e o questionário de avaliação de saúde em ES o SHAQ, correlacionando-os com as citocinas e quimiocinas estudadas. O escore de Rodnan modificado, avalia o espessamento da pele, usando uma escala de 0-3 em 17 áreas do corpo (KHANNA, et al 2017). O HAQ é uma das medidas mais utilizadas para avaliar os distúrbios musculoesqueléticos na reumatologia, sendo usado na ES como uma métrica capaz de refletir o estado funcional dos pacientes (POPE, 2011). É autoaplicável, onde o paciente deve responder um questionário composto de 20 perguntas, subdivididas em 8 domínios que abordam situações rotineiras e diárias, tais como, a alimentação, a caminhada, a higiene pessoal, o ato de vestir-se, o de agarrar ou alcançar objetos (BRUCE; FRIES, 2003). Cada uma dessas perguntas possui um score que avalia o grau de dificuldade: 0 nenhuma dificuldade, 1 pouca dificuldade, 2 muita dificuldade, 3 não consegue realizar. O SHAQ, foi um questionário estendido para incluir o HAQ à ES, é aplicado em uma escala de deficiência mais específica para complicações frequentemente observadas na ES, fora do sistema músculo esquelético e inerentes à ES. É calculado, incorporando ao HAQ, cinco escalas visuais analógicas (VASs) para complicações inerentes à doença, que sejam: FR (fenômeno de Raynaud), UD (úlceras digitais), sintomas gastrointestinais, sintoma pulmonares e o quanto a doença altera a capacidade funcional do indivíduo, (BRUCE; FRIES, 2003). As escalas VAS no SHAQ são utilizadas para avaliar a interferência da doença com atividades diárias e variam de 0 (atividades não limitantes) a 100 (limitação muito severa) (JAEGER, et al., 2018). onde foi avaliado os critérios de diagnósticos definidos pelo ACR/EULAR (VAN DEN HOOGEN et al., 2013). Aos pacientes era permitido a utilização em associação dos medicamentos considerados sintomáticos e imunossupressores, necessários para de acordo com as complicações inerentes a ES, tais como: bloqueadores de canais de cálcio (BCC), inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA), bloqueadores do sistema renina angiotensina (BRA), ácido acetilsalicílico, inibidores da bomba de

prótons (IBP), e drogas procinéticas. Os pacientes que utilizavam imunobiológicos eram excluídos da pesquisa. Outros dados clínicos e laboratoriais foram coletados no acompanhamento dos pacientes (Tabela 4). Além disso, foram entregues para cada participante da pesquisa, um diário de tomada da medicação, para o registro de uso da medicação em estudo, quanto aos possíveis eventos adversos ou sintomas associados a tomada do medicamento, esses diários foram analisados pelo reumatologista avaliador a cada visita clínica.

Aos pacientes do grupo G1, era fornecido a cada avaliação, o quantitativo do medicamento equivalente para o período de sessenta dias, intervalo entre as visitas clínicas. A sinvastatina foi orientada a ser administrada diariamente por via oral sob a forma de comprimidos de 20mg, a ser ingerida com líquido de preferência água potável. Todo o medicamento, foi fornecido aos pacientes foi do mesmo fabricante e do mesmo lote de fabricação. O placebo era administrado sob a forma de comprimidos também por via oral. O paciente que não utilizasse pelo menos 70% do medicamento ou do placebo, assim como não comparecesse às visitas era excluído da pesquisa.

3.4.2 Randomização

Após a avaliação clínica inicial, foi realizada a randomização dos pacientes para alocação no grupo que recebeu sinvastatina (G1) e no grupo placebo (G2). Uma tabela com números aleatórios foi gerada através de um programa de computador, o Research Randomizer (Social Psychology Network, <http://www.randomizer.org/>), permitindo com isso a aleatoriedade na composição dos grupos (intervenção/placebo) e consequentemente minimizando a possibilidade do viés de seleção. Obtivemos igual número de participantes, a fim de aumentar a eficiência do estudo. A cada paciente incluído, foi atribuído um número previamente sorteado, e entregue a ele, em um envelope lacrado com a identificação através de um número no seu interior, onde estava inserida a informação sobre o grupo que ele fez parte. Esse envelope só foi aberto pelo único pesquisador não cego, responsável por fornecer a medicação ou o placebo ao participante da pesquisa. No presente estudo todos os pesquisadores envolvidos, como, o reumatologista avaliador, os coletadores das

amostras, o paciente e o avaliador dos dados estatísticos foram cegos, garantindo assim, o adequado mascaramento e sigilo dos dados obtidos no estudo.

3.4.3 Acompanhamento

Os pacientes foram avaliados nos dias D0, D60, D120 e D180, através de uma consulta presencial, com o objetivo de verificar possíveis eventos adversos, realizar a avaliação clínica, a verificação do diário de tomada da medicação, bem como proceder com a coleta de sangue periférico e venoso para a realização das dosagens das citocinas e quimiocinas. O paciente que apresentasse eventos adversos e/ou uma aderência inferior a 70% do número de comprimidos que deveriam ter sido utilizados em qualquer uma das avaliações e intervalos das visitas clínicas, era excluído do estudo. Também eram excluídos os pacientes que, por quaisquer motivos, tivessem que interromper o seu tratamento com a sinvastatina, ou ainda, aqueles para os quais era prescrito as Estatinas para o tratamento de outras doenças.

3.5 COLETA E OBTENÇÃO DE AMOSTRAS

Foram coletados cerca de 20 ml de sangue venoso por punção venosa periférica à vácuo, utilizando tubo seco nos diferentes intervalos de tempo do estudo (D0, D60, D120, D180). Após a coleta, o soro foi separado por centrifugação a 2000 rpm, aceleração 6, freio 4 por 10 minutos, devidamente identificados e armazenado a -80° C no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas - LINAT situado no NUPIT-SG. Este material foi utilizado para posterior quantificação das citocinas.

3.6 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NO SORO DE PACIENTES PORTADORES DE ES EM USO DE SINVASTATINA E PLACEBO

As citocinas foram quantificadas pela técnica de ensaio imune enzimático (ELISA), do tipo sanduíche. Foram dosadas IL-4, IL-6, IL-8, IL-13, IL-17, IL-29, IP-10 (BD) e CCL-2 (Invitrogen) no soro dos pacientes ES participantes da pesquisa. Os

limites de detecção dos kits utilizados foram 3,9; 7,8; 1,5; 3,9; 3,9; 3,9; 7,8; 3,9 pg/mL, respectivamente de acordo com a tabela 3.

Tabela 3 - Dados dos tipos dos kits utilizados para as dosagens da citocinas e quimiocinas, com seus limites máximo e mínimo

Citocina/quimiocina	Marca do kit	Limite mínimo pg/mL	Limite máximo pg/mL
IL-4	BD	3,9	500
IL-6	BD	7,8	600
IL-8	BD	1,5	200
IL-13	BD	3,9	500
IL-17	BD	3,9	500
IL-29	BD	3,9	500
IP-10	BD	7,8	500
CCL-2	Invitrogen	3,9	500

Fonte: a autora (2022)

A metodologia seguiu as recomendações dos kits descritas abaixo:

3.6.1 Ensaio Elisa Referente ao Kit da BD:

- A placa de 96 poços (cavidade com meia área) de ELISA (marca: Greiner Bio-One Brasil) foi adicionada o anticorpo de captura *overnight* a 4°C em solução 0,1 M de Carbonato de Sódio, pH 9,5;
- Lavada 3 vezes com wash buffer (PBS1x com Tween-20 0,05%) e saturada com solução de bloqueio leite Molico desnatado (1x) em PBS1x por 1 hora;
- Lavada 3 vezes com wash buffer e adicionada curva padrão (standard), amostras e branco em solução de diluição leite Molico desnatado (1x) em PBS1x por 2 hora;
- Lavada 5 vezes com wash buffer e adicionada anticorpo de detecção e enzima (streptavidin-HRP) por 1 hora;

- Lavada 5 vezes com wash buffer e adicionada substrato tetramethylbenzide (TMB 1X) por 30 minutos no escuro;
- A reação foi parada com H_2SO_4 2N;
- A placa foi levada a uma leitura à 450nm dentro de 30 minutos da parada da reação.

3.6.2 Ensaio Elisa Referente ao Kit da Invitrogen:

- A placa de 96 poços (cavidade com meia área) de ELISA (marca: Greiner Bio-One Brasil) foi adicionada o anticorpo de captura *overnight* a 4°C em solução coating buffer 1x;
- Lavada 3 vezes com wash buffer (PBS1x com Tween-20 0,05%) e saturada com solução de bloqueio Elisa/Elisa spot (1x) em água Milli Q por 1 hora;
- Lavada 2 vezes com wash buffer e adicionada curva padrão (standard), amostras e branco em solução de diluição Elisa/Elisa spot (1x) em água Milli Q por 2 hora;
- Lavada 3 vezes com wash buffer e adicionada anticorpo de detecção por 30 min;
- Lavada 5 vezes com wash buffer e adicionada a enzima (streptavidin-HRP) por 1 hora;
- Lavada 7 vezes com wash buffer e adicionada substrato tetramethylbenzide (TMB 1X) por 30 minutos no escuro;
- A reação foi parada com H_2SO_4 2N;
- A placa foi levada a um leitor de ELISA à 450nm dentro de 30 minutos da parada da reação.

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados por um avaliador cego, o qual utilizou os Softwares STATA/SE 12.0, SPSS13.0(*Statistical Package for the Social Sciences*) para Windows e o Excel 2010. Os resultados foram descritos em forma de tabela com suas respectivas frequências absoluta e relativa. As variáveis numéricas foram representadas pelas medidas de tendência central e medidas de dispersão. Foram verificadas a existência de associação: Teste Qui-Quadrado e o Teste Exato de Fisher para as variáveis categóricas. O teste de Normalidade de Kolmogorov-Smirnov para variáveis quantitativas. Por fim comparação com dois grupos: Teste t-Student

(Distribuição Normal) e Mann-Whitney (Não Normal). O método utilizado para as medidas repetidas, foi o modelo de regressão linear misto, que leva em consideração a possível correlação entre os valores da variável resposta, que constituem medidas repetidas. Todos os testes foram aplicados com 95% de confiança, $p < 0,05$.

3.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS CONFORME A RESOLUÇÃO 466/12 DO CNS

As coletas foram realizadas após aprovação pelo comitê de ética em pesquisa do centro de ciências biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (ANEXO A) e leitura, assinatura e entrega do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), (APÊNDICE C), pelos participantes da pesquisa. Os participantes da pesquisa foram devidamente informados e qualquer dúvida foi esclarecida no momento ou posteriormente pelos contatos descritos na cópia que ficou em seu poder. As coletas de 20 ml de sangue venoso periférico, foram realizadas por profissionais treinados, competentes e orientados para reduzir os riscos, em ambiente seguro, seguindo todas as normas de boas práticas para o procedimento. Os dados coletados nesta pesquisa, provenientes dos resultados das amostras coletadas foram devidamente armazenadas em arquivos digitais em computadores e impressos nos cadernos de resultados sob responsabilidade do pesquisador responsável e pelo Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT). Todo o material referente a etapa de randomização dos pacientes foi guardado em um armário trancado no Ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas, sala 133, sob responsabilidade da pesquisadora principal.

Esse ensaio clínico foi registrado em setembro de 2019 no ReBEC (Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos) sob o número de registro: RBR-36qz3p.

4 RESULTADOS

Dos 40 pacientes inicialmente recrutados, 8 perderam o seguimento. Houve um óbito de causa não relacionada ao estudo, um paciente alegou evento adverso (disfunção sexual) e seis pacientes restantes deixaram de comparecer às consultas não sendo observado, óbitos decorrentes das complicações inerentes da ES. Esses pacientes também não apresentaram intercorrências clínicas adicionais e inerentes à ES, de modo a necessitar em serem excluídos da pesquisa. Trinta e dois pacientes permaneceram no estudo, onde 16 foram tratados com sinvastatina (G1) e 16 fizeram parte do grupo controle em uso de placebo (G2). Os dados descritivos dos pacientes estão demonstrados na tabela 4. Quando foram comparados os resultados entre os grupos, não foi encontrada diferença significativa entre as variáveis investigadas.

Em se tratando das variáveis clínicas, essas, estão descritas na tabela 4. A população estudada era na maioria, do gênero feminino (87,5%) e da forma ESCL (59,4%). Foi avaliado o FAN em apenas 26 dos indivíduos (81,25%) sendo encontrado resultado positivo em todos eles. Quanto ao perfil dos outros anticorpos, não pôde ser avaliado em todos os indivíduos, o anti-Scl-70 em quatorze pacientes (n=14), o anti-centrômero em quatro (n=4), e o anti-RNP em cinco (n=5) dos indivíduos envolvidos no estudo. O espessamento da pele foi um acometimento observado em todos os pacientes, a exceção daquele portador do Sine Escleroderma. O FRY, foi um sintoma encontrado em todos eles (100%). Apesar de 78,1% (n= 25) dos pacientes possuírem DPI, a maior parte deles não apresentavam HAP (81,2%, n=26). Apesar da artrite ter sido um sintoma frequente (n=25, 78,1%), a maior parte da população estudada não apresentava miopatia (n=27/ 84%). Apenas um pequeno percentual dos pacientes (12,9%) não apresentava comprometimento do trato gastrointestinal, esse avaliado através do envolvimento esofágico, diagnosticado nas avaliações clínicas anteriores ou observado durante o período do estudo. O acometimento renal, não foi observada em nenhum desses indivíduos, nem previamente, nem durante o período do estudo. No que se refere a presença de telangiectasias e de calcinose, a maior parte deles também, não apresentaram essa complicação clínica, 59,4% (n=19), 87,5% (n= 28), respectivamente.

Tabela 4 – Dados descritivos e características clínicas e laboratoriais do grupo intervenção (G1) e controle (G2) dos pacientes ES participantes do ensaio clínico

Variáveis	Total n (%)	Grupo G1 n (%)	Grupo G2 n (%)	p-valor
Idade (anos)		49,13 ± 13,03	48,88 ± 14,38	0,959 #
Tempo FRy(m)		141,00±83,91	99,13 ± 71,48	0,139 #
Tempo não FRy(m)		152,50±95,56	94,13 ± 62,03	0,051 #
Tempo de doença(m)		143,63±104,37	93,88 ± 68,88	0,124 #
Sexo				
Masculino	04 (12,5)	2 (12,5)	2 (12,5)	1,000 ¶¶
Feminino	28 (87,5)	14 (87,5)	14 (87,5)	
Forma Clínica				
Limitada	19 (59,4)	10 (62,5)	9 (56,2)	1,000 ¶¶
Difusa	12 (37,5)	6 (37,5)	6 (37,5)	
Sine Escleroderma	1 (3,1)	0 (0,0)	1 (6,3)	
Autoanticorpos				
FAN†	26 (81,25)	15 (46,88)	11 (53,2)	¶¶ ¶
Anti-RNP†	3 (60,0)	0 (0,0)	3 (60,0)	¶¶ ¶
Manifestações clínicas				
Pele	30 (96,8)	15 (48,2)	15 (48,2)	1,000 ¶¶
FRy	32 (100,0)	16 (50,0)	16 (50,0)	¶¶ ¶
UD	19 (59,4)	10 (62,5)	9 (56,2)	0,719 ¶
DPI	25 (78,1)	14 (87,5)	11 (68,7)	0,394 ¶¶
HAP	6 (18,8)	4 (25,0)	2 (12,5)	0,654 ¶¶
Artrite	25 (78,1)	15 (93,7)	10 (62,5)	0,083 ¶¶
Miosite	5 (15,6)	2 (12,5)	3 (18,8)	1,000 ¶¶
Comp.esofageano	27 (87,1)	14 (93,3)	13 (81,2)	0,600 ¶¶
Telangiectasias	13 (40,6)	7 (43,8)	6 (37,5)	0,719 ¶
Calcinose	4 (12,5)	2 (12,5)	2 (12,5)	1,000 ¶¶
Tratamento utilizado				
BCC	19 (59,4)	9 (56,2)	10 (62,5)	0,719 ¶
IECA	4 (12,5)	3 (18,8)	1 (6,3)	0,600 ¶¶
BRA	5 (15,6)	2 (12,5)	3 (18,8)	1,000 ¶¶
AAS	10 (31,3)	6 (37,5)	4 (25,0)	0,446 ¶
Sildenafil	8 (25,0)	4 (25,0)	4 (25,0)	1,000 ¶¶
Cilostazol	1 (3,1)	1 (6,3)	0 (0,0)	1,000 ¶¶
MTX	4 (12,5)	2 (12,5)	2 (12,5)	1,000 ¶¶
AZA	10 (31,3)	5 (31,3)	5 (31,3)	1,000 ¶
MMF	3 (9,4)	1 (6,3)	2 (12,5)	1,000 ¶¶
Ciclofosfamida EV	1 (3,1)	1 (6,3)	0 (0,0)	1,000 ¶¶
IBP	21 (65,6)	11 (68,7)	10 (62,5)	0,710 ¶
Procinético	17 (53,1)	8 (50,0)	9 (56,2)	0,723 ¶
Corticoide	11 (34,4)	6 (37,5)	5 (31,3)	0,710 ¶

diferença estatística. FRy: fenômeno de Raynaud; m: meses

FAN: fator antinuclear; Anti-Scl70: anticorpo anti DNA topo isomerase; Anti-RNP: anticorpo anti-ribonucleoproteína; FRy: fenômeno de Raynaud; UD: úlceras digitais; DPI: doença intersticial idiopática;

HAP: hipertensão arterial pulmonar; BCC: bloqueadores de canais de cálcio; IECA: inibidores da enzima conversora de angiotensina; BRA: bloqueadores da renina-angiotensina; AAS: ácido acetilsalicílico; MTX: metotrexato; MMF: micofenolato de mofetila; IBP: inibidores da bomba de prótons (¶)Teste Qui-Quadrado (¶¶)Teste Exato de Fisher (¶¶¶)Não aplicável; † exames realizados e positivos

Fonte: A autora (2022)

No que se refere às medicações associadas, apenas 40,6%(n=13) não utilizavam BCC, diferentemente dos IECA, dos BRA, e AAS onde cerca de 87,5%(n=28), 84,4%(n=27) e 68,7% (n= 22), também não faziam uso dessas substâncias respectivamente. Nenhum paciente utilizava a Pentoxifilina, considerado potente inibidor da fosfodiesterase, assim como também, os inibidores da endotelina-1 como a Bosertana. O uso dos Inibidores da 5-fosfodiesterase (Sildenafil), foi observado em um pequeno percentual dos indivíduos (25%/n=8). Da mesma forma pudemos observar que, certos imunossuppressores, como o MTX, AZAM, MMF e ciclofosfamida oral/venoso não foram utilizados pela maioria dos pacientes, 87,5%(n=28), 68,7%(n=22), 90,6%(n=29), 100%(n=32) 96,9%(n=31) respectivamente. O mesmo se observa quanto ao uso do corticoide, onde apenas 21 desses indivíduos (65,6%) não faziam uso desse fármaco durante o acompanhamento desse estudo. O mesmo não se observou quanto às substâncias conhecidas como procinéticas (Bromoprida, Domperidona), esses fármacos foram utilizados pela maior parte dos participantes dessa pesquisa (53,1%).

Os dados, no entanto, comprovam que a população de estudo se mostrou homogênea, não diferindo quanto à associação estatisticamente significativa entre os aspectos clínicos investigados nem quanto ao uso de medicamentos, analisados em relação aos grupos.

Para as análises de desfechos avaliamos os níveis das citocinas IL-4, IL-6, IL-13, e IL-17 e das quimiocinas IL-8, IP-10 e CCL-2. Não observamos níveis de expressão da IL-29. Obtivemos uma expressiva secreção das demais quimiocinas. Já as citocinas apresentaram uma baixa secreção em parte dos pacientes no grupo tratado G1. Para as análises dos desfechos foram aplicados os questionários avaliativos de referência para a ES: o mRSS, o HAQ e o SHAQ. Os dados obtidos foram comparados com a secreção de citocinas presentes no soro obtido no mesmo dia do questionário e das avaliações clínicas para ambos os grupos. Ao avaliar comparativamente as citocinas e quimiocinas séricas não encontramos diferenças estatísticas que pudessem estar relacionadas com o uso da sinvastatina para as variáveis mRSS, HAQ e SHAQ nos intervalos de tempo investigados entre os grupos. No entanto, ao se analisar quantitativamente, percebemos que as citocinas e quimiocinas nos diversos tempos das avaliações clínicas, apresentam uma tendência para a variação dos valores numéricos (tabela 5), apesar de não se verificar um p-

valor menor que 0,05 das citocinas/quimiocinas analisadas apenas a CCL-2 no grupo placebo.

Tabela 5 - Níveis séricos das citocinas e quimiocinas investigadas no grupo intervenção (G1) e controle (G2) dos pacientes ES participantes do ensaio clínico, nos diferentes tempos

Citocinas/ Tempo	D-0	D-60	D-120	D-180	p-valor
Grupo G1	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	
IL-6	12,45±12,91	5,94 ± 3,45	8,44 ± 8,78	12,33±13,63	0,267 [§]
CCL-2	848,65±1317,25	673,84±865,65	736,67±1265,53	482,42±445,11	0,193 [§]
IL-17	7,14 ± 5,85	7,67 ± 5,82	8,45 ± 9,67	4,53 ± 2,48	0,223 [§]
IL-4	10,31 ± 16,42	53,78 ± 176,49	63,09 ± 152,62	29,74 ± 90,76	0,270 [§]
IL-13	5,60 ± 6,79	8,82 ± 19,65	3,91 ± 0,00	3,91 ± 0,00	0,410 ^{§§}
IL-8	226,84 ± 193,83	277,84 ± 210,88	211,96 ± 147,02	149,14±150,29	0,195 [§]
IP-10	1218,94±2250,77	1251,14±1488,09	1695,99±3071,99	899,34±871,22	0,331 [§]
IL-29	-	-	-	-	-
Grupo G2					
IL-6	13,45 ± 21,45	18,52 ± 51,33	18,10 ± 46,18	20,71 ± 43,11	0,498 [§]
CCL-2	570,68 ± 258,93	487,57±283,18	450,83 ± 262,05	392,98±200,44	<0,001 ^{§§}
IL-17	23,57 ± 40,30	50,00 ± 106,96	49,44 ± 117,74	51,12 ± 137,22	0,322 [§]
IL-4	41,67 ± 149,72	41,24 ± 149,35	51,41 ± 187,37	58,76 ± 219,41	0,334 [§]
IL-13	5,58 ± 6,70	18,06 ± 39,38	5,89 ± 7,92	3,91 ± 0,00	0,199 [§]
IL-8	137,12 ± 120,93	645,15 ± 1967,42	695,40 ± 1955,24	619,69±1977,80	0,296 [§]
IP-10	1171,69±1859,87	763,37 ± 719,36	2094,96±4827,53	2061,17±4849,96	0,244 [§]
IL-29	-	-	-	-	-

([§]) Medidas Repetidas: Greenhouse-Geisser (^{§§}) Medidas Repetidas: Esfericidade Assumida. (A) Diferença estatisticamente significativa em relação a "D-0". - Não obtivemos secreção detectável da citocina IL-29

Fonte: a autora (2022)

Os resultados referentes ao cruzamento entre os grupos intervenção e controle entre as variáveis clínicas, mRSS, HAQ e SHAQ com a secreção das citocinas e quimiocinas estudadas, nos diferentes tempos das avaliações realizadas nos participantes do estudo, estão expostos na tabela 6. Constatamos variações numéricas, que demonstram uma diminuição das medidas dos desfechos clínicos escolhidos para esse estudo, iniciando com o mRSS, em ambos os grupos estudados nos 4 tempos. No que se refere ao HAQ em ambos os grupos, observamos uma diminuição dos parâmetros até o D-120, seguido de aumento no último tempo, e apesar de sugerir uma diferença entre os grupos, não apresentou significância

estatística entre eles. Com o SHAQ, observamos comportamento semelhante a aquele visto com o mRSS, também sem significância estatística.

Tabela 6 - Resultados do cruzamento entre os grupos intervenção (G1) e controle (G2) nos quatro tempos investigados

Variáveis	Grupo G1	Grupo G2	p-valor
	Média ± DP	Média ± DP	
RODNAN (D-0)	17,25 ± 6,85	23,56 ± 14,70	0,134 [§]
RODNAN (D-60)	14,69 ± 5,28	16,75 ± 11,78	0,530 [§]
RODNAN (D-120)	14,38 ± 4,83	16,75 ± 11,31	0,497 ^{§§}
RODNAN (D-180)	13,25 ± 6,71	12,63 ± 8,43	0,818 [§]
HAQ (D-0)	1,02 ± 0,87	0,98 ± 0,78	0,913 [§]
HAQ (D-60)	0,89 ± 0,91	0,88 ± 0,73	0,977 [§]
HAQ (D-120)	0,67 ± 0,82	0,68 ± 0,71	0,977 [§]
HAQ (D-180)	0,88 ± 0,91	0,83 ± 0,66	0,869 [§]
SHAQ (D-0)	2,46 ± 0,75	2,19 ± 0,61	0,268 [§]
SHAQ (D-60)	2,26 ± 0,55	2,13 ± 0,51	0,517 [§]
SHAQ (D-120)	2,27 ± 0,53	2,30 ± 0,33	0,849 [§]
SHAQ (D-180)	2,09 ± 0,51	2,18 ± 0,52	0,611 [§]
IL-6 (D-0)	12,45 ± 12,91	13,45 ± 21,45	0,242 ^{§§}
IL-6 (D-60)	5,94 ± 3,45	18,52 ± 51,33	0,890 ^{§§}
IL-6 (D-120)	8,44 ± 8,78	18,10 ± 46,18	0,755 ^{§§}
IL-6 (D-180)	12,33 ± 13,63	20,71 ± 43,11	0,897 ^{§§}
CCL-2 (D-0)	848,65 ± 1317,25	570,68 ± 258,93	0,706 ^{§§}
CCL-2 (D-60)	673,84 ± 865,65	487,57 ± 283,18	0,763 ^{§§}
CCL-2 (D-120)	736,67 ± 1265,53	450,83 ± 262,05	0,763 ^{§§}
CCL-2 (D-180)	482,42 ± 445,11	392,98 ± 200,44	0,469 [§]
IL-17 (D-0)	7,14 ± 5,85	23,57 ± 40,30	0,261 ^{§§}
IL-17 (D-60)	7,67 ± 5,82	50,00 ± 106,96	0,217 ^{§§}
IL-17 (D-120)	8,45 ± 9,67	49,44 ± 117,74	0,476 ^{§§}
IL-17 (D-180)	4,53 ± 2,48	51,12 ± 137,22	0,279 ^{§§}
IL-4 (D-0)	10,31 ± 16,42	41,67 ± 149,72	0,633 ^{§§}
IL-4 (D-60)	53,78 ± 176,49	41,24 ± 149,35	0,309 ^{§§}
IL-4 (D-120)	63,09 ± 152,62	51,41 ± 187,37	0,211 ^{§§}
IL-4 (D-180)	29,74 ± 90,76	58,76 ± 219,41	0,602 ^{§§}

IL-13 (D-0)	5,60 ± 6,79	5,58 ± 6,70	0,964 ^{§§}
IL-13 (D-60)	8,82 ± 19,65	18,06 ± 39,38	0,502 ^{§§}
IL-13 (D-120)	3,91 ± 0,00	5,89 ± 7,92	0,317 ^{§§}
IL-13 (D-180)	3,91 ± 0,00	3,91 ± 0,00	1,000 ^{§§}
IL-8 (D-0)	226,84 ± 193,83	137,12 ± 120,93	0,127 [§]
IL-8 (D-60)	277,84 ± 210,88	645,15 ± 1967,42	0,142 ^{§§}
IL-8 (D-120)	211,96 ± 147,02	695,40 ± 1955,24	0,970 ^{§§}
IL-8 (D-180)	149,14 ± 150,29	619,69 ± 1977,80	0,497 ^{§§}
IP-10 (D-0)	1218,94±2250,77	1171,69 ± 1859,87	0,763 ^{§§}
IP-10 (D-60)	1251,14±1488,09	763,37 ± 719,36	0,970 ^{§§}
IP-10 (D-120)	1695,99±3071,99	2094,96 ± 4827,53	0,572 ^{§§}
IP-10 (D-180)	899,34 ± 871,22	2061,17 ± 4849,96	0,598 ^{§§}

([§]) Teste t Student (^{§§}) Teste de Mann-Whitney

Fonte: A autora (2022)

No que se refere a secreção das citocinas, a IL6, apresentou uma diminuição expressiva no D60 no grupo intervenção, em relação ao controle ($5,94 \pm 3,4$ e $18,52 \pm 51,33$ respectivamente) porém sem significância estatística ($p=0,890$). Com a CCL-2, não se observa variações entre os grupos e os tempos de avaliação. A IL-17 e a IL-4, apresenta níveis diminuídos no grupo intervenção a partir do D120 em relação ao grupo placebo, assim como também a IL-13 apresenta uma tendencia à diminuição de seus níveis séricos quando comparados ao grupo controle no mesmo tempo. A IL-8 e a CCL-2 apresentam o mesmo comportamento em relação ao D-180, mantendo, porém, a ausência de significância estatística ($p=0,497$ e $p=0,598$ respectivamente).

Para melhor compreender esse comportamento da IL-6, analisamos de forma categórica os dados, separando e categorizando aqueles pacientes que tiveram um aumento e a diminuição dos níveis dessa citocina, assim como aqueles que cujas análises quantitativas permaneceram inalteradas. Observamos na tabela 7 que, os pacientes tratados com a sinvastatina apresentaram uma diminuição em 50,0% em comparação com o placebo, que diminuiu apenas 12,5% com uma significância de ($p=0,009$). Em relação ao aumento da secreção, os pacientes tratados apresentaram 37,5% do grupo 1 e do grupo 2 apenas 25,0%. Demais citocinas e quimiocinas não apresentaram diferença significativa. Outras análises entre a IL-6 e as variáveis clínicas dos pacientes não foram avaliadas por conta do baixo quantitativo amostral.

Tabela 7 - Resultados das associações investigadas na secreção de citocinas e quimiocinas no grupo 1, separadas categoricamente em grupos (diminuiu, aumentou e inalterada)

Variáveis	Total n (%)	Grupo 1 n (%)	Grupo 2 n (%)	p-valor
IL-6				
Diminuiu	10 (31,3)	8 (50,0)	2 (12,5)	0,009 [§]
Aumentou	10 (31,3)	6 (37,5)	4 (25,0)	
Inalteradas	12 (37,4)	2 (12,5)	10 (62,5)	
CCL-2				
Diminuiu	28 (87,5)	13 (81,2)	15 (93,7)	0,600 ^{§§}
Aumentou	4 (12,5)	3 (18,8)	1 (6,3)	
IL-17				
Diminuiu	15 (46,9)	9 (56,2)	6 (37,5)	0,420 ^{§§}
Aumentou	2 (6,2)	0 (0,0)	2 (12,5)	
Inalteradas	15 (46,9)	7 (43,8)	8 (50,0)	
IL-4				
Diminuiu	7 (21,9)	4 (25,0)	3 (18,8)	0,368 ^{§§}
Aumentou	2 (6,3)	2 (12,5)	0 (0,0)	
Inalteradas	23 (71,8)	10 (62,5)	13 (81,2)	
IL-13				
Diminuiu	5 (15,6)	2 (12,5)	3 (18,8)	1,000 ^{§§}
Inalteradas	27 (84,4)	14 (87,5)	13 (81,2)	
IL-8				
Diminuiu	14 (43,8)	8 (50,0)	6 (37,4)	0,819 ^{§§}
Aumentou	9 (28,1)	4 (25,0)	5 (31,3)	
Inalteradas	9 (28,1)	4 (25,0)	5 (31,3)	
IP-10				
Diminuiu	2 (6,3)	2 (12,5)	0 (0,0)	0,170 ^{§§}
Aumentou	9 (28,1)	6 (37,5)	3 (18,8)	
Inalteradas	21 (65,6)	8 (50,0)	13 (81,2)	

([§]) Teste Qui-Quadrado (^{§§}) Teste Exato de Fisher. Negrito: significância estatística

Fonte: A autora (2022)

Ao analisarmos a IL-6 com as demais variáveis clínicas, observamos que essa citocina, no grupo de pacientes tratados com a sinvastatina (G1), apresentou uma diminuição da sua secreção, em todos os tempos estudados, no que se refere ao acometimento da pele, à presença do FRY, à presença de úlceras digitais e telangiectasias, às da doença pulmonar intersticial, à HAP, à artrite, à miopatia e ao acometimento esofágico, assim como também quanto ao acometimento referente a calcinose. No entanto, devido ao tamanho amostral, não foi possível comprovar a significância estatística, apesar de demonstrarmos sua secreção diminuída nos demais tempos (tabela 8).

Tabela 8 – Comparações da IL-6 entre as variáveis clínicas e os tratamentos nos diferentes tempos de intervenção com a sinvastatina nos pacientes ES que apresentaram diminuição da secreção da citocina

Variáveis	IL-6 (D-0) Média ± DP	IL-6 (D-60) Média ± DP	IL-6 (D-120) Média ± DP	IL-6 (D-180) Média ± DP
Pele				
Sim	16,54 ± 11,38	7,55 ± 4,93	4,68 ± 0,00	4,68 ± 0,00
<i>p</i> -valor [§]	§§§	§§§	§§§	§§§
FRy				
Sim	20,22 ± 14,80	7,19 ± 4,68	4,68 ± 0,00	4,68 ± 0,00
<i>p</i> -valor [§]	§§§	§§§	§§§	§§§
Úlceras				
Sim	27,27 ± 14,56	6,05 ± 2,14	4,68 ± 0,00	4,68 ± 0,00
<i>p</i> -valor [§]	0,025	0,864	1,000	1,000
DPI				
Sim	21,61 ± 15,41	7,55 ± 4,93	4,68 ± 0,00	4,68 ± 0,00
<i>p</i> -valor [§]	0,513	0,453	1,000	1,000
HAP				
Sim	20,44 ± 3,38	7,12 ± 3,44	4,68 ± 0,00	4,68 ± 0,00
<i>p</i> -valor [§]	0,505	0,703	1,000	1,000
Artrite				
Sim	21,61 ± 15,41	7,55 ± 4,93	4,68 ± 0,00	4,68 ± 0,00
<i>p</i> -valor [§]	0,513	0,453	1,000	1,000
Miopatia				
Sim	10,21 ± ^A	4,68 ± ^A	4,68 ± ^A	4,68 ± ^A
<i>p</i> -valor [§]	0,275	0,453	1,000	1,000
Esôfago				
Sim	22,20 ± 16,79	8,03 ± 5,22	4,68 ± 0,00	4,68 ± 0,00
<i>p</i> -valor [§]	0,617	0,408	1,000	1,000
Renal				
Sim	§§§)	§§§	§§§	§§§
<i>p</i> -valor	§§§	§§§	§§§	§§§
Telangiectasias				
Sim	19,92 ± 16,17	5,34 ± 1,14	4,68 ± 0,00	4,68 ± 0,00
<i>p</i> -valor [§]	0,881	0,608	1,000	1,000
Calcinose				
Sim	22,83 ± ^A	9,55 ± ^A	4,68 ± ^A	4,68 ± ^A
<i>p</i> -valor [§]	0,513	0,211	1,000	1,000

([§]) Teste de Mann-Whitney (^A) Sem DP (§§§) Não aplicável/não detectável

Fonte: A autora (2022)

5 DISCUSSÃO

O nosso estudo mostrou que parte (50%) dos pacientes com ES tratados com a sinvastatina por 180 dias diminuíram significativamente a secreção da IL-6 em comparação com o grupo placebo (12,5 %). Porém não houve alterações quanto aos desfechos clínicos avaliados. Os tratamentos utilizados concomitantemente à intervenção proposta sugerem não estar relacionados com a diminuição da IL-6 apesar de não termos avaliado isso isoladamente. O tratamento se mostrou seguro, e a população homogênea, o que trouxe segurança quanto aos resultados obtidos. Não foram encontradas diferenças estatísticas quanto as demais citocinas e quimiocinas investigadas, e nem associações significativas da diminuição da IL-6 quanto aos desfechos avaliados e nem para as manifestações clínicas presentes no momento das coletas nos diferentes tempos.

Novos alvos terapêuticos têm sido estudados no retardo do dano na microvasculatura, mas sua eficácia ainda não foi completamente demonstrada para o tratamento dos pacientes com ES (ASSASSI et al., 2013). Derk e Jimenez (2006) já relataram em uma revisão da literatura, que as estatinas podem ter um efeito modificador na vasculopatia da ES. Abou-Raya et al. (2008) demonstraram em um ensaio clínico randomizado, placebo controlado, que as estatinas retardam a lesão vascular diminuindo significativamente as úlceras digitais e a pontuação Scleroderma Health Assessment Questionnaire Disability Index (SHAQ-DI) com o uso de 40 mg/dia de atorvastatina por 4 meses em uma população de 84 pacientes. Em 2007 o mesmo grupo de pesquisadores, publicou dados de 6 meses de seu estudo de intervenção em 40 pacientes, sendo 20 tratados e 20 do grupo placebo. Eles demonstraram que, a atorvastatina foi capaz de melhorar significativamente a disfunção endotelial, através da diminuição dos níveis de biomarcadores de ativação endotelial: a endotelina-1 (ET-1), ICAM-1, sE-selectina, fator de von Willebrand (vWF), fibrinogênio, velocidade de eritrossedimentação (VHS), trombomodulina (TM), proteína C reativa altamente sensível (PCR-hs), bem como peróxido lipídico (LP) e o malonylaldeído (MDA), mas aumentou o óxido nítrico (NO) quando comparado grupos tratamento e controle (ABOU-RAYA; ABOU-RAYA; HELMII, 2007). Alekperov et al. (2011) com um grupo de 50 pacientes com ES em uso de terapia padrão e a atorvastatina (10-40 mg/dia) observaram que após 12 meses de intervenção, resultou em uma redução significativa das concentrações da IL-6 e assim como de PCR-hs, do antígeno WF, da E-selectina,

do VEGF-A e do VEGF-R2 em comparação com o grupo controle sem atorvastatina. Ladak e Pope (2016) propõem que, mais ensaios randomizados devam ser realizados para determinar melhor o papel das estatinas na ES.

Em nosso estudo nenhuma melhora objetiva das manifestações clínicas pôde ser observada ao se associar a sinvastatina aos tratamentos associados utilizados pelos pacientes. Portanto, ainda é incerto afirmar se o uso da sinvastatina pode trazer benefícios no tratamento dos pacientes portadores de ES em uso de terapia padrão. Além disso, não observamos uma redução com significância estatística em relação às outras citocinas e quimiocinas quando relacionadas com a doença. Alguns pacientes apresentam aumento da secreção das citocinas e quimiocinas investigadas nos grupos controle e placebo, no entanto sem significância estatística. O que nos leva a crer que de uma forma geral, a terapia padrão utilizada concomitantemente ao ensaio randomizado proposto, mostraram-se eficientes para o controle das citocinas e quimiocinas investigadas, mas não ao efetivo controle das manifestações e complicações clínicas inerentes a doença, haja visto, as comorbidades observadas de forma sistêmica nos pacientes participantes do estudo.

São escassos os estudos sobre a eficácia das estatinas no tratamento da ES. No entanto, grande parte da literatura relaciona resultados positivos nas complicações vasculares em pacientes com ES, quando se utiliza esse fármaco. A revisão sistemática realizada por Tingey, Shu e Pope (2013) ressaltou a dificuldade em se ter resultados conclusivos, por conta de pequenos grupos amostrais e poucos ensaios comparativos, além da alta heterogeneidade dos parâmetros investigados nos artigos e da variabilidade clínica de apresentação da doença. Dificuldades estas que evidenciamos e reproduzimos em nosso ensaio, em virtude do baixo número amostral. Outros ensaios com número amostral e características clínicas semelhantes ao nosso estudo foram realizados, avaliando o efeito da sinvastatina em pacientes com ES. Kotyla (2018), em seu estudo, no período de 28 dias avaliou os marcadores de ativação vascular em 25 dos 154 pacientes com ES difusa recrutados, com perfis lipídicos normais utilizando 20mg/dia da sinvastatina. O período do ensaio foi curto para se avaliar tal desfecho, no entanto o autor sugere que o efeito protetor endotelial das estatinas pode estar relacionado à duração e à dose do tratamento. Os autores sugeriram que o efeito pleiotrópico das estatinas, deva ser independente da sua ação sobre as mudanças nos níveis de colesterol podendo esse ocorrer

independentemente. Além do que, sugerem ainda que, as estatinas possam diferir em seus efeitos sobre a absorção, ligação tecidual e solubilidade (KOYTILA, 2018).

À despeito das dificuldades encontradas nos demais estudos assim como no nosso, o papel das estatinas na ES sugere ser favorável, no que se refere à intervenção na imunomodulação, e nas propriedades anti-inflamatórias e antifibróticas. Kuwana et al. (2006) observaram um declínio significativo nos marcadores inflamatórios TNF- α e IL-6, bem como no VHS e PCR-hs, em comparação com pacientes com ES que receberam placebo. Kadoglou et al. (2021) em sua revisão da literatura descreveu que, as estatinas podem atuar reduzindo as citocinas liberadas pelo tecido adiposo, as chamadas adipocinas pró-inflamatórias, como IL-6, TNF- α e visfatina. Alguns ensaios *in vitro* demonstraram a modulação e a secreção de citocinas como IL-6, IL-17F, IL-2, IL-4, TNF, IL-17A e IFN- γ em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com ES tratadas com sinvastatina e atorvastatina. No entanto, nesse estudo apenas a IL-6 teve seus níveis reduzidos com a sinvastatina (GONÇALVES, 2017). Em nosso estudo, um resultado muito semelhante foi encontrado, quando evidenciamos a redução significativa da IL-6 em parte dos pacientes (50%, n=8, p: 0,009). Reconhecendo o papel pleiotrópico da IL-6, como sendo uma citocina que participa ativamente da regulação e da proliferação celular, além do seu papel pró-fibrótico já citado por vários autores, sendo parte de seu papel justificado, através do achado de os seus níveis séricos elevados encontrados em pacientes com ES (ZIMMERMANN; PIZZICHINI, 2013; KHAN et al., 2012; HASEGAWA, 2016).

As variações numéricas e quantitativas observadas na secreção das citocinas e quimiocinas nos participantes do nosso estudo, podem sugerir que, essas possam estar sob a influência de outros fatores, sobretudo no grupo que utilizou a sinvastatina. Justificamos essa assertiva, quando notamos o comportamento da IL-6, (tabela 5), onde aparece no D-60 com uma expressiva diminuição, apesar de não apresentar significância estatística, o que nos leva a crer que outros fatores não investigados possam estar relacionados e influenciando esses dados em ambos os grupos.

Para além da contribuição das estatinas nas manifestações vasculares, Derk e Jimenez (2006) já relataram efeitos independentes da redução lipídica promovida por esse eficiente inibidor da 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyma A, relacionadas principalmente pelas referidas propriedades pleiotrópicas das estatinas (AKDIM, et al. 2007). Em diferentes modelos de doenças, a exemplo temos a esclerose múltipla, a

artrite reumatoide e a doença do enxerto contra hospedeiro, o efeito imunomodulador das estatinas sem sendo amplamente estudado (ZEISER, 2018). Na artrite reumatoide, um estudo randomizado de 6 meses demonstrou que, a atorvastatina (20mg/dia) pode mediar efeitos anti-inflamatórios, com a modificação dos fatores de risco cardiovasculares, no contexto de inflamação autoimune (MCCAREY et al, 2005).

Na ES a sinvastatina já foi referenciada por modular a expressão do gene do colágeno em cultura de fibroblastos dérmicos tratados com dose de 5 µM e 10 µM, por 3 ou 4 dias em 3 pacientes com ES difusa, de início recente (LOUNEVA et al., 2006). O estudo de Asano e Sato (2015), salienta a importância disso, relacionando a fibrose e a vasculopatia. Essa hipótese pode ser justificada, quando o produto resultante da ativação dos fibroblastos e da deposição da matriz extracelular (MEC), passam a ser considerados como o marco da fisiopatogênese na ES por vários pesquisadores (ASANO; SATO, 2015; BROWN; O'REILLY, 2019). Vários tipos diferentes de células do sistema imunológico, parecem estar implicadas na fisiopatologia dessa doença, onde o dano nas células endoteliais decorrentes de infecção, a citotoxicidade imunomediada, a presença de autoanticorpos contra as células endoteliais, além de possíveis lesões decorrentes de isquemia, possam causar uma reperfusão tecidual, auxiliando a compreensão da fase inicial da ES (VARGA, J.; TROJANOWSKA, M.; KUWANA, 2017).

Pacientes com ES apresentam uma maior frequência de células Th17 no sangue periférico, quando comparado com indivíduos saudáveis (CHIZZOLINI et al., 2011; RODRIGUEZ-REYNA et al., 2012). As citocinas secretadas por essas células, têm sido implicadas na ativação de fibroblastos, estimulando a secretar outras citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 e a CXCL8/IL-8, além de aumentar a expressão de ICAM-1 e estimular a secreção de mais IL-6 também pelas células endoteliais (KURASAWA et al., 2000). Muitas citocinas encontram-se envolvidas na patogênese da ES por estarem expressas, mas a IL-6, o fator de crescimento transformador beta (TGF-β) e a IL-4, são consideradas muito importantes por atuarem mais fortemente na fibrose, sendo por isso talvez, as mais estudadas. Brown em um estudo recente, denominou a IL-6 como uma citocina pró-inflamatória clássica, considerando-a como uma importante proteína na imunopatogênese da ES (BROWN; O'REILLY, 2019). A IL-6 é uma citocina que é produzida por uma larga variedade de células, incluindo monócitos/macrófagos, células T, células endoteliais, fibroblastos e hepatócitos (VARGA, J.; TROJANOWSKA, M.; KUWANA, 2017), sendo encontrada,

em níveis elevados no soro (NEEDLEMAN; WIGLEY; STAIR, 1992), na pele dos pacientes com ES (KOCH et al., 1993), na doença intersticial pulmonar causada pela ES, correlacionando-se com a severidade e a progressão do acometimento cutâneo e com o envolvimento pulmonar naqueles pacientes (VARGA, J.; TROJANOWSKA, M.; KUWANA, 2017). O efeito biológico da IL-6 é mediado através de um receptor, o gp130, também conhecido como CD130. Kitaba e colaboradores (2012) demonstraram em camundongos transgênicos, que possuem deficiência desse receptor, por apresentarem menos inflamação e menos fibrose pulmonar, quando expostos a bleomicina (KITABA et al., 2012). A importância dessa citocina foi igualmente comprovada por O'Reilly e colaboradores (2014), que demonstraram níveis de IL-6 elevados no soro de pacientes com ES, além do que, os linfócitos desses pacientes quando isolados, expressam espontaneamente essa citocina. Resultados animadores no controle da doença cutânea, foram apresentados por Shima e colaboradores (2010), utilizando um medicamento, o tocilizumabe, um conhecido anticorpo anti receptor da IL-6, naqueles pacientes com grave acometimento cutâneo pela ES (SHIMA et al., 2010). Em outro estudo recentemente publicado, Khanna e colaboradores (2020) demonstraram que, a inibição da sinalização do receptor da IL-6, pode melhorar a função pulmonar em pacientes com ES.

Destacamos aqui, a contribuição do nosso estudo em se buscar respostas quanto ao uso da sinvastatina na ES, e do importante achado da diminuição da secreção da IL-6 em grande parte dos pacientes em uso da sinvastatina em comparação com o placebo. Podendo ainda, associar achado, ao benefício adicional inerente ao controle metabólico, uma vez que, muitos estudos demonstram a associação da doença cardiovascular (BLAKE; RIDKER, 2000, PALINSKI; NAPOLI, 2002) com a doença autoimune. Um estudo populacional realizado no Reino Unido por Man et al (2013), demonstrou que os pacientes portadores de ES, possuem 2.6 vezes mais risco de apresentarem acidente vascular cerebral e 1,8 vezes mais risco de terem infarto do miocárdio, tendo um reconhecido o papel preventivo da doença cardiovascular, onde as estatinas também foram capazes de reduzir a mortalidade geral em pacientes com doenças reumáticas autoimunes sistêmicas com risco de doença cardiovascular prematura (JORGE, et al. 2018).

Por fim, destacamos também a possibilidade e a necessidade de uma maior duração do tratamento e da dose utilizada em nosso estudo, como aquele observado

por ALEKPEROV (2011) e col., haja vista que, nosso estudo não conseguiu observar melhora junto às manifestações clínicas com a dose de 20 mg/dia (ALEKPEROV, et al. 2011). Quanto a dose estabelecida para esse ensaio clínico, vale ressaltar que a concentração circulante em altas doses por períodos prolongados, pode acarretar graves efeitos colaterais podendo até mesmo serem fatais, a exemplo disso temos a rabdomiólise. Como foi descrito por Greenwood (2006) e sugere-se, portanto, que, ao utilizar as estatinas com outros agentes modificadores da doença, possa-se manter a eficácia clínica controlando-se a sua toxicidade (GREENWOOD; STEINMAN; ZAMVIL, 2006).

O fato de se tratar de uma doença rara com graves comorbidades, associado a uma ampla variedade de medicamentos associados fundamentais na manutenção da sobrevida desses pacientes, possa justificar, além de ter contribuído junto aos resultados referentes aos desfechos do nosso estudo. Conhecendo as limitações do estudo e ressaltando os resultados obtidos, reforçamos a necessidade de uma avaliação com um maior prazo e de um maior número amostral de pacientes a partir de maiores investimentos viabilizando ensaios multicêntricos, para que possamos confirmar a hipótese de um possível efeito benéfico do tratamento das estatinas na ES.

6 ARTIGO - TRATAMENTO COM A SINVASTATINA E A SECREÇÃO DE IL-6 NA ESCLEROSE SISTÊMICA: RESULTADOS DO ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO, TRIPLO-CEGO E CONTROLADO POR PLACEBO

Lilian David de Azevedo Valadares¹, Maria Andreza Bezerra Correia², Anderson Rodrigues de Almeida², Eudes Gustavo Constantino Cunha², Michelly Cristiny Pereira², Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo², Maira Galdino da Rocha Pitta², Andréa Tavares Dantas¹, Angela Luzia Branco Pinto Duarte¹

¹ Serviço de Reumatologia, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE.

² Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE.

Resumo

Objetivo: Avaliar o efeito imunomodulador do uso de sinvastatina em pacientes portadores de esclerose sistêmica (ES) na secreção de citocinas e quimiocinas comumente relacionadas com a doença.

Método: Um ensaio clínico triplo cego randomizado foi realizado em dois grupos (n= 20 cada). O grupo tratado recebeu sinvastatina (20 mg/dia, via oral) e o outro placebo, por um período de 180 dias. As concentrações séricas das interleucinas (IL) IL-4, IL-6, IL-8, IL-13, IL-17, IL-29, IP-10 (proteína induzida por interferon gama) e CCL-2 (ligante de quimiocina C-C motif 2) foram avaliadas por imunoensaio enzimático (ELISA) do tipo sanduíche. Como desfechos clínicos foram utilizados o escore de Rodnan, e os questionários HAQ, SHAQ. Além da presença ou ausência de FAN, ANTI-SCL 70, FRy, úlceras, doença pulmonar intersticial (DPI), hipertensão arterial pulmonar (HAP), artrite, miopatia, telangiectasias, calcinose e comprometimento esofágico, renal e pele.

Resultados: Dos 40 pacientes selecionados, 32 concluíram o estudo. Não observamos diferença significativa nas concentrações séricas de IL-4, IL-6, IL-8, IL-13, IL-17, IL-29, IP-10 e CCL-2 após a intervenção. Entretanto, ao categorizar quanto ao nível de secreção, foi observado que 50% dos pacientes ES apresentaram diminuição da IL-6 em comparação com apenas 12,5% dos controles (p=0,009). Não houve diferenças nos desfechos clínicos após o tratamento com sinvastatina.

Conclusão: Constatamos que a sinvastatina diminuiu a secreção da IL-6 em parte dos pacientes ES investigados. Indicando que o uso da sinvastatina possui potencial

terapêutico para os pacientes ES. Novos ensaios clínicos randomizados com um maior número amostral de pacientes portadores de ES são necessários para validar estes achados.

Registro: número do registro do ensaio clínico no ReBEC- RBR-36qz3p

Palavras-chave: Estatinas; Citocinas; Quimiocinas; Soro; Randomização.

INTRODUÇÃO

A esclerose sistêmica (ES) é uma doença reumatológica, crônica, progressiva, autoimune, que se caracteriza por fibrose, comprometimento vascular e envolvimento imunológico. A progressiva fibrose multissistêmica, assinatura dessa doença, acomete a pele e órgãos internos, devido ao acometimento inicial de pequenos vasos, seguido da desregulação imunológica com produção de autoanticorpos e inflamação (DENTON; KHANNA, 2017).

A terapia atual na ES, baseia-se essencialmente em minimizar os sintomas decorrentes do envolvimento dos órgãos afetados e das manifestações vasculares e fibróticas. Novas opções terapêuticas vêm sendo testadas para as complicações vasculares utilizando alvos específicos como os inibidores da fosfodiesterase (PDE) 5 (BECKER, 2016) e dos bloqueadores da conversão da hidroxí-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase em mevalonato (TRISTANO; FULLER, 2006; ZHANG et al., 2008).

Acredita-se que as estatinas possuam um papel benéfico, através de seu efeito protetor ao endotélio promovendo uma melhoria do ponto de vista funcional para esses indivíduos (KUWANA, et al., 2006). Apesar de, não estar bem elucidada a relação entre comprometimento macro e microvascular na ES, ensaios clínicos têm demonstrado benefícios das estatinas no tratamento da vasculopatia, evidenciando a diminuição dos níveis da endotelina-1, ICAM-1 (*intercelular adhesion molecule-1*), e CCL-2 (*ligante de quimiocina C-C motif 2*) com isso, promovendo a redução do risco de desenvolvimento de úlceras digitais (ONG; DENTON, 2010).

Vários estudos sugerem a utilidade do tratamento com as estatinas para dano vascular em ES (ABOU-RAYA; ABOU-RAYA; HELMII, 2007, 2008; ALEKPEROV et al., 2011; BLAGOJEVIC; MATUCCI-CERINIC, 2009; DEL PAPA et al., 2008;

KUWANA et al., 2006; KUWANA; OKAZAKI; KABURAKI, 2009; ROSSI et al., 2012). Ladak e Pope (2015) em uma revisão sistemática, propuseram que as estatinas são seguras e bem toleradas na ES e que ensaios randomizados devem ser realizados para determinar melhor seu papel nessa doença. Resultados de estudos *in vitro* do nosso laboratório de pesquisa corroboraram e fundamentaram a necessidade dessa pesquisa, ao encontrarem a modulação das estatinas (sinvastatina e atorvastatina) sobre a secreção de citocinas em PBMCs (células mononucleares do sangue periférico) de pacientes ES em sobrenadante de cultura para as interleucinas (IL) IL-6, IL-17F, IL-2, IL-4, TNF, IL-17A e IFN- γ . Quando compararam com a condição estimulada, a sinvastatina e a atorvastatina promoveram a redução dos níveis de todas as citocinas avaliadas, com significância estatística, com a ressalva que a IL-6 que só teve seus níveis reduzidos apenas com a sinvastatina (GONÇALVES, 2017).

Dada a importância da investigação de novas alternativas terapêuticas através de estudos clínicos randomizados, que busquem novas formas de tratamento, nosso estudo realizou um ensaio clínico randomizado triplo cego com o objetivo de avaliar os efeitos terapêuticos da sinvastatina. A atividade imunomoduladora da sinvastatina foi avaliada a partir da secreção sérica das moléculas IL-4, IL-6, IL-8, IL-13, IL-17; ligante de quimiocina C-C motif 2 (CCL-2) e da proteína induzida por interferon gama (IP-10) envolvidas no processo da doença. Utilizamos o escore de Rodnan modificado, o HAQ e o SHAQ, bem como dados laboratoriais e manifestações clínicas para avaliar os desfechos do estudo.

MÉTODOS

O ensaio clínico randomizado, triplo cego recrutou 40 pacientes com diagnóstico de ES de acordo com critérios classificatórios da American Rheumatology Association (1980) (LEROY; MEDSGER, 2001) e de acordo com critério classificatório e de diagnóstico do ACR/EULAR (2013) (VAN DEN HOOGEN et al., 2013). A população de estudo foi proveniente do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE) e foram subdivididos em dois grupos, G1 utilizando sinvastatina (comprimidos 20 mg/dia por via oral) e G2 utilizando placebo, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão.

Critério de inclusão: diagnóstico de ES segundo os critérios classificatórios e de diagnóstico do ACR, 1980 ou do ACR/EULAR, 2013. Poderiam ser incluídas seguintes

formas clínicas da ES: cutâneo limitada (ESCL), cutâneo difusa (ESCD) e Sine escleroderma pacientes com idade entre 18 e 70 anos, com níveis séricos de colesterol total até 200 mg/dl, consentimento livre e esclarecido em participar do estudo.

Critério de exclusão: gestantes, intolerância ou alergia a estatinas ou seus derivados, estar em uso de estatinas ou ter feito uso há menos de 30 dias, diabetes mellitus, insuficiência cardíaca, insuficiência renal, hipertensão arterial, miopatias, hipotireoidismo e tabagismo.

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (CEP/CCS/UFPE-00219118.9.0000.8807) e seguiu de acordo com a declaração de Helsinki de 1964. Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). O número do registro do ensaio clínico no ReBEC- RBR-36qz3p.

Randomização e cegamento do estudo

Os critérios de alocação dos pacientes nos grupos foram de acordo com o processo de randomização (Social Psychology Network, <http://www.randomizer.org/>) e às cegas. A cada paciente incluído foi atribuído um número previamente sorteado, e entregue um envelope lacrado, contendo em seu interior a identificação por meio de um número informando sobre o grupo que ele fez parte. Esse envelope só foi aberto por um pesquisador não cego, também responsável por fornecer a medicação ao paciente. Os demais avaliadores e participantes da pesquisa foram cegos, para o grupo o qual o paciente fez parte.

Seguimento, coleta e armazenamento do soro

Um único médico reumatologista realizou todo o acompanhamento clínico dos pacientes. O período de estudo teve início de agosto de 2019 à março de 2020. Os pacientes foram acompanhados nos intervalos de tempo: D0, D60, D120 e D180 para avaliação clínica e coleta de sangue venoso periférico. Era realizada a verificação do diário pessoal de tomada da medicação, fornecido no início da pesquisa para anotações a cerca de possíveis sintomas associados ao tempo de tomada da medicação. O sangue foi devidamente transportado, processado. O soro foi identificado e armazenado a -80°C.

Avaliação dos desfechos clínicos

Foram utilizados como desfechos clínicos, o Escore de Rodnan Modificado-MRSS, o questionário de avaliação de saúde (HAQ) e o questionário de avaliação de saúde em Esclerose Sistêmica (SHAQ), correlacionando com as citocinas e quimiocinas estudadas. O escore de Rodnan avalia o espessamento da pele, usando uma escala de 0-3 em 17 áreas do corpo (KHANNA, et al 2017), possuindo um escore máximo de 51. O HAQ é utilizado para avaliar os distúrbios musculoesqueléticos na reumatologia (POPE, 2011). O paciente deve responder um questionário composto de 20 perguntas, subdivididas em 8 domínios que abordam situações rotineiras e diárias, tais como, a alimentação, caminhada, higiene, vestir-se, agarrar ou alcançar objetos (BRUCE; FRIES, 2003). O SHAQ, foi estendido para incluir o HAQ à ES, é aplicado em uma escala de deficiência mais específica para complicações frequentemente observadas na ES, fora do sistema músculo esquelético inerentes a doença. É calculado, incorporando ao HAQ, cinco VASs (escalas visuais analógicas), que sejam: FR (fenômeno de Raynaud), UD (úlceras digitais) e sintomas gastrointestinais, sintomas pulmonares e o quanto as complicações trazidas pela ES que possam interferir nas atividades diárias desses pacientes (BRUCE; FRIES, 2003). As escalas VAS no SHAQ são utilizadas para avaliar a interferência da doença com atividades diárias e variam de 0 (atividades não limitantes) a 100 (limitação muito severa) (JAEGER, et al., 2018).

Quantificação das citocinas e quimiocinas

As citocinas e quimiocinas foram quantificadas pela técnica de imunoensaio enzimático (ELISA), do tipo sanduíche. Foram dosadas as interleucinas e quimiocinas, IL-4, IL-6, IL-8, IL-13, IL-17, IL-29, IP-10 (BD) e CCL-2 (Invitrogen) no soro dos pacientes ES. Os limites de detecção dos kits utilizados foram 3,9; 7,8; 1,5; 3,9; 3,9; 3,9; 7,8; 3,9 pg/mL, respectivamente. A metodologia seguiu rigorosamente as recomendações dos fabricantes dos kits.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados usando os Softwares STATA/SE 12.0 e o Excel 2010. Os resultados foram descritos em forma de tabela com suas respectivas frequências absoluta e relativa. As variáveis numéricas foram representadas pelas medidas de tendência central e medidas de dispersão. Foram verificadas a existência de associação: Teste Qui-Quadrado e o Teste Exato de Fisher para as variáveis categóricas. O teste de Normalidade de Kolmogorov-Smirnov para variáveis quantitativas. Por fim comparação com dois grupos: Teste t-Student (Distribuição Normal) e Mann-Whitney (Não Normal). Todos os testes foram aplicados com 95% de confiança.

RESULTADOS

Dos quarenta (40) pacientes selecionados, oito (8) perderam o seguimento do estudo. Houve um óbito de causa não relacionada ao estudo, um paciente alegou evento adverso (disfunção sexual) e seis pacientes restantes deixaram de comparecer às consultas. Trinta e dois (32) pacientes que permaneceram no estudo, 16 estavam em uso de sinvastatina (G1) e 16 em uso de placebo (G2). Quanto às variáveis clínicas investigadas descritas na tabela 1, a população de estudo mostrou-se homogênea, não diferindo quanto os aspectos clínicos investigados, nem quanto ao uso de medicamentos (tabela 1).

Tabela 1- Características clínicas e laboratoriais, manifestações clínicas e tratamentos nos grupos intervenção (G1) e controle (G2) dos pacientes ES participantes do ensaio clínico randomizado

Variáveis	Total	G1	G2	p-valor
	n (%)	n (%)	n (%)	
Idade(anos)		49,13±13,03	48,88±14,38	0,959 †
Tempo FRy(m)		141,00±83,91	99,13 ± 71,48	0,139 †
Tempo não-FRy(m)		152,50±95,56	94,13 ± 62,03	0,051 †
Tempo diagnóstico(m)		143,63±104,37	93,88 ± 68,88	0,124 †
Sexo				
Masculino	04 (12,5)	2 (12,5)	2 (12,5)	0,480 §
Feminino	28 (87,5)	14 (87,5)	14 (87,5)	

Forma Clínica				
Limitada	19 (59,4)	10 (62,5)	9 (56,2)	1,000
Difusa	12 (37,5)	6 (37,5)	6 (37,5)	§§
Sine escleroderma	1 (3,1)	0 (0,0)	1 (6,3)	
FAN (+ realizados)	26(100,0)	15 100,0)	11 (100,0)	§§§
ANTI-SCL70 (+ realizados)	6 (42,9)	5 (71,4)	1 (14,3)	0,103§§
Pele	30 (96,8)	15 100,0)	15 (93,7)	1,000 §§
FRY	32(100,0)	16(100,0)	16 (100,0)	§§§
Úlceras	19 (59,4)	10 (62,5)	9 (56,2)	0,719 §
DPI	25 (78,1)	14 (87,5)	11 (68,7)	0,394§§
HAP	6 (18,8)	4 (25,0)	2 (12,5)	0,654§§
Artrite	25 (78,1)	15 (93,7)	10 (62,5)	0,083§§
Miopatia	5 (15,6)	2 (12,5)	3 (18,8)	1,000§§
Esôfago	27 (87,1)	14 (93,3)	13 (81,2)	0,600§§
Renal	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	§§§
Telangiectasias	13 (40,6)	7 (43,8)	6 (37,5)	0,719§
Calcinose	4 (12,5)	2 (12,5)	2 (12,5)	1,000 §§
BCC	19 (59,4)	9 (56,2)	10 (62,5)	0,719 *
IECA	4 (12,5)	3 (18,8)	1 (6,3)	0,600 §§
BRA	5 (15,6)	2 (12,5)	3 (18,8)	1,000 §§
AAS	10 (31,3)	6 (37,5)	4 (25,0)	0,446 §
Sildenafil	8 (25,0)	4 (25,0)	4 (25,0)	1,000 §§
Bosentana	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	§§§
Micofenolato	3 (9,4)	1 (6,3)	2 (12,5)	1,000 §§
CYC EV	1 (3,1)	1 (6,3)	0 (0,0)	1,000 §§
Imunossupressor	16 (50,0)	9 (56,2)	7 (43,8)	0,480 §
IBP	21 (65,6)	11 (68,7)	10 (62,5)	0,710 §
Corticoide	11 (34,4)	6 (37,5)	5 (31,3)	0,710 §

†diferença estatística; FRy: fenômeno de Raynaud; m: meses;

(*) Teste Qui-Quadrado (**) Teste Exato de Fisher (***) Não aplicável. N amostral total inferior a população de estudo corresponde a exame não realizado. Siglas: FAN, fator antinuclear; Anti SCL-70, anticorpo anti-DNA topo isomerase; FRy, fenômeno de Reynaud; DPI, doença pulmonar intersticial; HAP, hipertensão arterial pulmonar; BCC, bloqueador de canal de cálcio; IECA, inibidores da enzima conversora da angiotensina; BRA, bloqueadores dos receptores da angiotensina; AAS, ácido acetilsalicílico; CYC EV, ciclofosfamida; IBP, inibidores da bomba de prótons.

Para as análises avaliamos a secreção das citocinas IL-4, IL-6, IL-13, IL-17, IL-29 e das quimiocinas IL-8, IP-10 e CCL-2. Obtivemos uma expressiva secreção das quimiocinas. Já as citocinas apresentaram uma baixa secreção em parte dos pacientes, exceto a IL-29 ao qual não observamos secreção (material suplementar 1). Para as análises de desfecho, foram aplicados os questionários avaliativos de referência para a ES: Rodnan, HAQ e SHAQ. Os dados obtidos foram comparados com a secreção de citocinas e quimiocinas presentes no soro obtido no mesmo dia do questionário e das avaliações das manifestações clínicas para ambos os grupos. Ao avaliar comparativamente as citocinas e quimiocinas séricas, não encontramos diferenças estatísticas que pudessem estar relacionadas com o uso da sinvastatina, nem para as variáveis Rodnan, HAQ e SHAQ nos intervalos de tempo investigados entre os grupos. Demais manifestações clínicas e tratamentos descritos na tabela 1 permaneceram inalterados durante os quatro tempos investigados.

Para as demais análises da imunomodulação da sinvastatina nos pacientes ES, as dosagens das citocinas e quimiocinas séricas dos pacientes foram dicotomizadas em grupos categóricos: diminuída, aumentada e inalterada de acordo com a mediana. Para as análises, ao cruzarmos o grupo da IL-6, os pacientes tratados com a sinvastatina apresentaram uma diminuição de 50,0% em comparação com o placebo que diminuiu apenas 12,5% com uma significância de **p=0,009**. Em relação ao aumento da secreção, os pacientes tratados apresentaram 37,5% e o controle 25,0%. O que nos leva a crer que outros fatores não investigados podem estar relacionados em ambos os grupos. Demais citocinas e quimiocinas não apresentaram diferença significativa (material suplementar 2).

Ao avaliar comparativamente e correlacionar a secreção da IL-6 nos diferentes tempos em relação às variáveis clínicas descritas na tabela 1, podemos confirmar que a redução da secreção da IL-6 não apresentou significância estatística. Em relação aos tratamentos utilizados concomitantemente à intervenção proposta, podemos observar que estes não estão relacionados com a diminuição da secreção da IL-6. O que mostra que esta diminuição foi em decorrência ao tratamento com a sinvastatina no período investigado e não aos demais tratamentos utilizados. Outras análises entre a IL-6 e as variáveis clínicas dos pacientes foram realizadas, no entanto por conta do baixo quantitativo amostral não obtivemos significância estatística (dados não mostrados).

DISCUSSÃO

O nosso estudo mostrou que parte dos pacientes com ES tratados com a sinvastatina por 180 dias diminuíram significativamente a secreção da IL-6 em comparação com o grupo placebo. Porém não houve alterações quanto aos desfechos avaliados. Os tratamentos utilizados concomitantemente à intervenção proposta não estavam relacionados com a diminuição da IL-6. O tratamento se mostrou seguro, e a população homogênea, o que trouxe segurança quanto aos resultados obtidos. Não foram encontradas diferenças estatísticas quanto as demais citocinas e quimiocinas investigadas, e nem associações significativas da diminuição da IL-6 quanto aos desfechos avaliados e nem para as manifestações clínicas presentes no momento das coletas nos diferentes tempos.

Novos alvos terapêuticos têm sido estudados, objetivando o retardo do dano na micro vasculatura, mas sua eficácia ainda não foi completamente demonstrada para o tratamento dos pacientes com ES (ASSASSI et al., 2013). Derk e Jimenez (2006) já relataram em uma revisão da literatura, que as estatinas podem ter um efeito modificador na vasculopatia da ES. Abou-Raya et al. (2008) demonstraram em um ensaio clínico randomizado, placebo controlado, que as estatinas retardam a lesão vascular diminuindo significativamente as úlceras digitais e a pontuação Scleroderma Health Assessment Questionnaire Disability Index (SHAQ-DI) com o uso de 40 mg/dia de atorvastatina por 4 meses em uma população de 84 pacientes. Em 2007 o mesmo grupo de pesquisadores, publicou dados de 6 meses de seu estudo de intervenção em 40 pacientes, sendo 20 tratados e 20 do grupo placebo. Eles demonstraram que, a atorvastatina foi capaz de melhorar significativamente a disfunção endotelial, através da diminuição dos níveis de biomarcadores de ativação endotelial: a endotelina-1 (ET-1), ICAM-1, sE-selectina, fator de von Willebrand (vWF), fibrinogênio, velocidade de eritrossedimentação (VHS), trombomodulina (TM), proteína C reativa altamente sensível (PCR-hs), bem como peróxido lipídico (LP) e o malonylaldeído (MDA), mas aumentou o óxido nítrico (NO) quando comparado grupos tratamento e controle (ABOU-RAYA; ABOU-RAYA; HELMII, 2007). Alekperov et al. (2011) com um grupo de 50 pacientes com ES em uso de terapia padrão e a atorvastatina (10-40 mg/dia) observaram que após 12 meses de intervenção, resultou em uma redução significativa das concentrações da IL-6 e assim como de PCR-hs, do antígeno WF, da E-selectina, do VEGF-A e do VEGF-R2 em comparação com o grupo controle sem atorvastatina.

Ladak e Pope (2016) propõem que, mais ensaios randomizados devam ser realizados para determinar melhor o papel das estatinas na ES.

São escassos os estudos tipo ensaio clínico, sobre a eficácia das estatinas no tratamento da ES. No entanto, grande parte da literatura relaciona resultados positivos nas complicações vasculares em pacientes com ES, quando se utiliza esse fármaco. A revisão sistemática realizada por Tingey, Shu e Pope (2013) ressaltou a dificuldade em se ter resultados conclusivos, por conta de pequenos grupos amostrais e poucos ensaios comparativos, além da alta heterogeneidade dos parâmetros investigados nos artigos. Dificuldades estas, que constatamos e reproduzimos involuntariamente em nosso ensaio, em virtude do baixo número amostral. Outros ensaios com número amostral e características clínicas semelhantes ao nosso estudo foram realizados, avaliando o efeito da sinvastatina em pacientes com ES. Kotyla (2018), em seu estudo, no período de 28 dias avaliou os marcadores de ativação vascular em 25 dos 154 pacientes com ES difusa recrutados, com perfis lipídicos normais utilizando 20mg/dia da sinvastatina. O período do ensaio foi curto para se avaliar e o autor sugere que o efeito protetor endotelial das estatinas pode estar relacionado à duração e à dose do tratamento. Os autores sugeriram que o efeito pleiotrófico das estatinas, deva ser independente da sua ação sobre as mudanças nos níveis de colesterol podendo essas ocorrerem independentemente. Além do que, que as estatinas possam diferir em seus efeitos sobre a absorção, ligação tecidual e solubilidade (KOYTILA, 2018).

Mesmo com todas as dificuldades encontradas nos estudos, assim como no nosso, as estatinas vêm se mostrando favoráveis na imunomodulação e nas propriedades anti-inflamatórias e antifibróticas. Kuwana et al. (2006) observaram um declínio significativo nos marcadores inflamatórios TNF- α e IL-6, bem como no VHS e PCR-hs, em comparação com pacientes com ES que receberam placebo. Kadoglou et al. (2021) em sua revisão da literatura discorreu que, as estatinas podem atuar reduzindo as citocinas liberadas pelo tecido adiposo, as chamadas adipocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e o TNF- α . Alguns ensaios *in vitro* demonstraram a modulação e a secreção de citocinas como IL-6, IL-17F, IL-2, IL-4, TNF, IL-17A e IFN- γ em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com ES tratadas com sinvastatina e atorvastatina. No entanto, nesse estudo apenas a IL-6 teve seus níveis reduzidos com a sinvastatina (GONÇALVES, 2017). Resultado semelhante foi encontrado em nosso estudo, onde evidenciamos a redução significativa da IL-6 em parte dos pacientes. Conhecendo o papel pleiotrófico da IL-6, como sendo uma

citocina que participa ativamente da regulação e proliferação celular, além do seu reconhecido papel pró-fibrótico, além dos seus níveis séricos elevados em pacientes com ES (ZIMMERMANN; PIZZICHINI, 2013; KHAN et al., 2012; HASEGAWA, 2016).

Para além da contribuição das estatinas nas manifestações vasculares, Derk e Jimenez (2006) já relataram efeitos independentes da redução lipídica promovida por esse eficiente inibidor da 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyma A, relacionadas principalmente pelas referidas propriedades pleiotrópicas das estatinas (AKDIM, et al. 2007). Em diferentes modelos de doenças, a exemplo temos a esclerose múltipla, a artrite reumatoide e a doença do enxerto contra hospedeiro, o efeito imunomodulador das estatinas sem sendo amplamente estudado (ZEISER, 2018). Na artrite reumatoide, um estudo randomizado de 6 meses demonstrou que, a atorvastatina (20mg/dia) pode mediar efeitos anti-inflamatórios, com a modificação dos fatores de risco cardiovasculares, no contexto de inflamação autoimune (MCCAREY et al, 2004).

Na ES a sinvastatina já foram referenciadas por modular a expressão do gene do colágeno em cultura de fibroblastos dérmicos tratados com dose de 5 μ M e 10 μ M, por 3 ou 4 dias em 3 pacientes com ES difusa, de início recente (LOUNEVA et al., 2006). O estudo de Asano e Sato (2015), salienta a importância disso, relacionando a fibrose e a vasculopatia. Essa hipótese pode ser justificada, quando o produto resultante da ativação dos fibroblastos e da deposição da matriz extracelular (MEC), passam a ser considerados como o marco da fisiopatogênese na ES por vários pesquisadores (ASANO; SATO, 2015; BROWN; O'REILLY, 2019). Vários tipos diferentes de células do sistema imunológico, parecem estar implicadas na fisiopatologia dessa doença, onde o dano nas células endoteliais decorrentes de infecção, a citotoxicidade imunomediada, a presença de auto anticorpos contra as células endoteliais, além de possíveis lesões decorrentes de isquemia, possam causar uma reperfusão tecidual, auxiliando a compreensão da fase inicial da ES (VARGA, J.; TROJANOWSKA, M.; KUWANA, 2017).

Pacientes com ES apresentam uma maior frequência de células Th17 no sangue periférico, quando comparado com indivíduos saudáveis (CHIZZOLINI et al., 2011; RODRIGUEZ-REYNA et al., 2012). As citocinas secretadas por essas células, têm sido implicadas na ativação de fibroblastos, estimulando a secretar outras citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 e a CXCL8/IL-8, além de aumentar a expressão de ICAM-1 e estimular a secreção de mais IL-6 também pelas células endoteliais (KURASAWA et al., 2000). Muitas citocinas encontram-se envolvidas na

patogênese da ES por estarem expressas, mas a IL-6, o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e a IL-4, são consideradas muito importantes por atuarem mais fortemente na fibrose, sendo por isso talvez, as mais estudadas. Brown em um estudo recente, denominou a IL-6 como uma citocina pró-inflamatória clássica, considerando-a como uma importante proteína na imunopatogênese da ES (BROWN; O'REILLY, 2019). A IL-6 por ser uma citocina multifuncional e ser produzida por uma larga variedade de células, incluindo monócitos/macrófagos, células T, células endoteliais, fibroblastos e hepatócitos (VARGA, J.; TROJANOWSKA, M.; KUWANA, 2017), é encontrada, em níveis elevados no soro (NEEDLEMAN; WIGLEY; STAIR, 1992), na pele dos pacientes com ES (KOCH et al., 1993), na doença intersticial pulmonar causada pela ES, correlacionando-se com a severidade e a progressão do acometimento cutâneo e com o envolvimento pulmonar naqueles pacientes (VARGA, J.; TROJANOWSKA, M.; KUWANA, 2017). O efeito biológico da IL-6 é mediado através de um receptor, o gp130, também conhecido como CD130. Kitaba e colaboradores (2012) demonstraram em camundongos transgênicos, que possuem deficiência desse receptor, por apresentarem menos inflamação e menos fibrose pulmonar, quando expostos a bleomicina (KITABA et al., 2012). A importância dessa citocina foi igualmente comprovada por O'Reilly e colaboradores (2014), que demonstraram níveis de IL-6 elevados no soro de pacientes com ES, além do que, os linfócitos desses pacientes quando isolados, expressam espontaneamente essa citocina. Resultados animadores no controle da doença cutânea, foram apresentados por Shima e colaboradores (2010), utilizando um medicamento, o tocilizumabe, um conhecido anticorpo anti receptor da IL-6, naqueles pacientes com grave acometimento cutâneo pela ES (SHIMA et al., 2010). Em outro estudo recentemente publicado, Khanna e colaboradores (2020) demonstraram que, a inibição da sinalização do receptor da IL-6, pode melhorar a função pulmonar em pacientes com ES.

Destacamos aqui a contribuição de nosso estudo em se buscar respostas quanto ao uso da sinvastatina na ES, e do importante achado da diminuição da secreção da IL-6 em grande parte dos pacientes em uso da sinvastatina em comparação com o placebo. Podendo ainda, associar a esses, benefícios adicionais inerentes ao controle metabólico, uma vez que muitos estudos demonstram a associação a doença cardiovascular (BLAKE; RIDKER, 2000, PALINSKI; NAPOLI, 2002) com a doença autoimune. Um estudo, esse populacional realizado no Reino

Unido por Man et al (2013), demonstrou os pacientes portadores de ES possuem 2.6 vezes mais risco de acidente vascular cerebral e 1,8 vezes mais risco de terem infarto do miocárdio, e, portanto, que, as estatinas também foram capazes de reduzir a mortalidade geral, em pacientes com doenças reumáticas autoimunes sistêmicas com risco de doença cardiovascular prematura (JORGE, et al. 2018).

Por fim, destacamos também a possibilidade e a necessidade de uma maior duração do tratamento e da dose utilizada como observado pôr em outros estudos (ALEKPEROV, 2011). Haja visto que, o nosso estudo não conseguiu observar melhora nas manifestações clínicas com a dose de 20 mg/dia. Quanto a dose estabelecida para esse ensaio clínico, vale ressaltar que a concentração circulante em altas doses por um longo período, pode levar a graves efeitos colaterais como rabdomiólise. Como foi descrito por Greenwood (2006) e sugere-se, portanto, que, ao combinar as estatinas em uma dosagem reduzida, com outros agentes modificadores da doença, possa-se manter a eficácia clínica controlando-se a sua toxicidade (GREENWOOD; STEINMAN; ZAMVIL, 2006).

CONCLUSÃO

O presente estudo constatou que a sinvastatina diminuiu a secreção da IL-6 em parte dos pacientes ES investigados em comparação ao placebo. Nosso estudo mostrou-se limitado quanto ao número amostral, mas nossa população se mostrou homogênea e com isso conseguimos demonstrar que essa diminuição de fato esteve relacionada ao uso da sinvastatina e não aos demais medicamentos padrões utilizados pelos pacientes. Na discussão mostramos que a sinvastatina pode trazer benefícios, não apenas ao comprometimento vascular, mas também como ação anti-inflamatória e antifibrótica se comprovada a redução da IL-6 nos pacientes. Novos ensaios clínicos randomizados são necessários para avaliar um maior número amostral de pacientes, bem como, maior tempo de intervenção e dose. Maiores investimentos para a realização de ensaios multicêntricos associados a um maior número de desfechos são necessários para comprovar a eficácia do uso das estatinas na ES.

REFERÊNCIAS

- ABOU-RAYA, A.; ABOU-RAYA, S.; HELMII, M. Statins as immunomodulators in systemic sclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1110, p. 670–680, 2007.
- ABOU-RAYA, A.; ABOU-RAYA, S.; HELMII, M. Statins: Potentially useful in therapy of systemic sclerosis-related Raynaud's phenomenon and digital ulcers. *Journal of Rheumatology*, v. 35, n. 9, p. 1801–1808, 2008.
- AKDIM, Fatima et al. Pleiotropic effects of statins: stabilization of the vulnerable atherosclerotic plaque? *Current pharmaceutical design*, v. 13, n. 10, p. 1003-1012, 2007.
- ALEKPEROV, R. et al. Pleiotropic effects of statins in systemic sclerosis. *Ter Arkh.*, v. 83, n. 5, p. 41–47, 2011.
- ASANO, Y.; SATO, S. Vasculopathy in scleroderma. *Seminars in Immunopathology*, v. 37, n. 5, p. 489–500, 2015.
- ASSASSI, S. et al. Genetics of scleroderma: Implications for personalized medicine? *BMC Medicine*, v. 11, n. 1, 2013.
- BLAKE, Gavin J.; RIDKER, Paul M. Are statins anti-inflammatory? *Trials*, v. 1, n. 3, p. 1-5, 2000.
- BECKER, M. O. Systemische Sklerose: Was ist gesichert in der Therapie? *Der Internist*, v. 57, n. 12, p. 1155-1163, 2016.
- BLAGOJEVIC, J.; MATUCCI-CERINIC, M. Are statins useful for treating vascular involvement in systemic sclerosis? *Nature Clinical Practice Rheumatology*, v. 5, n. 2, p. 70–71, 2009.
- BROWN, M.; O'REILLY, S. The immunopathogenesis of fibrosis in systemic sclerosis. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 195, n. 3, p. 310–321, 2019.
- BRUCE, Bonnie; FRIES, James F. The Stanford health assessment questionnaire: dimensions and practical applications. *Health and quality of life outcomes*, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2003.
- DEHNAVI, Sajad et al. Statins and autoimmunity: state-of-the-art. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 214, p. 107614, 2020.
- DEL PAPA, N. et al. Simvastatin reduces endothelial activation and damage but is partially ineffective in inducing endothelial repair in systemic sclerosis. *Journal of Rheumatology*, v. 35, n. 7, p. 1323–1328, 2008.
- DENTON, C. P.; KHANNA, D. Systemic sclerosis. *The Lancet*, v. 390, n. 10103, p. 1685–1699, 2017.
- DERK, Chris T.; JIMENEZ, Sergio A. Statins and the vasculopathy of systemic sclerosis: potential therapeutic agents?. *Autoimmunity reviews*, v. 5, n. 1, p. 25-32, 2006.
- CHIZZOLINI, C. et al. Fibrosis and immune dysregulation in systemic sclerosis. *Autoimmunity Reviews*, v. 10, n. 5, p. 276–281, 2011.

GONÇALVES, R. S. G. Avaliação da atividade imunomoduladora de estatinas em pacientes portadores de esclerose sistêmica. [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2017.

GREENWOOD, J.; STEINMAN, L.; ZAMVIL, S. S. Statin therapy in autoimmunity: From protein prenylation to immunomodulation. *Nat Rev Immunol*, v. 6, n. 5, p. 1–23, 2006.

HASEGAWA, Minoru. Biomarkers in systemic sclerosis: Their potential to predict clinical courses. *The Journal of dermatology*, v. 43, n. 1, p. 29-38, 2016.

JAEGER, Veronika K. et al. Functional disability and its predictors in systemic sclerosis: a study from the DeSScipher project within the EUSTAR group. *Rheumatology*, v. 57, n. 3, p. 441-450, 2018.

JORGE, April M. et al. The effect of statin use on mortality in systemic autoimmune rheumatic diseases. *The Journal of rheumatology*, v. 45, n. 12, p. 1689-1695, 2018.

KADOGLU, Nikolaos PE et al. The interplay between statins and adipokines. Is this another explanation of statins' pleiotropic effects?. *Cytokine*, v. 148, p. 155698, 2021.

KHAN, Korsa et al. Clinical and pathological significance of interleukin 6 overexpression in systemic sclerosis. *Annals of the rheumatic diseases*, v. 71, n. 7, p. 1235-1242, 2012.

KHANNA, D. et al. Tocilizumab in systemic sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Respiratory Medicine*, v. 8, n. 10, p. 963–974, 2020.

KHANNA, Dinesh et al. Standardization of the modified Rodnan skin score for use in clinical trials of systemic sclerosis. *Journal of scleroderma and related disorders*, v. 2, n. 1, p. 11-18, 2017.

KITABA, Shun et al. Blockade of interleukin-6 receptor alleviates disease in mouse model of scleroderma. *The American journal of pathology*, v. 180, n. 1, p. 165-176, 2012.

KOCH, A. E. et al. In situ expression of cytokines and cellular adhesion molecules in the skin of patients with systemic sclerosis. *Pathobiology*, v. 61, n. 5–6, p. 239–246, 1993.

KOTYLA, Przemyslaw J. Short course of simvastatin has no effect on markers of endothelial activation in normolipidemic patients with systemic sclerosis. *Journal of International Medical Research*, v. 46, n. 5, p. 1893-1901, 2018.

KURASAWA, K. et al. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis and Rheumatism*, v. 43, n. 11, p. 2455–2463, 2000.

KUWANA, M. et al. Increase in circulating endothelial precursors by atorvastatin in patients with systemic sclerosis. *Arthritis and Rheumatism*, v. 54, n. 6, p. 1946–1951, 2006.

KUWANA, M.; OKAZAKI, Y.; KABURAKI, J. Long-term beneficial effects of statins on vascular manifestations in patients with systemic sclerosis. *Modern Rheumatology*, v. 19, n. 5, p. 530–535, 2009.

LADAK, K.; POPE, J. E. A review of the effects of statins in systemic sclerosis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, v. 45, n. 6, p. 698–705, 2016.

LAROSA, J. C.; HE, J.; VUPPUTURI, S. LAROSA. Effect of statins on risk of coronary disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Jama*, v. 282, n. 24, p. 2340–2346, 1999.

LEROY, E. C.; MEDSGER, J. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *Journal of Rheumatology*, v. 28, n. 7, p. 1573–1576, 2001.

LOUNEVA, N. et al. Inhibition of systemic sclerosis dermal fibroblast type I collagen production and gene expression by simvastatin. *Arthritis and Rheumatism*, v. 54, n. 4, p. 1298–1308, 2006.

MACKAY, D. J.; HALL, A. Rho GTPases. *The Journal of biological chemistry*, v. 273, n. 33, p. 20685–20688, ago. 1998.

MAN, Ada et al. The risk of cardiovascular disease in systemic sclerosis: a population-based cohort study. *Annals of the rheumatic diseases*, v. 72, n. 7, p. 1188–1193, 2013.

MCCAREY, David W. et al. Trial of Atorvastatin in Rheumatoid Arthritis (TARA): double-blind, randomised placebo-controlled trial. *The Lancet*, v. 363, n. 9426, p. 2015–2021, 2004.

NEEDLEMAN, B. W.; WIGLEY, F. M.; STAIR, R. W. Interleukin-1, Interleukin-2, Interleukin-4, Interleukin-6, Tumor Necrosis Factor α , and Interferon- γ Levels in Sera from Patients with Scleroderma. *Arthritis & Rheumatism*, v. 35, n. 1, p. 67–72, 1992.

ONG, V. H.; DENTON, C. P. Innovative therapies for systemic sclerosis. *Current Opinion in Rheumatology*, v. 22, n. 3, p. 264–272, 2010.

PALINSKI, Wulf; NAPOLI, Claudio. Unraveling pleiotropic effects of statins on plaque rupture. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, v. 22, n. 11, p. 1745–1750, 2002.

POPE, Janet. Measures of systemic sclerosis (scleroderma): Health Assessment Questionnaire (HAQ) and Scleroderma HAQ (SHAQ), physician-and patient-rated global assessments, Symptom Burden Index (SBI), University of California, Los Angeles, Scleroderma Clinical Trials Consortium Gastrointestinal Scale (UCLA SCTC GIT) 2.0, Baseline Dyspnea Index (BDI) and Transition Dyspnea Index (TDI)(Mahler's Index), Cambridge Pulmonary Hypertension Outcome Review (CAMPHOR), and Raynaud's Condition Score (RCS). *Arthritis care & research*, v. 63, p. S98–111, 2011.

RODRGUEZ-REYNA, T. S. et al. Th17 peripheral cells are increased in diffuse cutaneous systemic sclerosis compared with limited illness: A cross-sectional study. *Rheumatology International*, v. 32, n. 9, p. 2653–2660, 2012.

ROSSI, M. et al. Increased finger skin vasoreactivity and stimulated vasomotion associated with simvastatin therapy in systemic sclerosis hypercholesterolemic patients. *Rheumatology International*, v. 32, n. 12, p. 3415–3421, 2012.

SHAH, S. et al. Ras and Rap1: A tale of two GTPases. *Seminars in cancer biology*, v. 54, p. 29–39, fev. 2019.

SHIMA, Y. et al. The skin of patients with systemic sclerosis softened during the treatment with anti-IL-6 receptor antibody tocilizumab. *Rheumatology*, v. 49, n. 12, p. 2408–2412, 2010.

SOMSEL RODMAN, J.; WANDINGER-NESS, A. Rab GTPases coordinate endocytosis. *Journal of cell science*, v. 113 Pt 2, p. 183–192, jan. 2000.

TRISTANO, A. G.; FULLER, K. Immunomodulatory effects of statins and autoimmune rheumatic diseases: Novel intracellular mechanism involved. *International Immunopharmacology*, v. 6, n. 12, p. 1833–1846, 2006.

TINGEY, Theresa et al. Meta-analysis of healing and prevention of digital ulcers in systemic sclerosis. *Arthritis care & research*, v. 65, n. 9, p. 1460-1471, 2013.

VAN DEN HOOGEN, Frank et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis & Rheumatism*, v. 65, n. 11, p. 2737-2747, 2013.

VARGA, J.; TROJANOWSKA, M.; KUWANA, M. Pathogenesis of systemic sclerosis: Recent insights of molecular and cellular mechanisms and therapeutic opportunities. *Journal of Scleroderma and Related Disorders*, v. 2, n. 3, p. 137–152, 2017.

ZEISER, R. Immune modulatory effects of statins. *Immunology*, v. 154, n. 1, p. 69–75, 2018.

ZHANG, X. et al. 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. *The Journal of Immunology*, v. 180, n. 10, p. 6988–6996, 2008.

ZIMMERMANN, A. F.; PIZZICHINI, M. M. M. Update on the etiopathogenesis of systemic sclerosis. *Revista Brasileira de Reumatologia (English Edition)*, v. 53, n. 6, p. 516–524, 2013.

Material suplementar 1-

Resultados do cruzamento entre os grupos intervenção (G1) e controle (G2) nos quatro tempos investigados dos pacientes ES participantes do ensaio clínico randomizado

Variáveis	Grupo		p-valor
	A	B	
	Média ± DP	Média ± DP	
RODNAN (D-0)	17,25 ± 6,85	23,56 ± 14,70	0,134 [§]
RODNAN (D-60)	14,69 ± 5,28	16,75 ± 11,78	0,530 [§]
RODNAN (D-120)	14,38 ± 4,83	97,75 ± 324,26	0,748 ^{§§}
RODNAN (D-180)	13,25 ± 6,71	12,63 ± 8,43	0,818 [§]
HAQ (D-0)	1,02 ± 0,87	0,98 ± 0,78	0,913 [§]
HAQ (D-60)	0,89 ± 0,91	0,88 ± 0,73	0,977 [§]
HAQ (D-120)	0,67 ± 0,82	0,68 ± 0,71	0,977 [§]
HAQ (D-180)	0,88 ± 0,91	0,83 ± 0,66	0,869 [§]
SHAQ (D-0)	2,46 ± 0,75	2,19 ± 0,61	0,268 [§]
SHAQ (D-60)	2,26 ± 0,55	2,13 ± 0,51	0,517 [§]
SHAQ (D-120)	2,27 ± 0,53	2,30 ± 0,33	0,849 [§]
SHAQ (D-180)	2,09 ± 0,51	2,18 ± 0,52	0,611 [§]
IL-6 (D-0)	12,45 ± 12,91	13,45 ± 21,45	0,242 [§]
IL-6 (D-60)	5,94 ± 3,45	18,52 ± 51,33	0,890 ^{§§}
IL-6 (D-120)	8,44 ± 8,78	18,10 ± 46,18	0,755 ^{§§}
IL-6 (D-180)	12,33 ± 13,63	20,71 ± 43,11	0,897 ^{§§}
CCL-2 (D-0)	848,65 ± 1317,25	570,68 ± 258,93	0,706 ^{§§}
CCL-2 (D-60)	673,84 ± 865,65	487,57 ± 283,18	0,763 ^{§§}
CCL-2 (D-120)	736,67 ± 1265,53	450,83 ± 262,05	0,763 ^{§§}
CCL-2 (D-180)	482,42 ± 445,11	392,98 ± 200,44	0,469 [§]
IL-17 (D-0)	7,14 ± 5,85	23,57 ± 40,30	0,261 ^{§§}
IL-17 (D-60)	7,67 ± 5,82	50,00 ± 106,96	0,217 ^{§§}
IL-17 (D-120)	8,45 ± 9,67	49,44 ± 117,74	0,476 ^{§§}
IL-17 (D-180)	4,53 ± 2,48	51,12 ± 137,22	0,279 ^{§§}
IL-4 (D-0)	10,31 ± 16,42	41,67 ± 149,72	0,633 ^{§§}
IL-4 (D-60)	53,78 ± 176,49	41,24 ± 149,35	0,309 ^{§§}
IL-4 (D-120)	63,09 ± 152,62	51,41 ± 187,37	0,211 ^{§§}

IL-4 (D-180)	29,74 ± 90,76	58,76 ± 219,41	0,602 ^{ss}
IL-13 (D-0)	5,60 ± 6,79	5,58 ± 6,70	0,964 ^{ss}
IL-13 (D-60)	8,82 ± 19,65	18,06 ± 39,38	0,502 ^{ss}
IL-13 (D-120)	3,91 ± 0,00	5,89 ± 7,92	0,317 ^{ss}
IL-13 (D-180)	3,91 ± 0,00	3,91 ± 0,00	1,000 ^{ss}
IL-8 (D-0)	226,84 ± 193,83	137,12 ± 120,93	0,127 ^s
IL-8 (D-60)	277,84 ± 210,88	645,15 ± 1967,42	0,142 ^{ss}
IL-8 (D-120)	211,96 ± 147,02	695,40 ± 1955,24	0,970 ^{ss}
IL-8 (D-180)	149,14 ± 150,29	619,69 ± 1977,80	0,497 ^{ss}
IP-10 (D-0)	1218,94±2250,77	1171,69±1859,87	0,763 ^{ss}
IP-10 (D-60)	1251,14±1488,09	763,37 ± 719,36	0,970 ^{ss}
IP-10 (D-120)	1695,99±3071,99	2094,96±4827,53	0,572 ^{ss}
IP-10 (D-180)	899,34 ± 871,22	2061,17±4849,96	0,598 ^{ss}

(^s) Teste t Student (^{ss}) Teste de Mann-Whitney

Material suplementar 2 -

Resultados das associações investigadas na secreção de citocinas e quimiocinas dicotomizadas categoricamente em grupos (diminuída, aumentada e inalterada)

Variáveis	Total	G1	G2	p-valor
	n (%)	n (%)	n (%)	
IL-6				
Diminuiu	10 (31,3)	8 (50,0)	2 (12,5)	0,009 ^s
Aumentou	10 (31,3)	6 (37,5)	4 (25,0)	
Inalteradas	12 (37,4)	2 (12,5)	10 (62,5)	
CCL-2				
Diminuiu	28 (87,5)	13 (81,2)	15 (93,7)	0,600 ^{ss}
Aumentou	4 (12,5)	3 (18,8)	1 (6,3)	
IL-17				
Diminuiu	15 (46,9)	9 (56,2)	6 (37,5)	0,420 ^{ss}
Aumentou	2 (6,2)	0 (0,0)	2 (12,5)	
Inalteradas	15 (46,9)	7 (43,8)	8 (50,0)	
IL-4				
Diminuiu	7 (21,9)	4 (25,0)	3 (18,8)	0,368 ^{ss}
Aumentou	2 (6,3)	2 (12,5)	0 (0,0)	

Inalteradas	23 (71,8)	10 (62,5)	13 (81,2)	
IL-13				
Diminuiu	5 (15,6)	2 (12,5)	3 (18,8)	1,000 ^{§§}
Inalteradas	27 (84,4)	14 (87,5)	13 (81,2)	
IL-8				
Diminuiu	14 (43,8)	8 (50,0)	6 (37,4)	0,819 ^{§§}
Aumentou	9 (28,1)	4 (25,0)	5 (31,3)	
Inalteradas	9 (28,1)	4 (25,0)	5 (31,3)	
IP-10				
Diminuiu	2 (6,3)	2 (12,5)	0 (0,0)	0,170 ^{§§}
Aumentou	9 (28,1)	6 (37,5)	3 (18,8)	
Inalteradas	21 (65,6)	8 (50,0)	13 (81,2)	

([§]) Teste Qui-Quadrado () Teste Exato de Fisher. Negrito: significância estatística

Fonte: A autora (2022)

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O nosso estudo constatou, que a sinvastatina possa apresentar uma possível atividade imunomoduladora, através da diminuição dos níveis séricos da IL-6 em parte dos pacientes com ES investigados, em comparação ao placebo, em todos os tempos avaliados nesse ensaio clínico. As outras citocinas e quimiocinas investigadas (IL-4, IL-8, IL-13, IL-17, IL-29, CCL-2 e IP-10) não apresentaram o mesmo comportamento nos tempos pesquisados, apesar de apresentarem variações numéricas que pudessem sugerir alguma influência dessa intervenção, não foi encontrada significância estatística. Quanto aos dados dos pacientes, assim como quanto às suas manifestações clínicas observadas, seja no seu ingresso ou durante a realização desse estudo, não conseguimos demonstrar que após o uso da sinvastatina, os resultados obtidos com a IL6, ou mesmo com as demais citocinas e quimiocinas investigadas, possa haver a correlação. Entendemos por fim que, apesar de se tratar de resultados bastante significativos e promissores, outros ensaios clínicos randomizados, com um maior número amostral de pacientes portadores de ES sejam necessários para validar estes achados.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8° ed. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, 2015.
- ABOU-RAYA, A.; ABOU-RAYA, S.; HELMII, M. Statins as immunomodulators in systemic sclerosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1110, p. 670–680, 2007.
- ABOU-RAYA, A.; ABOU-RAYA, S.; HELMII, M. Statins: Potentially useful in therapy of systemic sclerosis-related Raynaud's phenomenon and digital ulcers. **Journal of Rheumatology**, v. 35, n. 9, p. 1801–1808, 2008.
- ABUD-MENDOZA, C. et al. Therapy with statins in patients with refractory rheumatic diseases: a preliminary study. **Lupus**, v. 12, n. 8, p. 607-611, 2003.
- ALEKPEROV, R. et al. Pleiotropic effects of statins in systemic sclerosis. *Ter Arkh.*, v. 83, n. 5, p. 41–47, 2011.
- ALLANORE, Y. et al. Systemic sclerosis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. April 2015, 2015.
- ALLCOCK, R. J. et al. A study of the prevalence of systemic sclerosis in northeast England. **Rheumatology**, v. 43, n. 5, p. 596–602, 2004.
- ANTONELLI, A. et al. Th1 and Th2 chemokine serum levels in systemic sclerosis in the presence or absence of autoimmune thyroiditis. **Journal of Rheumatology**, v. 35, n. 9, p. 1809–1811, 2008.
- ASANO, Y.; SATO, S. Vasculopathy in scleroderma. **Seminars in Immunopathology**, v. 37, n. 5, p. 489–500, 2015.
- ASSASSI, S. et al. Genetics of scleroderma: Implications for personalized medicine? **BMC Medicine**, v. 11, n. 1, 2013.
- BAGNATO, G. et al. Simvastatin attenuates the development of pulmonary and cutaneous fibrosis in a murine model of systemic sclerosis. **Rheumatology** (United Kingdom), v. 52, n. 8, p. 1377–1386, 2013.
- BALBIR-GURMAN, A.; BRAUN-MOSCOVICI, Y. Best Practice & Research Clinical Rheumatology Scleroderma – New aspects in pathogenesis and treatment. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 26, n. 1, p. 13–24, 2012.
- BANDINELLI, F. et al. CCL2, CCL3 and CCL5 chemokines in systemic sclerosis: The correlation with SSc clinical features and the effect of prostaglandin E1 treatment. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 30, n. SUPPL.71, 2012.
- BARAUT, J. et al. Les cytokines dans la sclérodémie systémique. **Pathologie Biologie**, v. 60, n. 2, p. 127–139, 2012.
- BELLANDO-RANDONE, S.; GUIDUCCI, S.; MATUCCI-CERINIC, M. Very early diagnosis of systemic sclerosis. **Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej**, 2012.
- BELPERIO, J. A. et al. Interaction of IL-13 and C10 in the pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 27, n. 4, p. 419–427, out. 2002.

BLAGOJEVIC, J.; MATUCCI-CERINIC, M. Are statins useful for treating vascular involvement in systemic sclerosis? **Nature Clinical Practice Rheumatology**, v. 5, n. 2, p. 70–71, 2009.

BLOM, I. E.; GOLDSCHMEDING, R.; LEASK, A. Gene regulation of connective tissue growth factor: New targets for antifibrotic therapy? **Matrix Biology**, v. 21, n. 6, p. 473–482, 2002.

BROWN, M.; O'REILLY, S. The immunopathogenesis of fibrosis in systemic sclerosis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 195, n. 3, p. 310–321, 2019.

BRUNI, C. et al. Kidney involvement in systemic sclerosis: From pathogenesis to treatment. *Journal of Scleroderma and Related Disorders*, v. 3, n. 1, p. 43–52, 2018.

CHANG, B. et al. Natural history of mild-moderate pulmonary hypertension and the risk factors for severe pulmonary hypertension in scleroderma. **Journal of Rheumatology**, v. 33, n. 2, p. 269–274, 2006.

CHARLES, C.; CLEMENTS, P.; FURST, D. E. Systemic sclerosis: hypothesis-driven treatment strategies. **Lancet**, v. 367, p. 1683–1691, 2006.

CHIZZOLINI, C. et al. Fibrosis and immune dysregulation in systemic sclerosis. **Autoimmunity Reviews**, v. 10, n. 5, p. 276–281, 2011.

CHIZZOLINI, C.; DUFOUR, A. M.; BREMBILLA, N. C. Is there a role for IL-17 in the pathogenesis of systemic sclerosis? **Immunology Letters**, v. 195, n. August 2017, p. 61–67, 2018.

CODULLO, V. et al. Disease-related malnutrition in systemic sclerosis: evidences and implications. **Clin Exp Rheumatol**, v. 33, n. 4, p. 190–194, 2015.

COX, S. R. et al. Isolated pulmonary hypertension in scleroderma. **Internal Medicine Journal**, v. 35, n. 1, p. 28–33, 2005.

DALAKAS, M. C. Pathogenesis and therapies of immune-mediated myopathies. **Autoimmunity reviews**, v. 11, n. 3, p. 203–206, jan. 2012.

DANTAS, A. T. et al. Interferons and systemic sclerosis: Correlation between interferon gamma and interferon-lambda 1 (IL-29). **Autoimmunity**, v. 48, n. 7, p. 429–433, 2015.

DE ALMEIDA, Anderson Rodrigues et al. Increased levels of the soluble oncostatin M receptor (sOSMR) and glycoprotein 130 (sgp130) in systemic sclerosis patients and associations with clinical parameters. **Immunobiology**, v. 225, n. 3, p. 151964, 2020.

DEL PAPA, N. et al. Simvastatin reduces endothelial activation and damage but is partially ineffective in inducing endothelial repair in systemic sclerosis. **Journal of Rheumatology**, v. 35, n. 7, p. 1323–1328, 2008.

DI LUIGI, Luigi et al. Sildenafil reduces expression and release of IL-6 and IL-8 induced by reactive oxygen species in systemic sclerosis fibroblasts. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 9, p. 3161, 2020.

DENTON, C. P. et al. Renal complications and scleroderma renal crisis. **Rheumatology** (Oxford, England), v. 48 Suppl 3, p. 32–35, 2009.

DENTON, C. P. et al. BSR and BHPR guideline for the treatment of systemic sclerosis. **Rheumatology** (United Kingdom), v. 55, n. 10, p. 1906–1910, 2016.

DENTON, C. P.; KHANNA, D. Systemic sclerosis. **The Lancet**, v. 390, n. 10103, p. 1685–1699, 2017.

DIAB, S. et al. Systemic sclerosis sine scleroderma: A multicenter study of 1417 subjects. **Journal of Rheumatology**, v. 41, n. 11, p. 2179–2185, 2014.

DISTLER, Oliver et al. Nintedanib for systemic sclerosis–associated interstitial lung disease. **New England Journal of Medicine**, v. 380, n. 26, p. 2518-2528, 2019.

DIOMEDE, L. et al. In vivo anti-inflammatory effect of statins is mediated by nonsterol mevalonate products. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 21, n. 8, p. 1327–1332, ago. 2001.

DOMSIC, R. T. et al. Skin thickness progression rate: A predictor of mortality and early internal organ involvement in diffuse scleroderma. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 70, n. 1, p. 104–109, 2011.

FERREIRA, A. M. et al. Diminished induction of skin fibrosis in mice with MCP-1 deficiency. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, n. 8, p. 1900–1908, 2006.

FOOCHAROEN, C. et al. Clinical characteristics of scleroderma overlap syndromes: comparisons with pure scleroderma. **International Journal of Rheumatic Diseases**, v. 19, n. 9, p. 913–923, 2016.

FUJII, H. et al. Serum levels of a Th1 chemoattractant IP-10 and Th2 chemoattractants, TARC and MDC, are elevated in patients with systemic sclerosis. **Journal of Dermatological Science**, v. 35, n. 1, p. 43–51, 2004.

FURST, D. E. et al. The modified rodnan skin score is an accurate reflection of skin biopsy thickness in systemic sclerosis. **Journal of Rheumatology**, v. 25, n. 1, p. 84–88, 1998.

FURUSE, Shinobu et al. Serum concentrations of the CXC chemokines interleukin 8 and growth-regulated oncogene-alpha are elevated in patients with systemic sclerosis. **The Journal of Rheumatology**, v. 30, n. 7, p. 1524-1528, 2003.

GABRIELLI, A. et al. Oxidative stress and the pathogenesis of scleroderma: The Murrell's hypothesis revisited. **Seminars in Immunopathology**, v. 30, n. 3, p. 329–337, 2008.

GALLAGHER, G. et al. The lambda interferons: Guardians of the immune-epithelial interface and the T-helper 2 response. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 30, n. 8, p. 603–615, 2010.

GALLUCCIO, F. et al. Registries in systemic sclerosis: A worldwide experience. **Rheumatology**, v. 50, n. 1, p. 60–68, 2011.

GIZINSKI, A. M.; FOX, D. A. T cell subsets and their role in the pathogenesis of rheumatic disease. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 26, n. 2, p. 204–210, 2014.

GONÇALVES, R. S. G. **Avaliação da atividade imunomoduladora de estatinas em pacientes portadores de esclerose sistêmica**. [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2017.

GREENWOOD, J.; STEINMAN, L.; ZAMVIL, S. S. Statin therapy in autoimmunity: From protein prenylation to immunomodulation. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 5, p. 1–23, 2006.

GUIDUCCI, S.; BELLANDO-RANDONE, S.; MATUCCI-CERINIC, M. A new way of thinking about systemic sclerosis: The opportunity for a very early diagnosis **Israel Medical Association Journal**, 2016.

HASEGAWA, M. et al. Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. **The Journal of rheumatology**, v. 24, n. 2, p. 328–332, fev. 1997.

HASEGAWA, M.; SATO, S.; TAKEHARA, K. Augmented production of chemokines (monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) and MIP-1 β) in patients with systemic sclerosis: MCP-1 and MIP-1 α may be involved in the development of pulmonary fibrosis. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 117, n. 1, p. 159-165, 1999.

HAUSTEIN, U. F. Systemic Sclerosis — Scleroderma BT European Handbook of Dermatological Treatments. In: KATSAMBAS, A. D.; LOTTI, T. M. (Eds.). . Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2000. p. 564–569.

HINZ, B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 3, p. 526–537, 2007.

HONG, C. et al. Scleroderma and breast implants. **Qjm**, v. 108, n. 7, p. 569–570, 2015.

HORIMOTO, Alex Magno Coelho; SILVEIRA, Aida Freitas do Carmo; COSTA, Izaias Pereira da. Familial autoimmunity and polyautoimmunity in 60 Brazilian Midwest patients with systemic sclerosis. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 56, p. 314-322, 2016.

HORIMOTO, Alex Magno Coelho et al. Incidence and prevalence of systemic sclerosis in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 57, p. 107-114, 2017.

HUDSON, M.; FRITZLER, M. J. Diagnostic criteria of systemic sclerosis. **Journal of Autoimmunity**, v. 48–49, p. 38–41, 2014.

HUGHES, M. et al. A study comparing videocapillaroscopy and dermoscopy in the assessment of nailfold capillaries in patients with systemic sclerosis-spectrum disorders. **Rheumatology** (United Kingdom), v. 54, n. 8, p. 1435–1442, 2015.

HUGHES, M. Early diagnosis and management of systemic sclerosis. **Prescriber**, v. 29, n. 7, p. 27–32, 2018.

HUGHES, M.; HERRICK, A. L. Digital ulcers in systemic sclerosis. **Rheumatology** (Oxford, England), v. 56, n. 1, p. 14–25, 2017.

KALOGEROU, A. et al. Early T cell activation in the skin from patients with systemic sclerosis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 64, n. 8, p. 1233–1235, 2005.

KATSUMOTO, T. R.; WHITFIELD, M. L.; CONNOLLY, M. K. The pathogenesis of systemic sclerosis. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 6, p. 509–537, 2011.

KHANNA, D. et al. The Lancet Respiratory. **Medicine**, v. 8, n. 10, p. 963–974, 2020.

KHANNA, Dinesh et al. Standardization of the modified Rodnan skin score for use in clinical trials of systemic sclerosis. **Journal of scleroderma and related disorders**, v. 2, n. 1, p. 11-18, 2017.

KIMURA, M. et al. Effects of fluvastatin on leukocyte-endothelial cell adhesion in hypercholesterolemic rats. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 17, n. 8, p. 1521–1526, ago. 1997.

KITABA, S. et al. Blockade of interleukin-6 receptor alleviates disease in mouse model of scleroderma. **American Journal of Pathology**, v. 180, n. 1, p. 165–176, 2012.

KOCH, A. E. et al. In situ expression of cytokines and cellular adhesion molecules in the skin of patients with systemic sclerosis. **Pathobiology**, v. 61, n. 5–6, p. 239–246, 1993.

KRANENBURG, P. et al. Survival and organ involvement in patients with limited cutaneous systemic sclerosis and antitopoisomerase-I antibodies: Determined by skin subtype or auto-antibody subtype? A long-term follow-up study. **Rheumatology** (United Kingdom), v. 55, n. 11, p. 2001–2008, 2016.

KRASIMIROVA, E. et al. Treg/Th17 cell balance and phytohaemagglutinin activation of T lymphocytes in peripheral blood of systemic sclerosis patients. **World Journal of Experimental Medicine**, v. 7, n. 3, p. 84, 2017.

KURASAWA, K. et al. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 43, n. 11, p. 2455–2463, 2000.

KUWANA, M. et al. Increase in circulating endothelial precursors by atorvastatin in patients with systemic sclerosis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 54, n. 6, p. 1946–1951, 2006.

KUWANA, M.; OKAZAKI, Y.; KABURAKI, J. Long-term beneficial effects of statins on vascular manifestations in patients with systemic sclerosis. **Modern Rheumatology**, v. 19, n. 5, p. 530–535, 2009.

KWAK, B. et al. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. **Nature medicine**, v. 6, n. 12, p. 1399–1402, dez. 2000.

LADAK, K.; POPE, J. E. A review of the effects of statins in systemic sclerosis. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 45, n. 6, p. 698–705, 2016.

LAMBOVA, S.; HERMANN, W.; MULLER-LADNER, U. Nailfold Capillaroscopy – Its Role in Diagnosis and Differential Diagnosis of Microvascular Damage in Systemic Sclerosis. **Current Rheumatology Reviews**, v. 9, n. 4, p. 254–260, 2014.

LAROSA, J. C.; HE, J.; VUPPUTURI, S. Effect of statins on risk of coronary disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. **JAMA**, v. 282, n. 24, p. 2340–2346, dez. 1999.

LE PAVEC, J. et al. Systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 181, n. 12, p. 1285–1293, 2010.

LEPRI, G. et al. Evidence for oesophageal and anorectal involvement in very early systemic sclerosis (VEDOSS): Report from a single VEDOSS/EUSTAR centre. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 74, n. 1, p. 124–128, 2015.

LEROY, E. C. et al. Scleroderma (systemic sclerosis): Classification, subsets and pathogenesis. **Journal of Rheumatology**, v. 15, n. 2, p. 202–205, 1988.

LEROY, E. C.; MEDSGER, J. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. **Journal of Rheumatology**, v. 28, n. 7, p. 1573–1576, 2001.

LEUNG, B. P. et al. A novel anti-inflammatory role for simvastatin in inflammatory arthritis. **Journal of immunology** (Baltimore, Md.: 1950), v. 170, n. 3, p. 1524–1530, fev. 2003.

LI, M. et al. Interferon- λ s: the modulators of antiviral, antitumor, and immune responses. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 86, n. 1, p. 23–32, 2009.

LOUNEVA, N. et al. Inhibition of systemic sclerosis dermal fibroblast type I collagen production and gene expression by simvastatin. **Arthritis and Rheumatism**, v. 54, n. 4, p. 1298–1308, 2006.

LUGGEN, M. et al. The evolution of Raynaud's phenomenon: A longterm prospective study. **Journal of Rheumatology**, 1995.

MACKAY, D. J.; HALL, A. Rho GTPases. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 33, p. 20685–20688, ago. 1998.

MAN, A. et al. The risk of cardiovascular disease in systemic sclerosis: A population-based cohort study. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 72, n. 7, p. 1188–1193, 2013.

MATSUSHITA, T. et al. Longitudinal analysis of serum cytokine concentrations in systemic sclerosis: Association of interleukin 12 elevation with spontaneous regression of skin sclerosis. **Journal of Rheumatology**, v. 33, n. 2, p. 275–284, 2006.

MATSUSHITA, T.; TAKEHARA, K. An update on biomarker discovery and use in systemic sclerosis. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 17, n. 9, p. 823–833, 2017.

MAVILIA, C. et al. Type 2 helper T-cell predominance and high CD30 expression in systemic sclerosis. **American Journal of Pathology**, v. 151, n. 6, p. 1751–1758, 1997.

MEDSGER, T. A. et al. 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**, v. 63, n. 6, p. 1738–1747, 2011.

MINIER, T. et al. Preliminary analysis of the Very Early Diagnosis of Systemic Sclerosis (VEDOSS) EUSTAR multicentre study: Evidence for puffy fingers as a pivotal sign for suspicion of systemic sclerosis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 73, n. 12, p. 2087–2093, 2014.

MOINZADEH, P. et al. Impact of hallmark autoantibody reactivity on early diagnosis in scleroderma. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 43, n. 3, p. 249–255, 2012.

MURDACA, G. et al. Genetic factors and systemic sclerosis. **Autoimmunity Reviews**, v. 15, n. 5, p. 427–432, 2016.

NEEDLEMAN, B. W.; WIGLEY, F. M.; STAIR, R. W. Interleukin-1, Interleukin-2, Interleukin-4, Interleukin-6, Tumor Necrosis Factor α , and Interferon- γ Levels in Sera from Patients With Scleroderma. **Arthritis & Rheumatism**, v. 35, n. 1, p. 67–72, 1992.

OGAWA, T. et al. Taxane-induced scleroderma-like skin changes resulting in gangrene: A case report. **Journal of Dermatology**, 2017.

ONG, V. H.; DENTON, C. P. Innovative therapies for systemic sclerosis. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 22, n. 3, p. 264–272, 2010.

PATEL, D. D.; ZACHARIAH, J. P.; WHICHARD, L. P. CXCR3 and CCR5 ligands in rheumatoid arthritis synovium. **Clinical immunology** (Orlando, Fla.), v. 98, n. 1, p. 39–45, jan. 2001.

PENN, H. et al. Scleroderma renal crisis: Patient characteristics and long-term outcomes. **Qjm**, v. 100, n. 8, p. 485–494, 2007.

PLASTIRAS, S. C. et al. Determinants of Pulmonary Arterial Hypertension in Scleroderma. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 36, n. 6, p. 392–396, 2007.

POSTLETHWAITE, A. E. et al. Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix proteins in response to interleukin 4. **Journal of Clinical Investigation**, v. 90, n. 4, p. 1479–1485, 1992.

RAZZAQ, T. M. et al. Regulation of T-cell receptor signalling by membrane microdomains. **Immunology**, v. 113, n. 4, p. 413–426, dez. 2004.

RINKEVICH, Y. et al. Identification and isolation of a dermal lineage with intrinsic fibrogenic potential. **Science**, v. 398, n. 6232, p. 1–33, 2016.

RODRÍGUEZ-REYNA, T. S. et al. Th17 peripheral cells are increased in diffuse cutaneous systemic sclerosis compared with limited illness: A cross-sectional study. **Rheumatology International**, v. 32, n. 9, p. 2653–2660, 2012.

RONGIOLETTI, F. et al. Scleredema. A multicentre study of characteristics, comorbidities, course and therapy in 44 patients. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 29, n. 12, p. 2399–2404, 2015.

ROSENBLOOM, J. 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**, v. 43, n. 7, p. 1624–1632, 2000.

ROSSI, M. et al. Increased finger skin vasoreactivity and stimulated vasomotion associated with simvastatin therapy in systemic sclerosis hypercholesterolemic patients. **Rheumatology International**, v. 32, n. 12, p. 3415–3421, 2012.

ROTHFIELD, N. F.; RODNAN, G. P. Serum antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis (scleroderma). **Arthritis and Rheumatism**, v. 11, n. 5, p. 607–617, 1968.

ROUMM, A. D. et al. Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. Quantification, subtyping, and clinical correlations. **Arthritis and rheumatism**, v. 27, n. 6, p. 645–653, jun. 1984.

ROYLE, J. G. et al. The incidence, prevalence, and survival of systemic sclerosis in the UK Clinical Practice Research Datalink. **Clinical Rheumatology**, v. 37, n. 8, p. 2103–2111, 2018.

SAKKAS, L. I. et al. Increased levels of alternatively spliced interleukin 4 (IL-4 δ 2) transcripts in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic sclerosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, n. 5, p. 660–664, 1999.

SARGENT, J. L. et al. A TGFB-responsive gene signature is associated with a subset of diffuse scleroderma with increased disease severity. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 130, n. 3, p. 694–705, 2010.

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**, v. 27, n. 2, p. 140–146, 2001.

SHAH, S. et al. Ras and Rap1: A tale of two GTPases. **Seminars in cancer biology**, v. 54, p. 29–39, fev. 2019.

SHARMA, S. K. et al. The effect of an anti-CD3 monoclonal antibody on bleomycin-induced lymphokine production and lung injury. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 154, n. 1, p. 193–200, 1996.

SHIMA, Y. et al. The skin of patients with systemic sclerosis softened during the treatment with anti-IL-6 receptor antibody tocilizumab. **Rheumatology**, v. 49, n. 12, p. 2408–2412, 2010.

SOMSEL RODMAN, J.; WANDINGER-NESS, A. Rab GTPases coordinate endocytosis. **Journal of cell science**, v. 113 Pt 2, p. 183–192, jan. 2000.

SHINJO, S.K./Moreira, C. **Livro da Sociedade Brasileira de Reumatologia**. ed. São Paulo: Manole, 2021

SPARROW, C. P. et al. Simvastatin has anti-inflammatory and antiatherosclerotic activities independent of plasma cholesterol lowering. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 21, n. 1, p. 115–121, jan. 2001.

STALKER, T. J.; LEFER, A. M.; SCALIA, R. A new HMG-CoA reductase inhibitor, rosuvastatin, exerts anti-inflammatory effects on the microvascular endothelium: the role of mevalonic acid. **British journal of pharmacology**, v. 133, n. 3, p. 406–412, jun. 2001.

STEEN, V. Predictors of end stage lung disease in systemic sclerosis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 62, n. 2, p. 97–99, 2003.

STEEN, V. D. The lung in systemic sclerosis. **Journal of Clinical Rheumatology**, v. 11, n. 1, p. 40–46, 2005.

STEEN, V. D.; MEDSGER, T. A. Severe organ involvement in systemic sclerosis with diffuse scleroderma. **ARTHRITIS & RHEUMATISM**, v. 43, n. 11, p. 2437–2444, 2000.

TAKAI, Y.; SASAKI, T.; MATOZAKI, T. Small GTP-binding proteins. **Physiological reviews**, v. 81, n. 1, p. 153–208, jan. 2001.

TRISTANO, A. G.; FULLER, K. Immunomodulatory effects of statins and autoimmune rheumatic diseases: Novel intracellular mechanism involved. **International Immunopharmacology**, v. 6, n. 12, p. 1833–1846, 2006.

TYNDALL, A.; MATUCCI-CERINIC, M.; MÜLLER-LADNER, U. Future targets in the management of systemic sclerosis. **Rheumatology**, v. 48, n. suppl_3, p. iii49-iii53, 2006.

U.S. FOOD & DRUGS ADMINISTRATION. Statins. Disponível em: <<https://www.fda.gov/drugs/information-drug-class/statins>>. Acesso em: 16 jul. 2021.

VALENTINI, G.; BLACK, C. Systemic sclerosis. Best Practice and Research: Clinical Rheumatology, v. 16, n. 5, p. 807–816, 2002.

VAN DEN HOMBERGH, W. M. T. et al. An easy prediction rule for diffuse cutaneous systemic sclerosis using only the timing and type of first symptoms and auto-antibodies: Derivation and validation. **Rheumatology** (United Kingdom), v. 55, n. 11, p. 2023–2032, 2016.

VAN DEN HOOGEN, F. et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: An american college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. **Arthritis and Rheumatism**, v. 65, n. 11, p. 2737–2747, 2013.

VARGA, J.; TROJANOWSKA, M.; KUWANA, M. Pathogenesis of systemic sclerosis: Recent insights of molecular and cellular mechanisms and therapeutic opportunities. **Journal of Scleroderma and Related Disorders**, v. 2, n. 3, p. 137–152, 2017.

WASMUTH, H. E.; TACKE, F.; TRAUTWEIN, C. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. **Seminars in Liver Disease**, v. 30, n. 3, p. 215–225, 2010.

WELLS, A. U.; STEEN, V.; VALENTINI, G. Pulmonary complications: one of the most challenging complications of systemic sclerosis. **Rheumatology** (Oxford, England), v. 48 Suppl 3, n. April, p. 48–52, 2009.

WIRZ, E. G. et al. Incidence and predictors of cutaneous manifestations during the early course of systemic sclerosis: A 10-year longitudinal study from the EUSTAR database. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 75, n. 7, p. 1285–1292, 2016.

WOO, J. T. et al. Inhibitory effects of mevastatin and a geranylgeranyl transferase I inhibitor (GGTI-2166) on mononuclear osteoclast formation induced by receptor activator of NFκB ligand (RANKL) or tumor necrosis factor-α (TNF-α). **Biochemical Pharmacology**, v. 69, n. 1, p. 87–95, 2005.

WU, M. et al. Rosiglitazone abrogates bleomycin-induced scleroderma and blocks profibrotic responses through peroxisome proliferator-activated receptor-β. **American Journal of Pathology**, v. 174, n. 2, p. 519–533, 2009.

WU, Q. et al. Serum IFN-λ1 is abnormally elevated in rheumatoid arthritis patients. **Autoimmunity**, v. 46, n. 1, p. 40–43, 2013.

ZEISER, R. Immune modulatory effects of statins. **Immunology**, v. 154, n. 1, p. 69–75, maio 2018.

ZEKOVIC, Ana et al. Association between the-174 C/G polymorphism in the interleukin-6 (IL-6) gene and gastrointestinal involvement in patients with systemic sclerosis. **Clinical Rheumatology**, v. 37, n. 9, p. 2447–2454, 2018.

ZHANG, X. et al. 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. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 10, p. 6988–6996, 2008.

ZIMMERMANN, A. F.; PIZZICHINI, M. M. M. Update on the etiopathogenesis of systemic sclerosis. **Revista Brasileira de Reumatologia** (English Edition), v. 53, n. 6, p. 516–524, 2013.

APÊNDICE A - FICHA CLÍNICA DE AVALIAÇÃO/ACOMPANHAMENTO DOS PACIENTES

AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE DO USO DA SINVASTATINA EM PACIENTES COM ESCLEROSE SISTÊMICA: UM ENSAIO CLÍNICO PRAGMÁTICO

IDENTIFICAÇÃO			
Número da Ficha	Data de preenchimento ____/____/____	Sexo 1. Masculino 2. Feminino	
Registro hospital	Telefone		
Nome do paciente	Idade (anos)		
Início do Fenômeno de Raynaud: ____/____/____	Tempo FRy (meses): ____	Forma Clínica 1. Cutânea Limitada 2. Cutânea Difusa 3. Sine Escleroderma 4. Overlap (EXCLUIR) 5. Localizada (EXCLUIR)	
Início do sintoma não-FRy: ____/____/____	Tempo não-FRy (meses): ____		
Data do diagnóstico: ____/____/____	Tempo diagnóstico (meses): ____		
AUTOANTICORPOS			
1. Positivo 2. Negativo 3. Não realizado			
FAN	Anti-Scl70	Anti-centrômero	Anti-RNA polimerase III
Título: _____ Padrão: _____			
MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS (consultar definições)			
Pele 1. Sim ☐ 2. Não ☐	Fenômeno de Raynaud 1. Sim ☐ 2. Não ☐		
Úlceras digitais (prévias ou atuais) 1. Sim ☐ 2. Não ☐	Doença pulmonar intersticial 1. Sim ☐ 2. Não ☐		
Hipertensão arterial pulmonar 1. Sim ☐ 2. Não ☐	Artrite (prévia ou atual) 1. Sim ☐ 2. Não ☐		
Miopatia 1. Sim ☐ 2. Não ☐	Comprometimento esofageano 1. Sim ☐ 2. Não ☐		
Crise renal 1. Sim ☐ 2. Não ☐	Telangiectasias 1. Sim ☐ 2. Não ☐		
Calcinose 1. Sim ☐ 2. Não ☐	Rodnan: ☐ ☐		
HAQ:	SHAQ:		
MEDICAÇÕES (uso atual)			
1. Sim 2. Não 3. Não sabe informar			
BCC () Nifedipina () Amlodipina () Diltiazem () Verapamil	IECA () Captopril () Enalapril	BRA () Losartan () Valsartan	AAS

AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE DO USO DA SINVASTATINA EM PACIENTES COM ESCLEROSE
SISTÊMICA: UM ENSAIO CLÍNICO PRAGMÁTICO

Pentoxifilina	Sildenafil	Bosentana	Cilostazol
Metotrexato	Azatioprina	Micofenolato	Ciclofosfamida VO
Ciclofosfamida EV	IBP () Omeprazol () Pantoprazol	Procinético () Bromoprida () Domperidona	Corticoide () Prednisona () Prednisolona ()
AINE	Rituximabe	Leflunomida	Colecalciferol
Outros			
EXAMES LABORATORIAIS Data:			
Colesterol total: HDL: LDL: VLDL:			

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					

APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
NÚCLEO DE PESQUISA EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA – SUELY GALDINO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa, **AValiação da Efetividade do Uso da Sinvastatina em Pacientes com Esclerose Sistêmica: Um Ensaio Clínico Pragmático**, que está sob a responsabilidade da pesquisadora, Lilian David de Azevedo Valadares, residente no endereço Rua Sebastião Alves número 208, apto 1201 Bairro Tamarineira Recife-PE, CEP 52060-100, Telefone: (81) 999742761, e-mail: ldvaladares@hotmail.com. Também participam desta pesquisa os pesquisadores: Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta, e-mail: mgrpitta@gmail.com, Ddo. Eudes Gustavo Constantino Cunha, e-mail: eudesgccunha@outlook.com, Dra. Rafaela Silva Guimarães Gonçalves, e-mail: rafa_agg@hotmail.com, Profa. Dra. Andréa Tavares Dantas, e-mail: andreatdantas@gmail.com, Ddo. Anderson Rodrigues de Almeida, email: andersonr.almeida@hotmail.com, Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo, e-mail: moacyroraculo@gmail.com. Está sob a orientação da Profa. Dra. Ângela Luzia Branco Pinto Duarte, e-mail: angelabduarte@hotmail.com.

Todas as suas dúvidas podem ser esclarecidas com o responsável por esta pesquisa. Apenas quando todos os esclarecimentos forem dados e você concorde com a realização do estudo, pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Você estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema, desistir é um direito seu, bem como será possível retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa, também sem nenhuma penalidade. Esta solicitação deverá ser realizada por escrito e assinada.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

- A esclerose sistêmica é uma doença que afeta principalmente a pele, podendo comprometer também outros órgãos, como pulmão, coração e estômago. 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. Por esta razão, nosso objetivo é estudar a ação de novos fármacos em células do sangue e da pele (em caso de biópsia que consiste na retirada de um fragmento da pele) de pacientes e indivíduos saudáveis não portadores desta doença;
- Nesta pesquisa serão realizados experimentos com as células presentes no seu sangue que é coletado da sua veia como uma coleta de sangue para exames laboratoriais no dia da consulta médica, sem a necessidade de deslocamento em dia adicional. A coleta de sangue é feita no braço e a quantidade coletada é equivalente a duas colheres de sopa (18 mL). O material coletado será processado para isolamento de células para pesquisa e separação do soro, que será armazenado adequadamente em freezers -80°C e poderá ser utilizado em pesquisas futuras, com prévia autorização do Comitê de Ética em Pesquisa, e/ou da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.
- As coletas serão feitas por profissionais treinados e competentes e orientados para reduzir os 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. Em caso de danos ocasionados por quaisquer procedimentos envolvendo a pesquisa o paciente terá direito a assistência médica integral e gratuita, além de exames complementares necessários, devido a possíveis danos diretos/ indiretos e imediatos/tardios trazidos pela sua participação no presente estudo, pelo tempo que for necessário ao participante da pesquisa, garantido pelo pesquisador responsável/ patrocinador estando de acordo com os itens II.3.1 e II.3.2 da Resolução CNS nº. 466 de 2012.
- Com relação aos benefícios, você será submetido a uma avaliação clínica e, caso seja detectada alguma alteração sugestiva de doença autoimune, será encaminhado para um acompanhamento adequado, além de contribuir de maneira geral para a melhor compreensão do mecanismo da doença, favorecendo aos demais pacientes e guiando as equipes de saúde para maior sucesso no tratamento da doença.
- O paciente participante da pesquisa e o médico que o acompanha possui total acesso aos seus dados, bem como resultados de exames, os quais ficarão armazenados sob total sigilo e confidencialidade.

Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa (dados clínicos) ficarão armazenados em arquivos no serviço de Reumatologia, sob a responsabilidade da Dra. Andréa Dantas, no ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFPE (Av. Prof. Moraes Rêgo, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, 50670-901), por um período mínimo de 5 anos.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial. Salienta-se que os itens ressarcidos não são apenas aqueles relacionados a transporte e alimentação, mas a todo gasto tido pelo participante e do seu acompanhante, quando necessário e se houver a necessidade, em função da participação no estudo, estando de acordo com os itens II.21 e IV.3, da Resolução CNS nº 466 de 2012.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo, AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE DO USO DA SINVASTATINA EM PACIENTES COM ESCLEROSE SISTÊMICA: UM ENSAIO CLÍNICO PRAGMÁTICO como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento.

Local e data _____

Assinatura do participante: _____

Impressão
digital
(opcional)

Eu sei que posso concordar ou não com o armazenamento de minhas amostras biológicas para pesquisas futuras, sem que minha decisão interfira com meu tratamento. Assim sendo, minha decisão é:

- ☐ Sim, eu concordo com o armazenamento proposto.
☐ Não, eu não concordo com o armazenamento proposto.

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
NÚCLEO DE PESQUISA EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA – SUELY GALDINO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa, **AValiação da Efetividade do Uso da Sinvastatina em Pacientes com Esclerose Sistêmica: Um Ensaio Clínico Pragmático**, que está sob a responsabilidade da pesquisadora, Lilian David de Azevedo Valadares, residente no endereço Rua Sebastião Alves número 208, apto 1201 Bairro Tamarineira Recife-PE, CEP 52060-100, Telefone: (81) 999742761, e-mail: ldvaladares@hotmail.com. Também participam desta pesquisa os pesquisadores: Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta, Telefone: (81) 99671-7788, e-mail: mgrpitta@gmail.com, Ddo. Eudes Gustavo Constantino Cunha, e-mail: eudesgccunha@outlook.com, Dra. Rafaela Silva Guimarães Gonçalves, e-mail: rafa_agg@hotmail.com, Profa. Dra. Andréa Tavares Dantas, e-mail: andreatdantas@gmail.com, Ddo. Anderson Rodrigues de Almeida, email: andersonr.almeida@hotmail.com, Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo, e-mail: moacyroraculo@gmail.com. Está sob a orientação da Profa. Dra. Ângela Luzia Branco Pinto Duarte, e-mail: angelabduarte@hotmail.com.

Todas as suas dúvidas podem ser esclarecidas com o responsável por esta pesquisa. Apenas quando todos os esclarecimentos forem dados e você concorde com a realização do estudo, pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Você estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema, desistir é um direito seu, bem como será possível retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa, também sem nenhuma penalidade. Esta solicitação deverá ser realizada por escrito e assinada.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

- A esclerose sistêmica é uma doença que afeta principalmente a pele, podendo comprometer também outros órgãos, como pulmão, coração e estômago. 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. Por esta razão, nosso objetivo é estudar a ação de novos fármacos em células do sangue e da pele (em caso de biópsia que consiste na retirada de um fragmento da pele) de pacientes e indivíduos saudáveis não portadores desta doença;
- Nesta pesquisa serão realizados experimentos com as células presentes no seu sangue que é coletado da sua veia como uma coleta de sangue para exames laboratoriais. A coleta de sangue é feita no braço e a quantidade coletada é equivalente a duas colheres de sopa (18 mL). O material coletado será processado para isolamento de células para pesquisa e separação do soro, que será armazenado adequadamente em freezers -80°C e poderá ser utilizado em pesquisas futuras, com prévia autorização do Comitê de Ética em Pesquisa, e/ou da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.
- As coletas serão feitas por profissionais treinados e competentes e orientados para reduzir os 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 arroxada no local da coleta. Em caso de danos ocasionados por quaisquer procedimentos envolvendo a pesquisa o paciente terá direito a assistência médica integral e gratuita, além de exames complementares necessários, devido a possíveis danos diretos/ indiretos e imediatos/tardios trazidos pela sua participação no presente estudo, pelo tempo que for necessário ao participante da pesquisa, garantido pelo pesquisador responsável/ patrocinador estando de acordo com os Itens II.3.1 e II.3.2 da Resolução CNS nº. 466 de 2012).
- Com relação aos benefícios, você será submetido a uma avaliação clínica e, caso seja detectada alguma alteração sugestiva de doença autoimune, será encaminhado para um acompanhamento adequado, além de contribuir de maneira geral para a melhor compreensão do mecanismo da doença, favorecendo aos demais pacientes e guiando as equipes de saúde para maior sucesso no tratamento da doença.
- O paciente participante da pesquisa e o médico que o acompanha possui total acesso aos seus dados, bem como resultados de exames, os quais ficarão armazenados sob total sigilo e confidencialidade.

Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa (dados clínicos) ficarão armazenados em arquivos no serviço de Reumatologia, sob a responsabilidade da Dra. Andréa Dantas, no ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFPE (Av. Prof. Moraes Rêgo, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, 50670-901), por um período mínimo de 5 anos.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial. Salienta-se que os itens ressarcidos não são apenas aqueles relacionados a transporte e alimentação, mas a todo gasto tido pelo participante e do seu acompanhante, quando for necessário, em função da participação no estudo, estando de acordo com os itens II.21 e IV.3, da Resolução CNS nº 466 de 2012.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo **AValiação da Efetividade do Uso da Sinvastatina em Pacientes com Esclerose Sistêmica: Um Ensaio Clínico Pragmático**, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo (a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento.

A rogo de _____, que é (deficiente visual ou está impossibilitado de assinar), eu _____ assino o presente documento que autoriza a sua participação neste estudo.

Local e data _____

Assinatura _____

Eu sei que posso concordar ou não com o armazenamento de minhas amostras biológicas para pesquisas futuras, sem que minha decisão interfira com meu tratamento. Assim sendo, minha decisão é:

- () Sim, eu concordo com o armazenamento proposto.
() Não, eu não concordo com o armazenamento proposto.

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

APÊNDICE C - ARTIGO PUBLICADO PELA REVISTA BRAZILIAN JOURNAL OF HEALTH REVIEW: NÍVEIS SÉRICOS DA IL-13 NA ESCLEROSE SISTÊMICA: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA COM META-ANÁLISE



Brazilian Journal of Health Review | 5423
ISSN: 2595-6825

Níveis séricos da IL-13 na esclerose sistêmica: uma revisão sistemática com meta-análise

Serum levels of IL-13 in systemic sclerosis: a systematic review with meta-analysis

DOI:10.34119/bjhrv4n2-114

Recebimento dos originais: 04/02/2021

Aceitação para publicação: 15/03/2021

Lílian David de Azevedo Valadares

Mestre, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

E-mail: ldvaladares@hotmail.com

Maria Andreza Bezerra Correia

Doutor, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

Anderson Rodrigues de Almeida

Mestre, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

Eudes Gustavo Constantino Cunha

Mestre, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Doutor, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE.

Professor(a) Adjunto(a) da Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

Michelly Cristiny Pereira

Doutor, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

Andréa Tavares Dantas

Doutor, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

Professora Adjunta da Disciplina de Reumatologia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

Maíra Galdino da Rocha Pitta

Doutor, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

Professor(a) Adjunto(a) da Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

Angela Luzia Branco Pinto Duarte

Doutor, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

Professora Titular da Disciplina de Reumatologia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

RESUMO

A interleucina-13 (IL-13) sérica foi investigada na esclerose sistêmica (ES) por meio de uma meta-análise para avaliar a possível diferença nos níveis em pacientes com a doença e pessoas saudáveis. As buscas foram realizadas nas bases de dados Pubmed, ScienceDirect, Cochrane Library, LILACS e Scopus para estudos do tipo caso-controle



Níveis séricos da IL-13 na esclerose sistêmica: uma revisão sistemática com meta-análise

Serum levels of IL-13 in systemic sclerosis: a systematic review with meta-analysis

DOI:10.34119/bjhrv4n2-114

Recebimento dos originais: 04/02/2021

Aceitação para publicação: 15/03/2021

Lílian David de Azevedo Valadares

Mestre, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

E-mail: ldvaladares@hotmail.com

Maria Andreza Bezerra Correia

Doutor, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

Anderson Rodrigues de Almeida

Mestre, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

Eudes Gustavo Constantino Cunha

Mestre, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Doutor, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE.

Professor(a) Adjunto(a) da Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

Michelly Cristiny Pereira

Doutor, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

Andréa Tavares Dantas

Doutor, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

Professora Adjunta da Disciplina de Reumatologia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

Maíra Galdino da Rocha Pitta

Doutor, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

Professor(a) Adjunto(a) da Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

Angela Luzia Branco Pinto Duarte

Doutor, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

Professora Titular da Disciplina de Reumatologia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

RESUMO

A interleucina-13 (IL-13) sérica foi investigada na esclerose sistêmica (ES) por meio de uma meta-análise para avaliar a possível diferença nos níveis em pacientes com a doença e pessoas saudáveis. As buscas foram realizadas nas bases de dados Pubmed, ScienceDirect, Cochrane Library, LILACS e Scopus para estudos do tipo caso-controle



pertinentes utilizando os descritores. Os níveis séricos dos pacientes com ES em relação aos controles saudáveis foram plotados usando o software Review Manager 5.3. A avaliação da qualidade de cada estudo elegível foi conduzida na Escala de Newcastle-Ottawa (NOS). Quatro estudos de caso-controle foram selecionados para esta meta-análise e continham um total de 120 pacientes com ES e 84 controles saudáveis. Nossos resultados demonstram níveis séricos elevados da IL-13 em pacientes com ES, com um agrupamento médio de 0,70 ng/ml ($p=0,00001$) (IC 95%: -0,42 a -0,99, $p=0,6$). A IL-13 está aumentada no soro de pacientes com ES em comparação com os controles saudáveis e pode ser útil como possível biomarcador da doença.

Palavras-chave: interleucina-13, esclerose sistêmica, soro.

ABSTRACT

Serum interleukin-13 (IL-13) was investigated in systemic sclerosis (SS) by means of a meta-analysis to evaluate the possible difference in levels in patients with the disease and healthy people. Searches were performed in the Pubmed, ScienceDirect, Cochrane Library, LILACS and Scopus databases for relevant case-control type studies using the descriptors. The serum levels of ES patients compared to healthy controls were plotted using Review Manager 5.3 software. Quality assessment of each eligible study was conducted on the Newcastle-Ottawa Scale (NOS). Four case-control studies were selected for this meta-analysis and contained a total of 120 ES patients and 84 healthy controls. Our results demonstrate elevated serum levels of IL-13 in patients with ES, with a mean cluster of 0.70 ng/ml ($p=0.00001$) (95% CI: -0.42 to -0.99, $p=0.6$). IL-13 is increased in the serum of ES patients compared to healthy controls and may be useful as a possible biomarker of the disease.

Key words: interleukin-13, systemic sclerosis, serum.

1 INTRODUÇÃO

A Esclerose Sistêmica (ES) é uma doença autoimune sistêmica, caracterizada por alterações na microvasculatura, fibrose intersticial afetando pele e órgãos sólidos. Embora sem etiologia ou patogênese conhecida, as anormalidades na microvasculatura são frequentemente precedidas pela ativação do sistema imunológico (GU, et al., 2008). Estudos demonstram que as citocinas e os fatores de crescimento podem exercer na estimulação da síntese da matriz extracelular, modulando a função leucocitária, justificando essas alterações, principalmente a fibrose anormal. Slobodin e colaboradores (2010) apontam que há um aumento no número de células Treg em pacientes com ES, bem como sugere sua associação com a atividade e gravidade da doença (DANTAS, et al., 2015).

A interleucina-13 (IL-13) é uma proteína secretada pela ativação de células T, que inibe a produção de moléculas pró-inflamatórias por monócitos ativados, que modulam as funções das células B *in vitro* (SPADARO, et al., 2002). A IL-13 também parece



desempenhar um papel importante na proliferação de linfócitos B, na diferenciação e proliferação de imunoglobulinas (DEFrance, et al., 1992; PUNNONEN, et al., 1993; ZURAWSKI, et al., 1994). Este estudo de revisão sistemática com meta-análise teve como objetivo investigar a IL-13 sérica em pacientes com ES e voluntários saudáveis.

2 METODOLOGIA

Uma busca sistemática da literatura foi realizada nas seguintes bases de dados: Pubmed, ScienceDirect, Cochrane Library, LILACS e Scopus até 28 de setembro de 2020. As palavras utilizadas na busca da literatura com IL-13 e ES foram: Scleroderma, Systemic OR Systemic Sclerosis OR Sclerosis, Systemic OR Systemic Scleroderma AND Interleukin-13 OR IL-13 OR Interleukin 13 OR IL 13 OR IL13 AND Serum OR Serums OR Blood Serum OR Serum, Blood. Os artigos selecionados para esta meta-análise seguiram os critérios: (1) Estudos caso-controle avaliando os níveis séricos da IL-13 em pacientes com ES e indivíduos saudáveis; (2) estudos clínicos investigando o papel dessa citocina na ES; (3) estudos que forneceram os valores de dosagem da citocina; (4) estudos publicados na língua inglesa.

Três autores realizaram a extração de dados, qualquer discrepância foi resolvida por consenso. As informações mais relevantes foram extraídas dos estudos, incluindo: título do artigo, nome do primeiro autor, ano de publicação, número de participantes, média e desvio padrão dos níveis da citocina. Os valores expressos em mediana e intervalo interquartil foram convertidos em mediana e desvio padrão seguindo as recomendações do manual Cochrane.

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software Revman 5.3. A diferença média padronizada agrupada (SMD) foi usada para estimar a diferença nas medianas de IL-13 entre os grupos de pacientes e controles. O teste I^2 foi usado para avaliar a heterogeneidade estatística, e os valores de I^2 de 25,

50 e 75% foram classificados qualitativamente como baixa, moderada e alta heterogeneidade, respectivamente. Quando I^2 tinha valor de até 50%, o modelo de efeito fixo foi usado, valores maiores foram tratados com o modelo de efeito aleatório. O viés de publicação foi avaliado usando a escala de avaliação de Newcastle-Ottawa por 3 avaliadores independentes. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.



3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 BUSCA LITERÁRIA

Foram encontrados 58 artigos com ES e IL-13, dos quais 24 foram selecionados após a leitura do título, resumindo e excluindo duplicidades. Posteriormente, após leitura completa, apenas 4 artigos foram selecionados para a meta-análise por atenderem aos critérios pré-estabelecidos.

3.2 DIFERENÇA NOS NÍVEIS DE SÉRICOS DE IL-13 DE PACIENTES COM ES E GRUPOS CONTROLES.

Quatro estudos, com um total de 120 pacientes com ES e 84 controles saudáveis, tiveram os níveis séricos de IL-13 avaliados entre si (figura 1) (SPADARO, et al., 2002; SATO; HASEGAWA; TAKEHARA, 2001; VETTORI, et al., 2014; RICCIERI, et al., 2003, SLOBODIN, 2010, DEFRANCE, 1992). O baixo percentual de heterogeneidade demonstra a homogeneidade da amostra dos estudos incluídos ($I^2 = 0\%$). Os resultados da meta-análise demonstram níveis elevados de IL-13 associados à doença, com um agrupamento médio de 0,70 ng/ml ($p = 0,00001$) e (IC 95%: -0,42 a -0,99, $p = 0,60$), em comparação com controles saudáveis.

Parece evidente o envolvimento da IL-13 na ES. A IL-13 é secretada pela ativação de células T e mastócitos na ES, e está certamente envolvida na patogênese das doenças autoimunes (SPADARO, et al., 2002). O efeito regulatório, incluindo modulador do processo inflamatório está bem estabelecido nos estudos. A capacidade de exercer efeito pró-fibrótico e de induzir desregulação significativa na homeostase do colágeno em locais de inflamação, auxiliando no aumento da secreção de várias citocinas inflamatórias, bem como de moléculas de adesão, parece bem reconhecida. Por outro lado, os efeitos na proliferação endotelial, conforme evidenciado pela atividade na microvasculatura, estão bem estudados (RICCIERI, et al., 2003). Nossos resultados na avaliação dessa citocina mostram níveis elevados da ES, comprovando seu envolvimento nesta doença e que sugeri que a IL-13 pode ser indicada como um biomarcador.



Figura 1: Extração de dados e risco de viés dos níveis séricos da IL-13 na ES. Fonte: próprio autor (2020).



4 CONCLUSAO

Nossos estudos confirmaram a elevação do nível sérico dos pacientes ES nos estudos trazidos para estarevisão, apontando para seu possível envolvimento nesta doença autoimune. Correlações desses achados com a progressão da doença, sugerem esta citocina como um possível biomarcador.



REFERÊNCIAS

RICCIERI, V., RINALDI, T., SPADARO, A., SCRIVO, R., CECCARELLI, F., DI FRANCO, M.,

VALESINI, G. Interleukin-13 in systemic sclerosis: relationship to nailfold capillaroscopy abnormalities. **MClinical rheumatology**, v. 22, n. 2, p. 102-106, 2003.

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**, v. 27, n. 2, p. 140-146, 2001.

SPADARO A, RINALDI T, RICCIERI V, TACCARI E, VALESINI G. Interleukin-13 in autoimmune rheumatic diseases: relationship with the autoantibody profile. **Clin Exp Rheumatol**. v. 20, p. 2, p. 213-6, 2002.

VETTORI, S., CUOMO, G., IUDICI, M., D'ABROSCA, V., GIACCO, V., BARRA, G., VALENTINI, G.

Early systemic sclerosis: serum profiling of factors involved in endothelial, T-cell, and fibroblast interplay is marked by elevated interleukin-33 levels. **Journal of clinical immunology**, v. 34, n. 6, p. 663-668, 2014.

SLOBODIN G, AHMAD MS, ROSNER I, PERI R, ROZENBAUM M, KESSEL A, TOUBI E, ODEH M: Regulatory T cells (CD4(+) CD25(bright)FoxP3(+)) expansion in systemic sclerosis correlates with disease activity and severity. **Cell Immunol** 2010, 261(2):77-80.

DEFRANCE T, VANBERVLIET B, BRIERE F, DURAND I, ROUSSET F, BANCHEAU I:

Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. **J Exp Med** 1992; 175: 671-82

ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP/UFPE)

UFPE - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PERNAMBUCO -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE DO USO DA SINVASTATINA EM PACIENTES COM ESCLEROSE SISTÊMICA: UM ENSAIO CLÍNICO PRAGMÁTICO

Pesquisador: LILIAN DAVID DE AZEVEDO VALADARES

Área Temática: Equipamentos e dispositivos terapêuticos, novos ou não registrados no País;

Versão: 1

CAAE: 00219118.9.0000.8807

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas

Patrocinador Principal: SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.004.915

Apresentação do Projeto:

O presente projeto intitulado "Avaliação da efetividade do uso da sinvastatina em pacientes com esclerose sistêmica: Um ensaio clínico pragmático" e tema "Pesquisa Translacional: básica/fundamental à Clínica/Aplicada - novas abordagens terapêuticas para o tratamento de pacientes portadores de Esclerose Sistêmica", trata-se de um projeto de pesquisa apresentado ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da doutoranda Lilian David de Azevedo Valadares e orientadora Profa. Angela Luzia Branco Pinto Duarte e co-orientadora prof^o Andréa Tavares Dantas.

Objetivo da Pesquisa:

Geral: Investigar a atividade imunomoduladora de estatinas em níveis séricos e em células mononucleadas do sangue periférico de pacientes com Esclerose Sistêmica.

Específicos: Avaliar resposta das citocinas em níveis séricos e sobrenadantes de PBMC antes do início do tratamento e após um período de 180 dias de terapia; Avaliar a resposta das citocinas em níveis séricos e sobrenadantes de PBMC após a suspensão da estatina e do placebo (no D180) por um período de mais 30 dias (D210) e 60 dias (D360).

Endereço: Av. Professor Moraes Rego, S/N, 3º andar do prédio principal (enfermarias)

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.670-901

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-3743

E-mail: cephufpe@gmail.com

**UFPE - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PERNAMBUCO -**



Continuação do Parecer: 3.004.915

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Existe o risco de constrangimento, ocasionado pela entrevista ou pela espera para realização dos procedimentos da pesquisa. Para minimizar estes riscos o paciente será atendido em uma sala fechada, com ar-condicionado, com a presença apenas do pesquisador que irá realizar a entrevista, e seu atendimento e coleta de sangue serão priorizados. A coleta de sangue periférico será realizada em veia do antebraço com agulha e seringa estéreis e há risco de hematoma ou sangramento local inerente à coleta. O procedimento será realizado por profissional treinado para minimizar qualquer complicação. O paciente será orientado sobre como proceder no caso de complicação relacionada ao procedimento.

Há ainda a possibilidade de extravio de algum documento ou quebra do sigilo dos mesmos. Porém, o pesquisador assina termo de compromisso e confidencialidade assumindo a responsabilidade de manusear devidamente os arquivos e manter o sigilo dos dados (vide documento assinado anexado na presente pesquisa).

Benefícios: Como benefício os pacientes serão submetidos a uma avaliação clínica e acompanhamento no ambulatório de especialidade médica indicada. Além dos benefícios imediatos, destaca-se que esta pesquisa, a longo prazo, pode apontar possíveis novos tratamentos para a esclerose sistêmica.

Durante o estudo o paciente continuará em seguimento normal no ambulatório de esclerose sistêmica do serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas de Pernambuco (HC-PE) e terá plena liberdade de recusar a participar ou retirar o seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer forma de penalização ou prejuízo ao seu tratamento no HC-PE.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O presente estudo será tem desenho de ensaio clínico pragmático randomizado, aberto, do tipo cross-over, por um período de 2 anos. Serão utilizadas amostras de material biológico (sangue periférico) de pacientes do ambulatório de Esclerose Sistêmica do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFPE que atendam aos critérios de inclusão descritos neste projeto. Os testes laboratoriais serão realizados no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas-LINAT/UFPE.

Serão selecionados 40 pacientes recrutados do ambulatório de esclerose sistêmica do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFPE, que serão subdivididos em dois grupos, onde o grupo 01(G1) será composto por 20 pacientes com níveis normais de colesterol sérico utilizando

Endereço: Av. Professor Moraes Rego, S/N, 3º andar do prédio principal (enfermarias)

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.670-901

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-3743

E-mail: cephufpe@gmail.com

UFPE - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PERNAMBUCO -



Continuação do Parecer: 3.004.915

Sinvastatina 20mg, e o grupo 02 (G2) 20 pacientes com níveis normais de colesterol sérico utilizando placebo. O nível de colesterol sérico dos pacientes será acessado nos exames laboratoriais de rotina solicitados no atendimento dos pacientes. Todos os pacientes serão portadores de esclerose sistêmica, e o tempo de tratamento será de 360 dias.

Critérios de inclusão: Diagnóstico de ES de acordo com o Colégio Americano de Reumatologia [21]; Idade entre 18 e 70 anos de idade; Níveis séricos de colesterol total 200 mg / dl; Consentimento por escrito para participar do estudo.

Critérios de exclusão: Gestantes, intolerância ou alergia à estatinas ou seus derivados, estar em uso de estatina ou ter feito uso há menos de 30 dias, diabetes mellitus, insuficiência cardíaca, insuficiência renal, hipertensão arterial, miopatias, hipotireoidismo e tabagismo

Coleta de sangue e cultura de células mononucleadas de sangue periférico: Serão coletados 15ml de sangue em cada coleta em tubo contendo o anticoagulante heparina e 4ml de sangue em tubo a seco com gel. Serão realizadas cinco coletas, a primeira no dia D0 na consulta inicial, a segunda com intervalo de 90 dias na segunda consulta (D90), a outra com mais 90 dias na terceira consulta (D180), em seguida, a quarta coleta com mais 90 dias entre na quarta consulta (D270), e por fim a última coleta mais 90 dias depois, na quinta e última consulta clínica (D360). As coletas serão feitas por profissionais competentes e devidamente treinados, a fim de reduzir ou impedir os riscos para o paciente. Nenhuma coleta será realizada sem a autorização prévia dos voluntários. Para isso, membros da equipe apresentarão aos pacientes os objetivos do estudo e o interesse da sua participação.

As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) serão isoladas a partir do sangue de doadores por centrifugação com Ficoll Paque™ Plus (GE Healthcare Bio-Sciences). As PBMCs isoladas serão cultivadas (106 células/1000 µL) 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). Estas células serão cultivadas em estufa de CO₂ 5% a 37°C. As PBMCs serão estimuladas com anti-CD3 e anti-CD28. Os sobrenadantes das culturas serão coletados após 48 horas para análise das citocinas por ELISA/CBA.

Determinação de citocinas: As dosagens das citocinas presentes no sobrenadante das culturas serão 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-6 (BD Biosciences), IL-17A e F (R&D Systems), INF gama (CBA), e CCL2.

Procedimentos operacionais: Inclusão e avaliação inicial: Serão convidados a participar deste

Endereço: Av. Professor Moraes Rego, S/N, 3º andar do prédio principal (enfermarias)

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.670-901

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-3743

E-mail: cephufpe@gmail.com

UFPE - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PERNAMBUCO -



Continuação do Parecer: 3.004.915

estudo os pacientes atendidos no Serviço de Reumatologia do HC/UFPE que preencham os critérios de inclusão e exclusão, durante seu atendimento habitual agendado no ambulatório. Caso aceite participar, será realizada a leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Em seguida, será realizada a avaliação clínica do paciente, com preenchimento da ficha criada especificamente para este estudo, contendo as variáveis de interesse. Também serão entregues os diários de tomada da medicação, para registro de uso tanto da medicação em estudo quanto de AINEs e analgésicos.

Após os procedimentos iniciais descritos, será realizada a coleta do sangue em veia periférica, conforme já elucidado acima.

Randomização: Após a avaliação clínica inicial, será realizada a randomização dos pacientes com nível normal(até 200mg/dl) de colesterol para alocação nos grupos que receberão a Sinvastatina (G1) e o placebo (G2). A tabela com números aleatórios será gerada através de um programa de computador, o Research Randomizer (Social Psychology Network, <http://www.randomizer.org/>). A cada paciente incluído será atribuído um número previamente sorteado, e será entregue um envelope fechado identificado por este número onde estará inserida a informação sobre o grupo que ele fará parte. Esse envelope só será aberto pelo avaliador não cego, responsável por fornecer a medicação ao paciente. Os demais avaliadores serão cegos, para o grupo o qual o paciente faz parte.

Os pacientes serão avaliados no primeiro dia (D0), com 90 dias (D90), com 180 dias (D180), com 270 dias (D270) e com 360 dias (D360), através de uma consulta presencial, com o objetivo de verificar possíveis eventos adversos, resposta clínica, verificação do diário de tomada da medicação. A coleta de sangue será realizada no D0, no D90, no D180, no D270 e no D360. Na consulta do D180, os pacientes do G1 que usaram a Sinvastatina, a medicação será suspensa, e será substituída pelo placebo até o fim do estudo(D360). Os pacientes do G2 que usaram placebo, no D180, esse será substituído pela Sinvastatina até o final do estudo (D360). Haverá um único avaliador não cego. No caso do paciente apresentar eventos adversos em qualquer uma das avaliações, este será excluído do estudo. Uma vez seja observada uma falta de aderência inferior a 70% do número de comprimidos que deveriam ter sido utilizados, o paciente também será excluído do estudo. Também serão excluídos os pacientes que, por qualquer motivo, tiverem que interromper o seu tratamento com a Sinvastatina.

ANÁLISE DOS RESULTADOS: Será criado um banco de dados em uma planilha programa Excel 2016, para entrada das variáveis. Na primeira fase será realizada análise descritiva dos resultados, utilizando-se a frequência absoluta e relativa das variáveis categóricas e a média (com desvio

Endereço: Av. Professor Moraes Rego, S/N, 3º andar do prédio principal (enfermarias)

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.670-901

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-3743

E-mail: cephcupe@gmail.com

**UFPE - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PERNAMBUCO -**



Continuação do Parecer: 3.004.915

padrão) ou mediana (com intervalo interquartil) para as variáveis contínuas. As possíveis associações serão testadas através do teste Qui-quadrado ou teste de Fisher (amostras muito pequenas); correlações serão verificadas através do teste de Spearman ou Pearson.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados

Recomendações:

Deve-se apresentar como será efetivada a participação do patrocinador principal que está citado na folha de rosto assinada pela Sociedade Brasileira de Reumatologia de São Paulo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma

Considerações Finais a critério do CEP:

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio da Notificação com o 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 HC/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 HC/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

Endereço: Av. Professor Moraes Rego, S/N, 3º andar do prédio principal (enfermarias)

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.670-901

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-3743

E-mail: cephufpe@gmail.com

**UFPE - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PERNAMBUCO -**



Continuação do Parecer: 3.004.915

Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1227991.pdf	04/10/2018 10:56:34		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DocsameLilian.pdf	04/10/2018 10:55:55	LILIAN DAVID DE AZEVEDO VALADARES	Aceito
Folha de Rosto	plataformabrasil.pdf	04/10/2018 10:26:28	LILIAN DAVID DE AZEVEDO VALADARES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	curriculo_Lilian.pdf	28/09/2018 08:37:23	LILIAN DAVID DE AZEVEDO VALADARES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao_matricula_ppgit.pdf	28/09/2018 08:33:58	LILIAN DAVID DE AZEVEDO VALADARES	Aceito
Brochura Pesquisa	brochura_de_pesquisa_Lilian.docx	28/09/2018 08:30:34	LILIAN DAVID DE AZEVEDO VALADARES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_pesquisadora.docx	28/09/2018 08:29:59	LILIAN DAVID DE AZEVEDO VALADARES	Aceito
Parecer Anterior	autorizacao_dados.pdf	28/09/2018 07:55:11	LILIAN DAVID DE AZEVEDO VALADARES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	curriculo_eudes.pdf	28/09/2018 07:54:18	LILIAN DAVID DE AZEVEDO VALADARES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	curriculo_prof_Moacyr.pdf	28/09/2018 07:52:40	LILIAN DAVID DE AZEVEDO VALADARES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	curriculo_Rafaela.pdf	28/09/2018 07:52:14	LILIAN DAVID DE AZEVEDO VALADARES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	curriculo_Anderson_Rodrigues.pdf	28/09/2018 07:48:06	LILIAN DAVID DE AZEVEDO VALADARES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	curriculo_profa_Andrea.pdf	28/09/2018 07:47:18	LILIAN DAVID DE AZEVEDO VALADARES	Aceito
Declaração de	curriculo_profa_Michelly_Cristiny.pdf	28/09/2018	LILIAN DAVID DE	Aceito

Endereço: Av. Professor Moraes Rego, S/N, 3º andar do prédio principal (enfermarias)

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.670-901

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-3743

E-mail: cephcufpe@gmail.com

**UFPE - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PERNAMBUCO -**



Continuação do Parecer: 3.004.915

Pesquisadores	curriculo_profa_Michelly_Cristiny.pdf	07:41:55	AZEVEDO VALADARES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	curriculo_profa_Maira.pdf	28/09/2018 07:41:38	LILIAN DAVID DE AZEVEDO VALADARES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Curriculo_prof_Ivan.pdf	28/09/2018 07:41:15	LILIAN DAVID DE AZEVEDO VALADARES	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	28/09/2018 07:34:19	LILIAN DAVID DE AZEVEDO VALADARES	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	28/09/2018 01:06:53	LILIAN DAVID DE AZEVEDO VALADARES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Curriculo_profa_Angela.pdf	28/09/2018 00:54:46	LILIAN DAVID DE AZEVEDO VALADARES	Aceito
Declaração do Patrocinador	FOLHADEROST2PPGITpdf.pdf	28/09/2018 00:52:48	LILIAN DAVID DE AZEVEDO VALADARES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CARTADEANUENCIAREUMATOpdf.pdf	28/09/2018 00:42:36	LILIAN DAVID DE AZEVEDO VALADARES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CARTADEANUENCIAPPGITpdf.pdf	28/09/2018 00:42:14	LILIAN DAVID DE AZEVEDO VALADARES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TcleimpossibilitadosdeassinarpacientesLilianfinalpdf.pdf	27/09/2018 18:38:51	LILIAN DAVID DE AZEVEDO VALADARES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEMaiores18PacientesLilianfinalpdf.pdf	27/09/2018 18:37:30	LILIAN DAVID DE AZEVEDO VALADARES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

Endereço: Av. Professor Moraes Rego, S/N, 3º andar do prédio principal (enfermarias)

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.670-901

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-3743

E-mail: cephufpe@gmail.com

UFPE - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PERNAMBUCO -



Continuação do Parecer: 3.004.915

RECIFE, 07 de Novembro de 2018

Assinado por:
José Ângelo Rizzo
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Professor Moraes Rego, S/N, 3º andar do prédio principal (enfermarias)
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.670-901
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-3743 **E-mail:** cephcupe@gmail.com