



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

Rafaela Silva Guimarães Gonçalves

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE MOLÉCULAS PRO E ANTIFIBRÓTICOS
EM BIÓPSIA CUTÂNEA DE PACIENTES PORTADORES DE ESCLEROSE
SISTÊMICA

Recife 2015

Rafaela Silva Guimarães Gonçalves

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE MOLÉCULAS PRO E ANTIFIBRÓTICOS
EM BIÓPSIA CUTÂNEA DE PACIENTES PORTADORES DE ESCLEROSE
SISTÊMICA

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Inovação
Terapêutica da Universidade Federal de
Pernambuco, para a obtenção do Título de
Mestre em Inovação Terapêutica**

Orientadora:

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

Co-orientadora:

Dra. Michelly Cristiny Pereira

Recife

2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Gonçalves, Rafaela Silva Guimarães

Avaliação da expressão gênica de moléculas pro e antifibróticos em biópsia cutânea de pacientes portadores de Esclerose Sistêmica / Rafaela Silva Guimarães Gonçalves- Recife: O Autor, 2015.

104 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Maira Galdino da Rocha Pitta

Coorientadora: Michelly Cristiny Pereira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Inovação Terapêutica, 2015.

Inclui referências, apêndices e anexos

- 1. Escleroderma sistêmico 2. Expressão gênica 3. Citocinas I. Pitta, Maira Galdino da Rocha (orientadora) II. Pereira, Michelly Cristiny (coorientadora) III. Título**

616.544

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-201

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Gonçalves, Rafaela Silva Guimarães

Título: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE MOLÉCULAS PRO E
ANTIFIBRÓTICOS EM BIÓPSIA CUTÂNEA DE PACIENTES PORTADORES DE
ESCLEROSE SISTÊMICA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para
obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica

Aprovada em: 26/02/2015

Banca Examinadora

Prof(a). Dr. Angela Luiza Branco Pinto Duarte

Instituição:

Assinatura: _____

—

Prof(a). Dr. César Augusto Souza de Andrade

Instituição:

Assinatura: _____

—

Prof(a). Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos

Instituição:

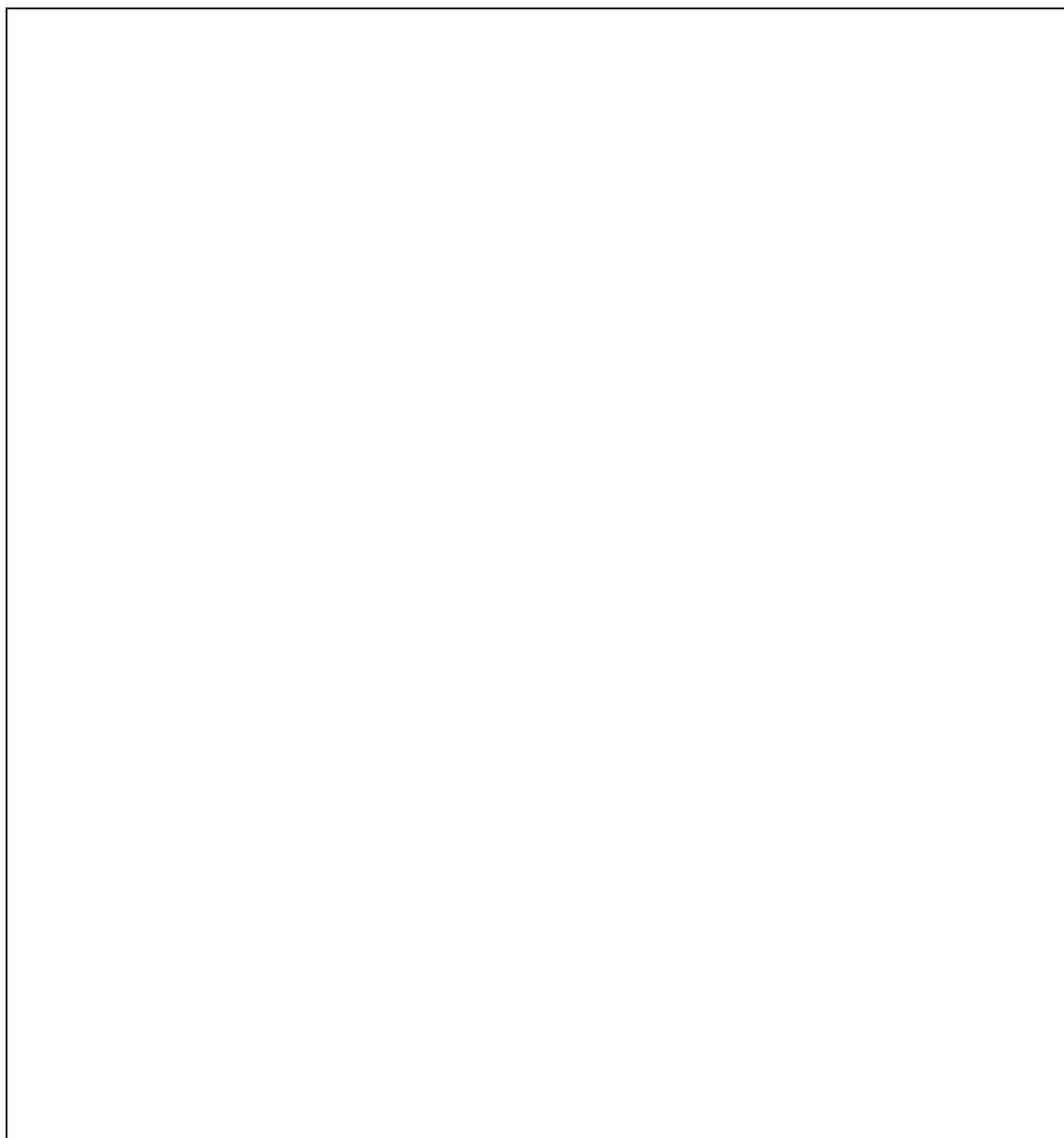
Assinatura: _____

—

Prof(a). Dr.

Instituição

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.



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

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR(A) PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR(A) DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profa. Dra. Maria Eduarda Lacerda de Larrazábal da Silva

VICE- DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profa. Dra. Oliane Maria Correia Magalhães

**COORDENADOR(A) DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade

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

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos pacientes portadores de Esclerose Sistêmica.

AGRADECIMENTOS

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

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

Kamila agradeço seu companheirismo, tão importante nos momentos que precisei de apoio moral, em meio a tantos experimentos, sua simples presença apenas me incentivando foi essencial.

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

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

Duas pessoas merecem meu atencioso carinho e minha eterna gratidão. Foram minhas guias nesta empreitada desde o início, de formas diferentes mas com intensidades semelhantes, Michelly e Andréa: meu muito obrigada!

Agradeço de forma especial às minhas mentoras intelectuais, que influenciam meu intelecto desde muito antes deste projeto, aquelas mulheres que me incentivaram a chegar aqui, hoje: Dra Angela e Dra. Cláudia.

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

A morte de um filho?
É uma gravidez às avessas
Volta pra dentro da gente
Para uma gestação eterna
Aninha-se aos poucos buscando um espaço por isso dói o corpo
Por isso, o cansaço
E como numa gestação ao contrário a dor do parto é a da partida
De volta ao corpo pra acolhida
Reviravolta na sua vida
E já começa te chutando, tirando o sono
Mexendo os órgãos, lembrando ao dono que está presente,
Te bagunçando o pensamento
Te vazando de lágrimas e disparando o coração,
A morte de um filho é essa gravidez ao contrário
Mas com o tempo, vai desinchando
Até se transformar numa semente de amor
E que nunca mais sairá de dentro de ti.

(Bruno Gouveia)

RESUMO

Gonçalves, Rafaela Silva Guimaraes. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE MOLÉCULAS PRO E ANTIFIBRÓTICOS EM BIÓPSIA CUTÂNEA DE PACIENTES PORTADORES DE ESCLEROSE SISTÊMICA. 2015. 000f. Dissertação. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

A Esclerose Sistêmica (ES) é uma doença do tecido conjuntivo rara, complexa, multissistêmica, e sem tratamento específico. A doença é definida por três importantes pilares: comprometimento vascular, produção de auto-anticorpos e inflamação, e a fibrose. Esta última é considerada a via final comum, e caracteriza-se por deposição excessiva de matriz extracelular (MEC), provocando dano orgânico, e implica em alta morbi-mortalidade dos pacientes. Embora uma série de citocinas e quimiocinas tenham sido investigadas como possíveis mediadores da fibrose em ES, a correlação específica entre citocinas e envolvimento de órgãos não foram bem elucidados ainda, e uma característica do perfil de citocinas está longe de ser identificado. Esse estudo teve como objetivo estabelecer um perfil de expressão gênica de moléculas envolvidas na fibrose: TGF- β , PDGF, CTGF, CCL3, IL-6, IL-13, IL-7, IFN- γ , IL-17, IL-22, e RORC, e compará-los com controles saudáveis, correlaciona-los entre si, e relacionar com dados clínicos e de exames de imagem, de maneira a contribuir para um melhor conhecimento da doença. Foram avaliadas expressões relativas de mRNA em 14 biópsias de pele de pacientes com ES do Hospital das Clínicas de Pernambuco, e 5 controles saudáveis pareados por sexo e idade, através da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo-real (qRT-PCR) utilizando sondas TaqMan. Todos os pacientes cumpriram os critérios para a classificação de esclerose sistêmica segundo o Colégio Americano de Reumatologia (ACR). Foi observada maior expressão de CCL3, IL-13, IFN- γ e IL-7 na pele de pacientes com ES (respectivamente, $p = 0,0002$, $p = 0,0243$, $p = 0,0335$, $p = 0,0082$) quando comparado com controles saudáveis. Encontramos correlação positiva entre os níveis de expressão de CCL3 e IL-7 ($p = 0,0050$ $r = 0,7187$), além de correlação negativa entre a IL-7 e TGF- β ($p = 0,0136$ $r = -0,6527$), e do TGF- β com IFN γ ($p = 0.0001$; $r = -0.8637$). Obtivemos, também, a relação destas expressões com dados de exames de imagem e clínicos. O aumento da expressão relativa das citocinas IL-7, IFN- γ , CCL3 e IL-13 na biópsia de pele fibrótica da ES sugere que sejam importantes alvos terapêuticos, bem como a possibilidade de serem usados como biomarcadores da fibrose. Ratificamos, também, o potencial papel antifibrótico de IL-7 e IFN- γ . Além disso a correlação entre a IL-7 e CCL3 deve ser melhor elucidada na fisiopatologia da fibrose.

Palavras-chave: Esclerose Sistêmica. Perfil de Expressão gênica. Pele. Citocinas.

ABSTRACT

Gonçalves, Rafaela Silva Guimarães. EVALUATION OF PRO AND ANTIFIBROTIC MOLECULES GENE EXPRESSION IN SKIN'S BIOPSY OF PATIENTS WITH SYSTEMIC SCLEROSIS. 2015. 000f. Dissertation. University Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Systemic sclerosis (SSc) is a multisystemic, complex and rare disease of connective tissue, with high morbidity and mortality, and there is no specific treatment. The disease is characterized by three main principles: vascular disease, autoantibody production and inflammation, and fibrosis. The latter is regarded as the final common pathway, and is characterized by being a type of scar tissue secondary to excessive ECM deposition, and therefore the final result of inflammation or damage, and in turn leading to organ damage. The persistent activation of fibroblasts results in pathological fibrosis. Although a number of cytokines and chemokines have been investigated as potential mediators of fibrosis in ES, a characteristic cytokine profile is far from being identified. This study aimed to establish a gene expression profile of molecules involved in fibrosis: TGF- β , PDGF, CTGF, CCL3, IL-6, IL-13, IL-7, IFN- γ , IL-17, IL-22, and RORC and compare them with healthy controls, correlates them with each other and relate with clinical and imaging data. We evaluated the relative mRNA expression in 14 patients with SSc skin biopsies at the Clinical's Hospital of Pernambuco, and 5 healthy controls matched by sex and age, by the reaction in quantitative polymerase chain in real-time (qRT-PCR). We observed increased expression of CCL3, IL-13, IFN- γ and IL-7 in the skin of patients with SSc (respectively, $p = 0.0002$, $p = 0.0243$, $p = 0.0335$, $p = 0.0082$) compared with healthy controls. We found a positive correlation between the expression of CCL3 and IL-7 ($r = 0.0050$ $p = 0.7187$), and a negative correlation between IL-7 and TGF- β ($p = 0.0136$ $r = -0.6527$), and TGF- β with IFN γ ($p = 0.0001$, $r = -0.8637$). We also obtained the relationship of these expressions with imaging and clinical data. The increase expression of the cytokines IL-7, IFN- γ , IL-13 and CCL3 in the fibrotic skin's microenvironment of the SSc suggests important therapeutic targets, as well the possibility to be used as biomarkers of fibrosis. Reaffirm also antifibrotic potential role of IL-7 and IFN- γ . Furthermore, the correlation between IL-7 and CCL3 needs further elucidated in the physiopathology of fibrosis.

Keywords: Systemic Sclerosis. Gene expression profile. Skin biopsy. Cytokines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fenômeno de Raynaud	24
Figura 2. Leucomelanodermia	27
Figura 3. Desenho esquemático do delineamento do estudo	45
Figura 1 do artigo. <i>The relative quantification of mRNA expression: IL-13, CCL3, IL-7 and IFNγ from skin's biopsies of SSc patients.</i>	58
Figura 2 do artigo. <i>Positive correlation between IL-7 and CCL3 relative mRNA expressions, $p < 0,005$. (B) Negative correlation between TGFβ and IFNγ, and (C) between TGFβ and IL-7 (respectively, $p < 0,0005$ and $p < 0,05$). Values of relative mRNA expression in a logarithmic scale were used.</i>	59
Figura 3 do artigo. <i>Relation between PDGF relative mRNA expression levels and presence of CT's changes</i>	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Moléculas de sinalização implicadas na patogênese da fibrose na Esclerose Sistêmica	33
Tabela 2. Características epidemiológicas dos pacientes com ES (n=14)	46
Tabela 1 do artigo. <i>Clinical parameters and image's data of SSc patients (n=14)</i>	58

LISTA DE ABREVIACES E SIGLAS

ALK 5	Receptor de linfoma anaplásico tirosina-quinase, do inglês: <i>anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase</i>
ACR	Colégio Americano de Reumatologia, do ingls: <i>American College Rheumatology</i>
CCL3	Quimiocina (C-C motif) ligante 3, do ingls: <i>chemokine (C-C motif) ligand 3</i>
CTGF/CCN2	Fator de crescimento do tecido conectivo, do ingls: <i>connective tissue growth factor</i>
cDNA	cido desoxirribonucleico complementar, do ingls: <i>deoxyribonucleic acid complementary</i>
DNase	Desoxirribonuclease do ingls: <i>deoxyribonuclease</i>
Erg	Vírus eritroblastose aviário, do inglês: <i>v-ets avian erythroblastosis virus</i>
ERK	Quinase MAP regular extracelular, do inglês: <i>extracellular regulated MAP kinase</i>
ET	Endotelina
ES	Esclerose Sistêmica
ESd	Esclerose Sistêmica difusa
ESI	Esclerose Sistêmica limitada
FAN	Fator Anti-Nuclear
Fry	Fenômeno de Raynaud
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HC	Hospital das Clínicas
HLA	Antígeno Leucocitário Humano do inglês: <i>Human leukocyte antigen</i>
IL	Interleucina
INF γ	Interferon gama
IRF5	Fator regulatório do interferon 5, do inglês: <i>interferon regulatory factor 5</i>

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

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

LISTA DE SÍMBOLOS

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

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. OBJETIVOS	21
2.1. Geral	21
2.2. Específicos	21
3. REVISÃO DE LITERATURA	22
3.1. Definição	22
3.2. Epidemiologia	22
3.3. Etiologia	22
3.4. Aspectos Clínicos e Critérios de Classificação	23
3.4.1. Sintomas precoces	25
3.4.2. Sintomas Vasculares	25
3.4.3. Aspectos Cutâneos	26
3.4.4. Envolvimento Gastrointestinal	27
3.4.5. Envolvimento Pulmonar	28
3.4.6. Envolvimento Cardíaco	28
3.4.7. Envolvimento Renal	28
3.4.8. Envolvimento musculoesquelético	29
3.5. Tratamento	29
3.6. Fibrose	29
3.6.1. TGF- β	34
3.6.2. CTGF	37
3.6.3. PDGF	37
3.6.4. CCL3/MIP1- α	39
3.6.5. IL-7	39
3.6.6. IFN γ	40
3.6.7. Th17: IL-22, IL-17, ROR γ c	41
3.6.8. IL-13	42
3.6.9. IL-6	43
4. METODOLOGIA	45

4.1. Recrutamento de pacientes portadores de Esclerose Sistêmica	46
4.2. Recrutamento de voluntários sadios	47
4.3. Biópsia de pele	47
4.4. Expressão gênica	47
4.4.1. Extração do RNA	47
4.4.2. Tratamento do RNA com <i>DNase I</i>	49
4.4.3. Síntese de cDNA	49
4.4.4. PCR em Tempo Real (qPCR)	50
4.5. Análise dos resultados	50
5. RESULTADOS	51
5.1. Artigo a ser submetido na <i>Clinical Rheumatology</i> : CCL3, IL-7, IL-13 and IFNγ are increased in skin's biopsy of Systemic Sclerosis	51
6. DISCUSSÃO	61
7. CONCLUSÃO	64
8. PERSPECTIVAS	65
REFERÊNCIAS	66
APÊNDICES	80
Apêndice 1. Desenho esquemático da interação das citocinas TGF β , IL-7, CCL3, IL-13 na fibrose da ES	80
Apêndice 2. Ficha Clínica nº 1	81
Apêndice 3. Ficha Clínica nº 2	89
Apêndice 4. TCLE de alfabetizados	94
Apêndice 5. TCLE de não alfabetizados	97
ANEXOS	100
Anexo 1. Critérios do <i>American Collage of Rheumatology</i> (ACR)	100
Anexo 2. Instruções para submissão do artigo na <i>Clinical Rheumatology</i>	101

1. Introdução

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

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

Várias citocinas e quimiocinas (TGF- β , PDGF, CTGF, IL-13, IL-6, IL-17, IL-22, RORc, CCL3) têm sido investigadas como possíveis mediadores da fibrose em ES, no entanto não há ainda uma caracterização do perfil de citocinas, e isto implica em dificuldade de se descobrir novos alvos terapêuticos, bem como de biomarcadores, o que por sua vez implica em escassez de terapias específicas para a doença.

Neste contexto, este trabalho quantificou a expressão de mRNA com potenciais pró (TGF- β , PDGF, CTGF, IL-13, IL-6, IL-17, IL-22, RORc, CCL3) e antifibróticos (IL-7, e IFN γ) em biópsia de pele do antebraço de 14 pacientes portadores de ES do Hospital das Clínicas de Pernambuco compando com controles saudáveis, além de correlacioná-las entre si, e relacionar com dados clínicos e de exames de imagem. A análise destas moléculas foi realizada através da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo-real (qRT-PCR) usando sondas TaqMan.

Desta maneira contribuimos com uma melhor compreensão da fisiopatologia da ES, auxiliando desta forma a descoberta de novos alvos terapêuticos.

2. Objetivos

2.1. Geral

Caracterização da expressão gênica de moléculas em biópsia da pele fibrótica do portador de Esclerose Sistêmica.

2.2. Específicos

- Quantificar a expressão relativa de mRNA de moléculas com potencial pro-fibrótico (TGF β , CTGF, PDGF, IL6, IL13, CCL3, IL-17, IL-22 e RORc), e aquelas com potencial antifibrótico (IFN γ e IL7).
- Correlacionar a expressão dos genes pró e antifibróticos entre si.
- Correlacionar o perfil de expressão gênica com os dados clínicos e de exames de imagem de pacientes com Esclerose Sistêmica.

3. Revisão de Literatura

3.1. Definição

Esclerose sistêmica é uma doença do tecido conectivo complexa, multissistêmica, rara, de patogênese pouco conhecida, que abrange três vertentes: (A) auto-imunidade, com ativação de linfócitos, produção de auto-anticorpos, liberação de citocinas e quimiocinas e alteração do sistema imune inato, (B) vasculopatia, caracterizada por disfunção da microvasculatura periférica e vasoespasmos, e (C) fibrose, que representa a via final comum, e é objeto deste estudo. A heterogeneidade clínica da doença reflete exatamente a contribuição relativa de cada um desses três mecanismos (1, 2). De uma forma resumida, o dano microvascular é responsável por estimular células do sistema imunológico a produzirem anticorpos, citocinas pró-inflamatórias e pró-fibróticas, além de quimiocinas. A fibrose é resultado da produção excessiva de colágeno por fibroblastos e miofibroblastos ativados, e seu consequente acúmulo na pele e órgãos internos (3).

3.2. Epidemiologia

A ES predomina no sexo feminino (4:1 a 6:1) (4). As razões para o predomínio no sexo feminino ainda não são bem explicadas. O pico de incidência ocorre dos 30 aos 50 anos de idade e sua incidência é de 3.7 a 22 casos/10⁶ pessoas/ano, variando em função da região geográfica e grupo étnico (5, 6). Afeta cerca de 250 pessoas por milhão de habitantes (7). Ainda não há dados nacionais sobre a prevalência da ES no Brasil. A taxa de sobrevida varia de 55,1% (8) a 76,8%, em dez anos (9).

Devido ao seu prognóstico reservado com taxas altas de morbimortalidade, torna-se uma doença de extrema importância, sendo considerada, a mais grave doença do tecido conjuntivo (10).

3.3. Etiologia

A etiologia ainda é desconhecida. No entanto, dados têm mostrado uma maior incidência de positividade para anticorpos contra parvovírus B19, citomegalovírus humano, *Helicobacter pylori*, vírus da hepatite B e toxoplasmose em pacientes com ES. Fatores ambientais, como sílica e cloreto de polivinila, são conhecidamente agentes passíveis de induzir fibrose. Doenças esclerodermia-*like*, como a síndrome do óleo tóxico após exposição

ao óleo de *colza*, a fascíte devido ao uso de L-triptofano e a fibrose nefrogênica após o uso do gadolínio, têm sido relatados (3).

Herança familiar também parece ter o seu papel etiológico, haja vista a ocorrência de ES em pacientes que tenham história familiar da doença (1,6%) em maior frequência que na população geral (0,026%). Parentes de primeiro grau de pacientes com ES têm maior incidência de doenças auto-imunes (11).

Estudos genéticos de associação sugerem relação da doença com o antígeno leucocitário humano (HLA) II no cromossomo 6. As mutações dos alelos particulares têm sido relacionados à suscetibilidade da doença e características clínicas, como os dos genes para o fator de crescimento de transformação beta (TGF- β), da proteína de monócitos-1 (MCP-1), da interleucina-1 *alfa* (IL-1 α), fator de necrose tumoral (TNF), do fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF), entre outros (12). Moléculas de superfície, por exemplo, CD45, CD19 (13, 14); fatores de transcrição, tais como STAT4 (*signal transducer and activator of transcription*) (15); bem como componentes de tecido conjuntivo como por exemplo, SPARC (*secreted protein, acidic, cysteine-rich*) e fibrilina (16, 17), também vêm sendo implicados.

3.4. Aspectos clínicos e critérios de classificação

A primeira descrição de esclerodermia foi realizada por Curzio em 1753, onde um indivíduo de 17 anos de idade apresentou tensão extensa e dureza da pele por todo o corpo (18). No entanto apenas em meados do século XIX, a ES foi reconhecida como entidade clínica.

Maurice Raynaud descreveu as mudanças tricolores do vasoespasma em 1865, e para tanto o fenômeno recebeu o seu nome: Fenômeno de Raynaud. Em 1883, Jonathan Hutchinson relatou um paciente com fenômeno de Raynaud e aspectos clínicos da esclerodermia (19).

Apenas em 1942, Klemperer, Pollack e Baehr, propuseram que a esclerodermia deveria ser considerada como “doença sistêmica do tecido conectivo” (20).

Na maioria dos casos a manifestação inicial é representada pelo Fenômeno de Raynaud (FRy) (figura 1), podendo este preceder em anos as demais manifestações clínicas. A manifestação mais característica, todavia, consiste no comprometimento cutâneo, caracterizado principalmente por um

endurecimento progressivo da pele (21).



Figura 1. Fênomeno de Raynaud (retirado: <http://www.sanar.org/files/sanar/fenomeno-de-raynaud.jpg>)

Alguns critérios de classificação para a doença foram propostos, e o do Colégio Americano de Reumatologia (anexo 1) é o que mais utilizamos para fins de pesquisa. O intuito dos critérios de classificação remete à distinção da ES de outras formas de doenças auto-imunes, como o lúpus eritematoso sistêmico (22).

No entanto, estes critérios não são capazes de distinguir a ES limitada (ESI) da ES difusa (ESd). Estas formas são clinicamente estabelecidas de acordo com a presença e extensão do envolvimento da pele (21). A forma limitada é definida pelo envolvimento distal dos cotovelos e joelhos, enquanto na forma difusa há envolvimento das regiões proximais das extremidades e/ou envolvimento do tórax e abdome. A face pode ser acometida em ambas as formas. Alguns pacientes podem no entanto, ter uma apresentação inicial na forma limitada, e durante 24 meses da apresentação da doença, apresentarem acometimento difuso; o estabelecimento da forma limitada da doença pode não ser confiável nos primeiros dois anos (21).

A importância desta classificação baseia-se na predição de prognóstico,

onde usualmente a presença, bem como a extensão, do envolvimento da pele estão relacionados diretamente com o envolvimento dos órgãos internos, e portanto, com sobrevida. Esta divisão por conseguinte não é isenta de falhas, pois o portador da doença difusa, por exemplo pode apresentar com o passar do tempo, afrouxamento da pele, bem como, por outro lado, pode apresentar forma limitada inicialmente, e depois evoluir para a forma difusa (21).

O perfil de auto-anticorpos pode ajudar na classificação do portador de ES. Quase todos os pacientes (85-90%) têm positividade para o Fator anti-nuclear (FAN) pela imunofluorescência indireta (23). Cerca de 60-70% serão positivos a pelo menos um dos 3 auto-anticorpos disponíveis comercialmente: anti-centrômero, anti-topoisomerase-I (anti-Scl-70) e anti-RNA polimerase III. Os subgrupos destes auto-anticorpos estão associados com padrões clínicos da doença, de forma geral. O anticorpo anti-centrômero tem sido implicado na ES limitada, com maior sobrevida quando comparado aos outros anticorpos, e menor risco de evoluir com doença pulmonar intersticial. Estes pacientes, todavia, têm maior risco de evoluir com hipertensão arterial pulmonar, e para tanto, não deve ser considerado como uma variante “benigna” da doença (23). Anticorpo anti-Scl-70 tem maior frequência de positividade na forma difusa da doença, mas também pode estar presente na forma limitada, e é relativamente de bom prognóstico para doença intersticial pulmonar severa (24).

3.4.1. Sintomas precoces

O sintoma mais precoce da doença costuma ser o FRy. As chamadas “puffy hands”, também costumam ser um sintoma precoce da doença, e usualmente tem relação com o desenvolvimento da forma difusa da doença. Outros sintomas precoces são mal-estar, artralgia e mialgia. Menos frequentemente, os pacientes podem ter sintomas viscerais antes do aparecimento do espessamento da pele, como sintomas relacionados ao trato gastrointestinal e sistema respiratório (25).

3.4.2. Sintomas vasculares

Fenômeno de Raynaud, por definição, é o vasoespasma nos dígitos que pode ser induzido pelo frio ou *stress*. Pode acometer outros locais como nariz, orelha e raramente na língua. Está presente em mais de 90% dos pacientes com ES, e aqueles pacientes que não o apresentam têm um pior prognóstico (26).

É característico por apresentar fases que perfazem três cores: palidez (branco), seguida de cianose (roxo/azul), e posteriormente o hiperemia reativa (vermelho). No entanto, nem sempre as três fases aparecem (26).

Em pacientes com ES limitada, o FRy tende preceder o aparecimento da esclerodermia ou da doença visceral. Já pacientes com a forma difusa apresentam o fenômeno simultaneamente ou logo após o aparecimento das mudanças da pele (25).

Esse fenômeno de vaso-espasmo implica complicações: cicatrizes digitais (*pitting scars*), mudanças isquêmicas fixas com perda de tecido (até amputação), úlceras digitais de difícil cicatrização, gangrena. Embora ainda controverso, há relato de vaso-espasmo induzido pelo frio em órgãos viscerais, como artérias coronárias, circulação renal, e até pulmões (25).

3.4.3. Aspectos cutâneos

São conhecidos três estágios de mudanças de pele que ocorrem em pacientes com ES. O estágio inicial é o inflamatório, edematoso, no qual as mãos se apresentam edemaciadas e com perda das dobras dos dedos. Há uma redução na produção de suor, resultando em pele seca. Esta fase edematosa pode durar meses e é durante esta fase que o endurecimento e espessamento da pele se desenvolve (27).

A fase inflamatória inicial pode ser acompanhada por prurido, que pode ser secundário a produção de mediadores pró-inflamatórios bem como de histaminas e bradicininas. Uma vez esta fase inflamatória cessada, uma longa fase fibrosante pode se iniciar. Usualmente inicia-se pelas extremidades, distal às articulações metacarpofalangeanas e podem progredir proximalmente (28).

Na região perioral há uma modificação na pele bem característica da doença, que leva a redução da abertura oral, bem como a retração da pele, deixando os dentes em maior evidência. Retração da gengiva também ocorre devido tanto a fibrose, como atrofia da mandíbula (29).

Alterações na pigmentação da pele, chamadas leucomelanodermia, ocorrem tanto na fase inflamatória/edematosa como na fibrose progressiva. Dependendo da tonalidade da pele da paciente, pode aparecer hipopigmentação ou hiperpigmentação. Alguns pacientes apresentam despigmentação, particularmente no escalpo, tórax, e dorso superior, além de regiões submetidas a pressão, como dorso das mãos e região pré-tibial.

Resulta, então, num aspecto conhecido como em “sal e pimenta” (27) (figura 2).



Figura 2. Leucomelanoderma – retirado de : <http://www.artroimagen.com/cards/view/1376>

Após a fase de fibrose progressiva em pacientes com acometimento cutâneo difuso há uma fase final de suavização da pele, e este estágio tipicamente se inicia após dois anos de início das mudanças na pele (27).

O *modified Rodnan Skin Score* (mRSS) é um método para graduar o espessamento de pele, e é validado para uso em ensaios clínicos, com baixa variabilidade interobservador. Há 17 áreas a serem avaliadas, e em cada área é dado um valor de 0 a 3, onde o “0” representa pele normal e “3” representa a pele tensa, bem aderida (30).

Outras modificações da pele incluem telangiectasia e calcinose. Telangiectasias são capilares dilatados, mais comumente encontrado na face, membrana mucosa, tórax e mãos. Calcinose subcutânea ocorrem em ambas as formas limitada e difusa, no entanto é mais comum na doença limitada. O depósito subcutâneo é composto por hidroxapatita de cálcio, e tende a aparecer em superfícies extensoras, e locais que sofrem maior pressão (25).

3.4.4. Envolvimento gastrointestinal

Envolvimento muito comum nos portadores da ES, e geralmente é o primeiro sintoma que não o fenômeno de Raynaud. Pode acometer todo o trato gastrointestinal, e mesmo na ausência de sintomas, há alterações de mobilidade ou de teste funcional (31).

Tanto a fibrose, com atrofia da musculatura lisa têm um papel na

dismotilidade gastrointestinal. Não há predileção de acometimento para pacientes com envolvimento de pele difuso ou limitado, mas interfere na qualidade de vida do paciente (31).

3.4.5. Envolvimento pulmonar

Doença pulmonar pode ser dividida em 2 grandes grupos: doença pulmonar intersticial e/ou hipertensão arterial pulmonar. A doença pulmonar intersticial tende a ser mais comum na ESd, mas pode ocorrer em ambas. Aproximadamente 80% dos pacientes com ES evidenciarão fibrose pulmonar, embora a evidência clínica só apareça em 40% dos pacientes (32, 33).

A presença do anticorpo anti-topoisomerase I (anti-Scl-70) está associada com o aumento no risco de envolvimento difuso da pele e fibrose pulmonar (34). No entanto, a presença do anticorpo anti-centrômero ou do anti-RNA polimerase III está associado com a redução do risco de desenvolver doença pulmonar intersticial (34).

Doença vascular pulmonar pode ocorrer tanto em forma primária, como secundária à doença cardíaca de base ou a doença intersticial pulmonar. Hipertensão pulmonar isolada tende a ocorrer em maior frequência nos pacientes com a forma limitada da doença. Tem um forte impacto na taxa de mortalidade destes pacientes (35).

3.4.6. Envolvimento cardíaco

Costuma aparecer de forma variável, e seu achado em avaliações *post-mortem* é muito comum, mesmo em pacientes sem evidência clínica (32).

Pode se manifestar como doença do pericárdio, disfunção sistólica do ventrículo direito ou esquerdo, insuficiência cardíaca, fibrose do miocárdio causando alterações de condução, arritmias, disfunção diastólica, doença arterial aterosclerótica coronária (36).

3.4.7. Envolvimento renal

A crise renal esclerodérmica é uma manifestação vascular importante da ES. Estima-se que 10% dos pacientes com ES irão desenvolver esta crise renal. Esta enfermidade só ocorre em pacientes com a forma difusa e geralmente nos primeiros 3 anos de doença. Classicamente o paciente apresenta-se com hipertensão arterial de início recente (37, 38).

Mais de um terço dos pacientes com a crise renal esclerodérmica necessitam de terapia hemodialítica, no entanto muitos pacientes conseguem, após um certo período que varia em torno de dois anos, não requerer mais o uso da hemodiálise (37).

Por ser caracterizada por um processo microangiopático, inclui alguns aspectos característicos como anemia com presença de esquizócitos, trombocitopenia, insuficiência renal, proteinúria e alterações no sumário de urina com presença de cilindros celulares (39).

O tratamento baseia-se essencialmente no uso de inibidores da enzima conversora de angiotensina, além do suporte terapêutico das manifestações clínicas (38).

3.4.8. Envolvimento músculo-esquelético

Artralgia e mialgia são sintomas bastante comuns na ES, e algumas vezes podem desenvolver artropatias inflamatórias e/ou miopatias. As próprias mudanças fibróticas na pele também podem resultar em contraturas em flexão causando bastante incapacidade. Fraqueza muscular e fadiga também são sintomas proeminentes (40).

3.5. Tratamento

O tratamento da ES é determinado pela extensão e gravidade das manifestações clínicas. Até o momento, a maioria das terapias disponíveis baseia-se no alívio sintomático, havendo poucas opções consideradas eficazes. Embora a inflamação seja uma das características da doença precoce, sua inter-relação com a fibrose ainda não está definida e terapias anti-inflamatórias tem se mostrado ineficazes (41). O desenvolvimento de efetivas terapias antifibróticas é alvo de alguns estudos (3, 42-44), porém, até o momento, não há nenhum fármaco aprovado para esse fim no tratamento da ES. Estudos que visam a uma melhor compreensão da fisiopatologia da doença auxiliam na descoberta de novos alvos terapêuticos.

3.6. Fibrose

As doenças fibróticas podem ser atribuídas a uma variedade de causas, mas de uma forma geral, o processo de fibrose tem como início uma injúria tissular que ativa processos de reparação que visam restaurar a arquitetura do tecido original. A falta de ajuste fino deste processo de reparo leva à ativação persistente dos fibroblastos, e consequente destruição dos tecidos (45). Uma

característica da pele lesionada é o infiltrado perivascular de linfócitos T e macrófagos, e se correlaciona com o grau e progressão do espessamento da pele (46). Uma importante questão que vem sendo sustentada sobre a fibrose é o fato de que a ativação persistente, patológica, de vias de sinalização necessárias para o desenvolvimento embrionário normal pode conduzir a cicatrização anormal de feridas e reparação de tecidos (45). Outra questão diz respeito ao fato de que não somente há um acúmulo excessivo de proteínas da matriz extracelular, como também, há alteração na composição e modificação pós-traducional destas proteínas (47).

Fibroblastos ativados são a principal fonte de produção de proteínas da matriz extracelular (3). No processo de inflamação ocorre um infiltrado perivascular, principalmente de leucócitos (células T ativadas, monócitos, mas também, fibroblastos), que estão presentes na fase precoce da doença, liberando mediadores pró-fibróticos que estimulam a produção excessiva de proteínas da matriz extracelular, culminando no processo já supracitado (44, 48). No entanto, em fases mais avançadas da doença, as biópsias revelam um tecido conjuntivo bastante hipocelular (47). Embora, tanto a população de células T CD4⁺ como as de T CD8⁺ sejam encontradas na pele de pacientes com ES, a subpopulação majoritária é de células T CD4⁺ (49).

Num tecido saudável sem lesão, os fibroblastos encontram-se circundados por matriz extracelular (MEC) (50). Quando há dano neste tecido, os fibroblastos não possuem mais esta capa protetora, e começam a tentar compensá-la, produzindo excessivos anexos da matriz. Os miofibroblastos são caracterizados por expressar proteínas altamente contráteis, como a *alpha*-actina de músculo liso (α -SMA) que está organizada em fibras ligadas a MEC, produzindo e remodelando nova MEC (50, 51).

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

Embora os miofibroblastos desapareçam quando o tecido conjuntivo é recém-formado durante a reparação normal, podem persistir no tecido conjuntivo fibrótico, e são considerados como sendo a célula efetora final em todas as condições fibróticas, incluindo na ES (52).

Algumas pesquisas que objetivaram identificar as diferenças na

expressão de mRNA em amostras de pele de ES clinicamente afetadas e não afetadas evidenciam diferenças, bem como as análises histológica e fenotípica que mostraram abundância de miofibroblastos nas áreas afetadas clinicamente. Os fibroblastos encontrados nestas áreas clinicamente afetadas apresentam adesão elevada e maior contratilidade da MEC. Em contrapartida, fibroblastos de pele de pessoas saudáveis são iguais aos de pele de ES não afetadas clinicamente (52-54). Como justificar a diferença entre áreas de pele de uma mesma pessoa portadora de ES, ainda é um pouco controverso, mas postula-se que os miofibroblastos surgiriam pela diferenciação dos próprios fibroblastos residentes no local em virtude de determinadas citocinas, ou até mesmo pelo recrutamento de células advindas de outras regiões ricas em α -SMA (principalmente advindas da vasculatura) (55, 56). O fato do TGF- β , uma das principais moléculas envolvidas na fibrose, ter capacidade de ativar Smad1 através ALK1/endoglin (uma via que normalmente é considerada como própria do sistema vascular), corrobora para a postulação de que os miofibroblastos, na fibrose, podem ter origem de pericitos microvasculares (54, 55, 57).

Fibroblastos de pacientes com esclerodermia, obtidos de pele ou pulmão, expressam um fenótipo miofibroblasto-*like* ativado. Sob condições isquêmicas, células endoteliais podem perder a adesão célula-célula e se transformarem em células mesenquimais ou miofibroblastos produtores de colágeno. As células epiteliais esclerodérmicas estimulam fibroblastos normais a expressarem CTGF, IL-1 α , ET-1 e TGF- β (7). A injúria epitelial tem um papel importante na doença pulmonar intersticial da ES (58).

Do ponto de vista clínico a hipóxia vem apresentando relevância importante na fisiopatologia da ES. As vias de sinalização celular, todavia, pela qual a hipóxia induziria a doença, foram caracterizadas recentemente (59, 60). Um dos efeitos mais proeminentes da hipóxia ocorre sobre a vasculogênese. E, durante este processo, as células-tronco originárias da medula óssea parecem ser encaminhadas para o tecido conectivo de órgãos afetados e contribuem para a fisiopatologia fibrótica (61).

Nos fibroblastos, a hipóxia induz síntese de um número de proteínas da MEC envolvidas na remodelação, por exemplo, trombospondina-1,

fibronectina-1, TGF β , CTGF (62, 63). A hipoxia parece também aumentar a resposta do fator de crescimento para o PDGF (*platelet-derived growth factor*), aumentando a fosforilação do respectivo receptor. A indução de transição epitélio-mesenquimal, um conceito recém conhecido para a patogênese da fibrose no pulmão e rim, também foi diretamente ligada à hipóxia (64). Sugere-se, desta forma, que a hipóxia tem um papel central na alteração da composição do MEC, e de manutenção do círculo vicioso do processo fibrótico (47).

A fibrose, portanto, é induzida por múltiplos mediadores, e algumas moléculas exemplificam o fato, como TGF- β 1, PDGF, VEGF (*vascular endothelial growth factor*), ET-1(endotelina), IL-13 (interleucina), IL-21, IL-6, CTGF, MCP-1, proteína inflamatória de macrófago, receptores de proliferação ativada de peroxissomas, proteínas séricas de fase aguda, caspases e sistema renina-angiotensina-aldosterona. O desbalanço entre níveis de metaloproteinases e inibidor tecidual de metaloproteinases implica em síntese excessiva de matriz extracelular, redução do catabolismo extracelular, resultando no acúmulo de colágeno (3).

Citocinas da via Th1 e Th2 têm sido implicadas na patogênese da ES. Células Th1 parecem inibir a deposição de colágeno e aumentar a produção de metaloproteinases, através da liberação de IFN γ (interferon gama) ou pelo contato direto com fibroblastos e, dessa forma, teriam efeito antifibrótico. Tem sido demonstrado, por exemplo, que o IFN γ inibe a síntese de pró-colágeno por fibroblastos (65). Por outro lado, as células Th2 estimulam a produção de colágeno e inibem metaloproteinases da matriz a partir da liberação de IL-4 e IL-13, apresentando propriedades profibróticas e pro-angiogênicas (Tabela 1) (66). Interessantemente, os níveis de citocinas Th2 tendem a diminuir à medida que a esclerose cutânea regride e um estudo sugere que um desvio da resposta Th2 para Th1 se correlaciona com a melhora da fibrose cutânea na ES (66, 67). Citocinas Th2 incluindo IL-4, IL-5, IL-13 e IL-21 contribuem, juntamente com o TGF- β , para indução de fibrose. A IL-13 possui um importante papel na produção de TGF- β 1 em macrófagos e estimula a ativação de TGF- β 1, através de metaloproteinases de matriz e as vias proteolíticas à base de catepsina (66).

Outros estudos mostram que a $\text{INF-}\gamma$ e IL-7 têm propriedades anti-fibróticas (66, 68). IL-7 compartilha uma relação de antagonismo com o TGF- β , na qual o TGF- β reduz a produção de IL-7 pelas células estromais como o inverso é verdadeiro. Embora o mecanismo e as implicações dessa relação ainda não estejam bem elucidados, parece haver um importante nível de regulação imune (69).

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

Molécula	Origem	Função em fibroblastos normais	Evidências de participação na Esclerose Sistêmica
TGF-β ⁽⁷⁰⁾	Linfócitos T, plaquetas, fibroblastos, miofibroblastos, monócitos/macrófagos, células endoteliais	↑ proliferação e quimiotaxia de fibroblastos ↑ síntese de colágeno, fibronectina, proteoglicanos, elastina, TIMP ↓ síntese de metaloproteinases ↓ síntese e atividade de $\text{INF-}\gamma$ ↑ produção de ET-1 - Indução de CTGF - Promove transição epitelial-mesenquimal e transdiferenciação de fibroblastos - Inibe apoptose de fibroblastos	- Níveis elevados de receptores de TGF-β em fibroblastos de ES; - Evidências de desregulação das vias de sinalização (Smad e não-Smad) do TGF-β em fibroblastos de ES.
PDGF ⁽⁷¹⁻⁷³⁾	Plaquetas, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais	↑ quimiotaxia e proliferação de fibroblastos ↑ síntese de colágeno, fibronectina, proteoglicanos ↑ secreção de TGF-β, MCP-1, IL-6	- Fibroblastos na ES apresentam expressão elevada de PDGF e seu receptor; - Níveis elevados de PDGF no lavado broncoalveolar de pacientes com ES; - Identificação de Ac anti-receptor PDGF no soro de pacientes com ES.
CTGF/CCN2 ⁽⁷⁴⁻⁷⁶⁾	Fibroblastos	- Age como cofator, aumentando a resposta ao TGF-β ↑ quimiotaxia de fibroblastos ↑ proliferação de fibroblastos ↑ síntese de colágeno e fibronectina	- Expressão aumentada na pele de pacientes com ES e em modelos animais; - Correlação com extensão da fibrose cutânea e pulmonar.
CCL3/MIP1α ^(49, 77)	Macrófagos, células epiteliais, linfócitos T e B ativados	Recruta monócitos, linfócitos T e B, eosinófilos e basófilos	Níveis séricos aumentados em pacientes portadores de ES e correlação com fibrose pulmonar.
IL-6 ⁽⁷⁸⁾	Monócitos, linfócitos B e T, fibroblastos, células endoteliais	↑ proliferação de fibroblastos ↑ síntese de colágeno e TIMP-1	- Níveis elevados no soro e lavado broncoalveolar em pacientes com ES; - Expressão aumentada de IL-6 em fibroblastos cutâneos de ES; - Correlação com o comprometimento cutâneo.
IL-13 ⁽⁷⁹⁻⁸²⁾	Linfócitos Th2, mastócitos	↑ produção de TGFβ por macrófagos ↑ proliferação de fibroblastos ↑ síntese de colágeno	- Níveis séricos aumentados em pacientes com ES; - Produção desregulada de IL-13 por linfócitos CD8(+) efetores de pacientes com ES e uma correlação com formas mais graves da doença cutânea; - Inibição de IL-13 atenua a fibrose pulmonar induzida por bleomicina.
IL-7(68, 83, 84)	Células epiteliais do timo,	↓ produção e expressão de TGF-β - Induz resposta Th1	Níveis elevados em lavado broncoalveolar em pacientes com ES e doença intersticial

	hepatócitos, células dendríticas, queratinócitos		pulmonar
IL-17 ^(85, 86)	Linfócitos Th17	↑ proliferação de fibroblastos ↑ secreção de citocinas pro- inflamatórias, como IL-6 e IL-8 ↑ expressão de ICAM-1	Níveis séricos elevados de IL-17 em pacientes com ES e sua possível associação com doença precoce; Quantidade aumentada de células Th17 no sangue periférico de indivíduos com ES.
IL-22 ^(65, 87, 88)	Linfócitos Th1, Th17, Th22	Desconhecida	Aumento da expressão de IL-22 na pele de pacientes com ES; Aumento do número de células CD4+ Th22 no soro de pacientes com ES e correlação com doença pulmonar intersticial.

Estudos recentes indicam um papel das citocinas da via Th17 na patogênese da fibrose na ES. As células Th17 produzem as citocinas IL-17, IL-21 e IL-22. De uma maneira geral, a IL-17 é considerada uma citocina pró-inflamatória capaz de induzir produção de outras citocinas como IL-6, IL-1, IL-8 e TNF. Além disso, inibe angiogênese de células endoteliais e promove a proliferação de fibroblastos, entretanto não foi observada ação conhecida sobre o colágeno. Têm sido descritos níveis séricos elevados de IL-17 em pacientes com ES, sugerindo sua participação na fisiopatologia da doença (85, 86).

Neste contexto, este trabalho se propõe a quantificar a expressão de 11 moléculas em amostras de biópsias de pele de pacientes portadores de Esclerose Sistêmica e indivíduos saudáveis, na tentativa de estabelecer um esboço do microambiente da pele fibrótica.

3.6.1. TGF- β

O TGF β é uma citocina anti-inflamatória composta por 112 aminoácidos, e possui aproximadamente 13 kDa (89). Apresenta cinco isoformas (1 a 5), e é um fator de crescimento pluripotente sendo pois, capaz de inibir e estimular atividades de proliferação, de induzir apoptose e síntese de proteínas das células epiteliais, células mesenquimais e células do sistema imunológico, como por exemplo, monócitos ou células T (90). Tem capacidade, portanto, de funções de supressão do sistema imune e da proliferação epitelial (43).

É uma das principais citocinas no processo de fibrose. Células mononucleares de sangue periférico e macrófagos teciduais produzem e

respondem ao TGF- β , principalmente na sua isoforma TGF- β 1. Em macrófagos, a ativação da forma latente de TGF- β 1 depende de catepsinas, plasmina, calpaina, trombospondina-1, integrina- α v β 6 e metaloproteinases da matriz (91). A isoforma tipo 1 é capaz de inibir produção de IL-1, IL-2, IL-6, e TNF (89).

Várias células envolvidas na fisiopatologia da ES, como trombócitos, células endoteliais, fibroblastos, e uma variedade de células imunes, são capazes de sintetizar TGF β . O aumento do número de receptores de TGF β foram encontrados em fibroblastos de pacientes com ES, aumentando assim o potencial de resposta celular para TGF β (92). Tal molécula, portanto, tem poder importante como regulador do processo de muitas doenças fibróticas, incluindo a ES (47).

Dentre suas funções, suprime a produção de metaloproteinases da matriz (MMPs), induz inibidores de MMP, atua como um quimio-atrator e induz CTGF, deste modo aumentando ainda mais a resposta fibrótica (93).

TGF- β é regulado, em grande parte por eventos pós-traducionais, e a via de sinalização básica do TGF envolve a habilidade do ligante do TGF ativo em sinalizar através de um complexo receptor heterodimérico, que consiste dos receptores TGF- β tipos I e II (94, 95). O receptor de TGF- β tipo I é chamado ALK5 (*activin linked kinase 5*/ quinase 5 ligada a ativina) que fosforila Smad 2 e 3. Fosforiladas, elas se ligam a Smad4, e o complexo resultante transloca-se para o núcleo, e ativa transcrição através da ligação com a sequência CAGA, ou seja, iniciam a transdução de sinal (96-98). Smads são ativadores de transcrição fracos, mas recrutam cofatores que promovem a transcrição, como a p300 (99). Smad7 é o membro da família Smad com maior eficácia inibitória. Smad7 inibe a fosforilação TGF- β -mediada de Smad2/3 e compete com a ligação Smad2/3 ao receptor do TGF- β . O TGF- β rapidamente induz produção de IL-7 (69) que por sua vez induz expressão de mRNA Smad7, explicando assim o feedback no controle de sinalização do TGF- β (100).

A transdução de sinal mediada pelo TGF- β tem sido estudada em portadores de ES, revelando aumento da fosforilação de proteínas Smad em fibroblastos de ES (101), expressão alterada de Smad7 reguladora (102), e

um aumento da proporção de receptores de TGF- β dos tipos I e II (103).

Angiotensina II, produzida localmente por macrófagos ativados e fibroblastos, estimula a produção de TGF- β 1, a proliferação de fibroblastos e a sua diferenciação em miofibroblastos produtoras de colágeno. A angiotensina II pode ser produzida por miofibroblastos, e aumenta a sinalização de TGF- β 1, aumentando os níveis Smad2/Smad3 juntamente com proteínas quinases ativadas por mitógeno e Egr-1 (*v-ets avian erythroblastosis virus*). Fibrose em modelos animais, na ES e fibrose pulmonar idiopática são acompanhados por superexpressão de Egr-1. Camundongos Egr-1-nulos são protegidos da fibrose (104). TGF- β também aumenta a produção de Egr-1 (fator de transcrição de crescimento precoce), através de mecanismo ERK-dependente (ERK, *extracellular regulated MAP kinase*) Smad-independente, contribuindo para indução de produção de colágeno tipo I em fibroblastos (105-107).

A fibrilina é um constituinte natural das miofibrilas, e polimorfismos genéticos desta predisõem ao aparecimento de fibrose, como os observados em uma população Indiana, onde há um grande número de pessoas com ES do tipo difusa e com anti-Scl 70 positivo (17). Esta molécula encontra-se envolvida na regulação de armazenamento de fatores de crescimento, tais como TGF- β e proteína morfogenética óssea (BMP) (108). Assim, a fibrilina serviria para armazenar e liberar TGF- β e, desta forma, contribuir para a manutenção da ativação dos fibroblastos nas fases mais tardias da fibrose da ES, quando o tecido encontra-se mais hipocelular (47).

Tendo em vista o quanto se é sabido a respeito do papel do TGF- β na fisiopatologia da fibrose, é certo que haja uma busca por uma terapêutica visando a atenuação ou bloqueio de alguma via pela qual esta molécula tenha ação fibrótica (109, 110). No entanto, vários outros mediadores em adição ao TGF- β têm um papel importante e conhecido no processo fibrótico, incluindo PDGF, CTGF, IL4, IL13, monócitos da proteína-1 (MCP-1), endotelina -1 (111).

A sinalização do PPAR- γ (receptor ativado de proliferação nuclear do peroxissoma- gamma) regula a fibrogênese pela via TGF- β -dependente. Os níveis de PPAR-g apresentaram-se reduzidos em biópsias de pele e pulmão

de pacientes com ES e em fibroblastos da derme esclerodérmicos (112). Pode ser, portanto, um bom alvo terapêutico para os portadores de ES.

TGF- β e PDGF ativam sinalização Src-quinase em fibroblastos dérmicos normais e de ES. Inibição desta sinalização reduz síntese de RNA mensageiro para colágeno e fibronectina-1, reduzindo o conteúdo dérmico do colágeno e diminuindo o número de miofibroblastos (113).

Por conseguinte, essas moléculas poderiam, em parte, assumir o papel pró-fibrótico do TGF- β , tão logo sua atividade fosse bloqueada. Resta, portanto, saber de um ponto de vista terapêutico, se o TGF- β tem um papel tão central como uma citocina mestre na patogênese da ES, como tem sido atribuída ao fator de necrose tumoral (TNF) na patogênese da artrite reumatoide.

3.6.2. CTGF

É um membro da família CCN, envolvido no desenvolvimento natural de tecidos, como ossos e cartilagem. No entanto, dependendo do micro-ambiente, pode apresentar importante papel em doenças malignas e fibróticas (114). CCN2 (Fator de crescimento de tecido conjuntivo/CTGF) é um fator pró-fibrótico secretado por células endoteliais, promovendo proliferação de fibroblastos e produção de MEC (115). Interessantemente, o CTGF é transcripcionalmente ativado pelo TGF- β , e tem-se mostrado um mediador de atividade pró-fibrótica (116-119)

O CTGF também exerce função de transdiferenciação, como demonstrado no estudo de *Bruno et al.* Este autor evidenciou a importante função desta molécula na indução da fibrose, pois quando silenciada, havia redução do efeito pró-fibrótico pelo TGF- β (120).

Encontra-se elevada no plasma e no fluido intersticial dérmico de pacientes com ES, e os níveis de fragmento de péptido N-terminal de CTGF correlacionam-se diretamente com a gravidade da fibrose da pele, e inversamente com a duração da doença (121).

3.6.3. PDGF

PDGF, uma família de fatores de crescimento homo- ou heterodiméricos, incluindo PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC, e PDGF-DD, liga-se a dois diferentes receptores, *alpha* e *beta*. Tem a capacidade de

estimular migração e proliferação de neutrófilos, macrófagos, fibroblastos e células do músculo liso, além de formação de tecido de granulação (122, 123). Estudos *in vivo* documentaram um importante papel da sinalização do PDGF no desenvolvimento de inúmeros órgãos como rins, olhos e pulmão. Tal sinalização é essencial para a formação de células mesenquimais durante a embriogênese (124).

O conceito de auto-anticorpos dirigidos para as moléculas da superfície celular (por exemplo, receptores de fatores de crescimento), que após ligação induz vias de transdução de sinais que contribuem para a patogênese da ES vem sendo bem explorado, por ser uma doença sabidamente dirigida por células T. O papel de auto-anticorpos dirigidos para o receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFr) em ES é um exemplo (47, 122).

PDGF, bem como o TGF- β , estimulam fibroblastos a contraírem colágenos da MEC, expressar colágeno (125, 126), expressar α -SMA (no fígado-*in vivo*), e diferenciar os pericitos em miofibroblastos (em rins -*in vivo*) (127, 128).

As evidências de que os miofibroblastos sejam recrutados de pericitos microvasculares, como já mencionado, são suportadas pelo fato da presença de expressão de receptores de PDGF em pericitos microvasculares ativados em pacientes com ES precoce, mas não em ES no estágio tardio (129).

O PDGF é um potente mitógeno para as células com origens mesenquimatosa e neuroectodérmica. É secretado por uma variedade de células (tais como plaquetas, fibroblastos e células musculares lisas) em resposta a uma lesão, e aos efeitos de replicação, sobrevivência e migração de miofibroblastos através de receptores, PDGF-R-*alpha* e PDGF-R-*beta*.

Transdução de sinal do PDGF ocorre através de dois receptores transmembranas tirosina-quinase específicos, como já mencionados PDGFRA e PDGFRB, que diferem nas suas cascatas de transdução de sinal e efeitos biológicos. Por exemplo, a ativação do PDGFRA resulta em fosforilação de MAP-quinases (Erk 1/2, p38, JNK), a ativação do ras, a indução de “genes precoces imediatos”, como a Egr-1, c-fos, c-jun. Os efeitos pró-fibróticos do TGF- β e PDGF podem ser independentes das vias Smad2/Smad-3, porém dependem das tirosinas quinases intra-celulares (c-abl- e Src-quinases).

3.6.4. CCL3/MIP1- α

O CCL3, também conhecido como MIP-1-*alpha* (proteína inflamatória de macrófago), induz a produção do colágeno por ativar fibroblastos e estimular produção de TGF- β , PDGF e CTGF. O TGF- β , por sua vez, reduz a produção de CCL3, através de um complexo modelo de *feedback* negativo (77). CCL3 é produzida por células T ativadas, células B, monócitos, e mastócitos. No entanto, macrófagos e células epiteliais são consideradas as principais fontes de CCL3 (49).

As quimiocinas são pequenas proteínas secretadas por leucócitos (49), definidas como citocinas que induzem a quimiotaxia de células sensíveis, em estágios iniciais da ES, parecem ser fundamentais na iniciação e desenvolvimento de fibrose, atraindo leucócitos teciduais e células mononucleares que, por sua vez, podem liberar fatores de crescimento pró-fibróticos (130). CCL3 parece ter um papel importante na patogênese da doença, através do recrutamento de monócitos (131) e linfócitos T auxiliares e *up*-regulação da expressão de moléculas de adesão, permitindo assim diapedese (49, 130, 132). Desta maneira contribui para fibrose por recrutar miofibroblastos, macrófagos e células mononucleares do sangue periférico em direção a sítios de injúria tecidual. Os anticorpos anti-CCL3 reduziram o desenvolvimento de fibrose em modelos de fibrose pulmonar induzido por bleomicina (133).

3.6.5. IL-7

O gene para IL-7 humana está localizado no cromossomo 8q12-13 (134). A sequência desta citocina prediz um peso molecular de 17.4 kDa, mas a glicosilação resulta em proteína ativada de 25 kDa. É classificada como uma citocina da família de hematopoetina, um grupo que também inclui IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, fator de estimulação de colônias de macrófagos (GM-CSF), IL-9, IL-13, IL-15, M-CSF, e fatores de células-tronco (SCF) (68).

A IL-7 já tem função descrita em precursores de células B, e atua em células T maduras (135) e imaturas (136-138). Mutações na cadeia *alpha* do receptor de IL-7 em pacientes com imunodeficiência combinada severa (SCID) confirmaram que a IL-7 é indispensável para o desenvolvimento de células T (139).

Esta interleucina tem potente efeito sobre as células T maduras.

Trabalhos recentes têm mostrado que a IL-7 é um modulador de proliferação peptídeo-induzida de baixa afinidade, que é um aspecto central na regulação de homeostase da população de células T (140, 141). Além disso, níveis circulantes de IL-7 aumentam em resposta a depleção de células T, sugerindo um papel na regeneração de células T (142-144).

As fontes primárias de IL-7 são estromais não-derivadas de medula óssea, e células epiteliais. Assim, a IL-7 é uma citocina pleiotrópica com um papel central na modulação do desenvolvimento de células T e B, e da homeostase de células T. A potência e a amplitude dos efeitos sugerem que a administração ou a neutralização de IL-7 pode permitir a modulação da função imune em pacientes com depleção de linfócitos, da administração da vacina, ou da auto-imunidade. (68)

O TGF- β e a IL-7 compartilham uma relação recíproca de antagonismo, em que cada um é capaz de realizar “*down-regulation*”. Com efeito, a capacidade de TGF- β para inibir a proliferação de células pré-B induzida por IL-7 foi reconhecida logo após a identificação da IL-7 (145). Além disso, o TGF- β regula negativamente a produção de mRNA IL-7 e a secreção de proteínas, a partir de células do estroma da medula óssea humana (146). Curiosamente, a IL-7 também tem a capacidade de regular negativamente a produção de TGF- β (147, 148). Desta maneira, IL-7 tem uma relação antagonista ao TGF- β , e vice-versa. Embora os mecanismos e as implicações dessa relação ainda não estejam elucidados, a potência dos dois agentes em uma amplitude de populações imunes sugere que esta relação representa um importante nível na regulação imune (68, 148).

A capacidade potencial de IL-7 para quebrar a tolerância aos antígenos de baixa afinidade podem predispor à auto-imunidade ou linfoproliferação em alguns pacientes, mas também pode vir a ser explorado no contexto de testes de vacinas para o câncer e outras doenças (68).

3.6.6. INF γ

Interferon do Tipo I (IFN) é um potente sinal imunomodulador que está fortemente implicada na patogênese do Lúpus Eritematoso Sistêmico, e se correlaciona proporcionalmente com a atividade e gravidade da doença nestes pacientes. Pensa-se que a interação dos anticorpos anti-nucleares com

células dendríticas plasmocitóides na circulação resulta na indução de IFN. O aumento da expressão de genes do IFN tipo I em leucócitos do sangue periférico e monócitos também tem sido relatada na ES (149).

Além disso, a expressão de IFN é elevada na pele lesionada (150). Uma "assinatura IFN" forte na ES parece estar associada com a presença de anticorpos anti-tipo I, e pode refletir a estimulação de células dendríticas plasmocitoides por imunocomplexos que contêm ácidos nucleicos através de receptores do tipo toll como TLR3. O papel potencial de IFN na patogênese da ES é suportada pela associação de mutações genéticas dos alelos que codificam genes envolvidos na sinalização da doença, tais como IFN IRF5 (151)

Notavelmente interferons agem como potentes inibidores da síntese de colágeno e outras respostas fibróticas (152, 153). Ainda não está claro neste momento se a sinalização IFN elevado na ES contribui diretamente na tentativa de limitar o dano e atenuar fibrose, ou se age com o objetivo de promoção de lesão microvascular e apoptose. Ensaio clínico utilizando agentes que bloqueiam a sinalização IFN podem elucidar o real papel desta citocina.

3.6.7. Th17: IL-17, IL-22, RORc

Células Th17 parecem coordenar a defesa do organismo contra bactérias extra-celulares e fungos, em alguns sítios específicos como barreira gastro-intestinal, respiratório e pele (154). Várias vertentes têm sugerindo um papel crucial destas células na patologia da inflamação e auto-imunidade. A IL-17 pode ser produzida por três subconjuntos de células conhecidas, no entanto as células Th17 são as principais produtoras (155). A IL-17 constitui uma família de seis citocinas (IL-17A até IL-17F). Além da IL-17, as células Th17 também secretam IL-21 e IL-22 (156-158). TGF- β e IL-6 ou IL-21, o fator de crescimento e estabilização de IL-23, e os fatores de transcrição RORc, ROR α , e STAT-3 parecem estar envolvidos no desenvolvimento de células Th17. Este subconjunto de células T-*helper* podem contribuir não só para a inflamação, mas também a produção de fibrose via de IL-17A e outras citocinas (159).

Em 2006, foi observado em estudo com ratos, por *Ivanov et al.*, que o ROR γ t (também conhecido como RORc) é o fator transcripcional chave para o

desenvolvimento de células Th17 (160). As células T helper chamadas células Th17 são controladas pelo fator de transcrição *retinoic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma* (ROR γ t) (161).

A frequência de circulação de células Th17 foi notavelmente aumentada em pacientes com ES (162). Os níveis de IL-17A séricos elevados e a aumentada expressão de IL-17A em linfócitos do sangue periférico e pele lesionada foram relatados em pacientes com ES (85, 86, 162).

A IL-17A tem sido implicada no desenvolvimento de fibrose de pele e pulmonar induzida por bleomicina em ratos (159, 163). Essa citocina é capaz de aumentar a proliferação de fibroblastos em seres humanos (85), bem como a produção de citocinas pró-inflamatórias (MCP-1, IL-6 e IL-8) e as metaloproteinases de matriz (MMP-1 e MMP-3) (164, 165). Estes estudos que evidenciaram níveis aumentados de IL-17, sugeriram um papel pró-fibrótico na fisiopatologia da ES.

No entanto, Nakashima *et al.* mostrou evidência de um *upregulation* da miR-129-5p que bloqueia a IL-17A, reduzindo então a atividade anti-fibrótica da em fibroblastos humanos, associado ao *downregulation* de CTGF e colágeno- α -I (166).

Consoante a tal estudo, Truchetet *et al.*, em 2013, observou que a IL-17 diminui a expressão do α -SMA induzida pelo TGF- β em fibroblastos humanos, e que a expressão de IL-17A presente nas células da pele de ES se correlaciona inversamente com fibrose da pele (167). Somando-se aos outros, Brembilla *et al.* também faz alusão ao potencial efeito anti-fibrótico que a IL-17 parece exercer, sugerindo, inclusive, que os fibroblastos de pacientes com ES parecem ser resistentes ao seu efeito (156).

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

3.6.8. IL-13

A IL-13 é uma citocina imunorregulatória secretada predominantemente por células Th2 ativadas, mas também por mastócitos e *natural killers* (168, 169). É um modulador potente de monócitos e da função de células B, e entre as suas muitas funções, é conhecida por estar envolvida na remodelação de tecido e fibrose (170). A IL-13 possui a capacidade de suprimir a produção de citocina pró-inflamatória em monócitos / macrófagos, tais como TNF, IL-1, IL-

8, e MIP 1alpha (168, 171).

Além de promover a proliferação de células B, induz a expressão de integrinas à superfície celular, MHC de classe II e CD23, e favorece a troca de classe de anticorpo para a produção de IgE e IgG4 (172-175). Portanto, a IL-13 também tem demonstrado um papel de mediador importante para o desenvolvimento de doença alérgica (176).

Estudos anteriores têm demonstrado que a produção anormal de IL-13 por células T CD8 + efetoras no sangue periférico de ES se correlaciona com a extensão da fibrose de pele (177). IL-13 é uma citocina pró-fibrótica que é suficiente para induzir fibrose em pele e pulmão (178, 179).

Fuschiotti e colegas avaliaram o papel de célula T CD8 + e da IL-13 na produção de fibrose dérmica, e chegaram a conclusão que há nas lesões de pele de pacientes com ES, grandes quantidades de células T CD8 + e IL-13 (170).

Alguns estudos confirmam o potencial da IL-13 em estimular síntese de colágeno em ES, e também de estimular fibrose hepática e pulmonar (78, 179-182). Mas os fatores que regulam a expressão da IL-13 na doença fibrótica permanecem pouco compreendidos (183).

Alguns estudos evidenciam um papel da IL-13 como uma citocina anti-inflamatória, e que poderia ter efeito até mesmo na analgesia (89, 184, 185).

3.6.9. IL-6

A IL-6 é uma glicoproteína de 22 a 27 kDa. É uma citocina multifuncional pleiotrópica produzida por células, como os linfócitos, fibroblastos e monócitos (186). Dentre suas funções podemos citar a capacidade de ativar linfócitos T, estimular reagentes de fase aguda (como proteína C reativa), e estimular células precursoras hematopoiéticas possibilitando maturação de células B em células produtoras de anticorpos (187).

Possui um importante papel na doença fibrótica. Em conjunto com TGF- β , CTGF e PDGF formam um poderoso conjunto indutor de produção de colágeno e proliferação de fibroblasto (188).

Parece estar implicada, também, em angiogênese e neovascularização. Tal fato pode estar relacionado a proliferações vasculares aberrantes e manifestações isquêmicas na ES (189).

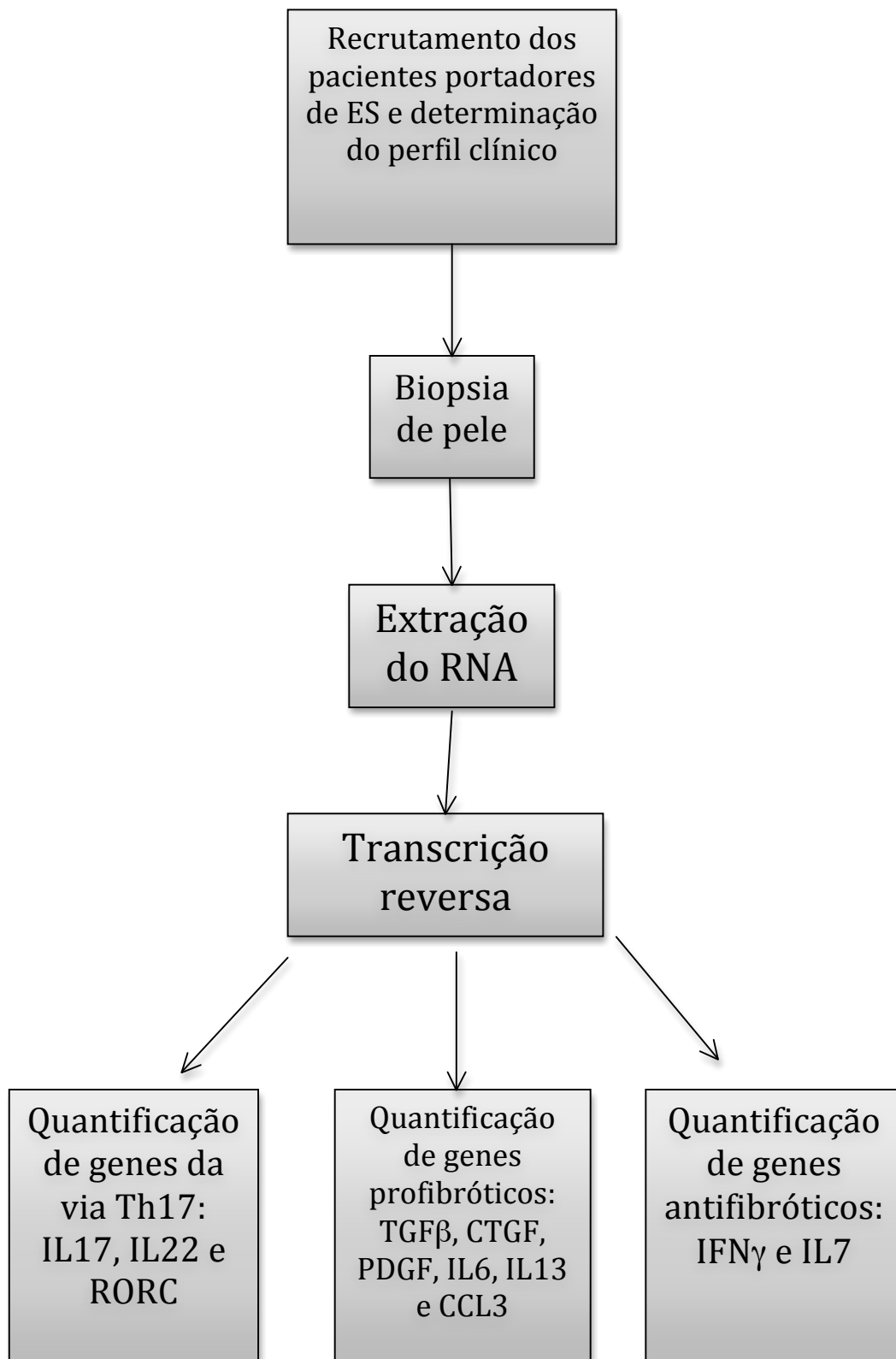
Estudos evidenciam níveis elevados de IL-6 em pacientes com ES (190), e há correlação destes com a extensão do acometimento cutâneo, mensurado através do escore de Rodnan modificado (191, 192). Foram observados também, níveis de IL-6 aumentados em tecidos, naqueles pacientes com doença severa da pele (192).

Apesar dos estudos anteriormente citados sugerirem a participação das moléculas (TGF- β , PDGF, CTGF, IL-13, IL-6, CCL3, IL-7, IL-17, IL-22, RORc, IFN γ) na fisiopatologia da ES, ainda não há uma definição estabelecida do papel destas isoladamente, nem de suas interações *in vitro*. A análise *ex-vivo* destas moléculas é ainda menos realizada, e por tanto seus resultados menos conhecidos. Baseado nesses dados da literatura, esse trabalho foi desenvolvido no intuito de estabelecer um melhor conhecimento das expressões das moléculas citadas acima na fibrose da ES a partir de biópsia de pele, sem uso de cultura de células, nem uso de estimulação exógena, ou seja, em última análise, uma avaliação *ex-vivo*.

4. Metodologia

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

Figura 3. Delineamento do estudo



4.1. Recrutamento de pacientes portadores de Esclerose Sistêmica

No ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas de Pernambuco há 84 pacientes com ES cadastrados. Foram selecionados 14 pacientes do sexo feminino, com idade acima de 18 anos, atendidos no Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, com diagnóstico de Esclerose Sistêmica segundo os critérios do *American College of Rheumatology* (22). Após esclarecimentos sobre o Projeto de Pesquisa, aqueles que concordaram quanto às propostas foram convidados a participar do estudo, com inclusão dos mesmos apenas após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE – apêndice 4 e 5). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética CAAE 0522.0.172.000-11.

Os pacientes foram classificados, de acordo com a extensão do comprometimento cutâneo, na forma cutânea limitada e cutânea difusa (21). A extensão do comprometimento cutâneo foi avaliado através do escore de Rodnan modificado (30). Na caracterização clínica dos pacientes, foram avaliados comprometimento de órgãos-alvo (presença de úlceras digitais, dismotilidade esofagiana, fibrose pulmonar, hipertensão arterial pulmonar, comprometimento renal). Na tabela 2 seguem as informações clínicas e de exames de imagem dos pacientes selecionados.

Tabela 2. Características epidemiológicas dos pacientes com ES (n=14)

Características	
Idade (anos)	
Média $\pm$ SD (variação)	43,67 $\pm$ 10,38 (28-65)
Gênero	
Feminino	N(%) 14 (100)
Duração da doença (meses)	
Média $\pm$ SD (variação)	108,31 $\pm$ 80,6 (2-258)
Subgrupos clínicos	
Cutânea difusa	N(%) 7 (50)
Cutânea limitada	7 (50)
Comprometimento gastroesofágico	3 (21,4)
Úlceras digitais	2 (14,3)
Crise renal	2 (14,3)
TAC de tórax alterada	11 (78,6)
Escore de Rodnan	
Média (variação)	7,3 (0-14)
Tratamento	
Esteroides	N(%) 5 (35,7)
Azatioprina	2 (14,3)
Metotrexate	1 (7,1)
Ciclofosfamida	2 (14,3)
Micofenolato de mofetil	1 (7,1)

4.2. Recrutamento de voluntários sadios

O grupo controle consistiu de 5 voluntários saudáveis procedentes da cirurgia plástica, pareados por sexo e idade, sem diagnóstico de outra doença reumatológica imunoinflamatória ou de imunodeficiências, escolhidos aleatoriamente na cirurgia plástica do Hospital das Clínicas da UFPE.

4.3. Biópsia de pele

As biópsias de pele foram realizadas com *punch* de 5mm, com retirada de um fragmento do antebraço com pele fibrosada de indivíduos portadores de ES. As amostras de pele foram colocadas no RNA later (*Life Technologies*), para serem transportadas. Ao chegar no laboratório procedeu-se a retirada da mostra do RNA later, e então uma parte das amostras foram colocadas em 500µL de trizol (extração realizada de acordo com as instruções do fabricante), e as outras foram colocadas em buffer RLT e b-mercaptopurina (extração realizada de acordo com as instruções do fabricante *Qyagen*).

As amostras dos controles, advindas de material de cirurgia plástica, foram estocadas e transportadas, bem como processadas, conforme descrito acima.

4.4. Expressão gênica

4.4.1. Extração do RNA

- Trizol:

Após trituração das biópsias de pele, as amostras foram homogeneizadas no vortex de 5 a 10 minutos à temperatura ambiente, e posteriormente foram deixadas 5 minutos à temperatura ambiente para separação do complexo núcleo-proteína. Foram adicionados 200 µL de clorofórmio frio em todos os tubos (o trabalho foi realizado no gelo), e então homogeneizados delicadamente por 15 segundos. Foram colocadas em repouso por 3 minutos à temperatura ambiente, e posteriormente foram submetidas a centrifugação com 10000 rpm à 4°C por 20 minutos.

Foi recuperada a fase translúcida com auxílio de pipeta de 200 µL, sem a interfase que contem DNA, e evitando a fase orgânica de proteínas (camada inferior). Esta fase translúcida foi transferida para um tubo Eppendorf de 1,5 mL novo.

A esta fase, foi adicionada 500 μ L de isopropanol para precipitar o RNA, mantida por 10 minutos à temperatura ambiente, e submetida novamente a centrifugação com 10000 rpm à 4°C por 20 minutos.

Após, foi procedido o descarte do sobrenadante com pipeta, e adicionado 1 ml de etanol 75% (previamente diluído na água ultrapura + DEPC 0,01%), e mais uma vez submetida a centrifugação a 10000 rpm à 4°C por 15 minutos.

O sobrenadante mais uma vez foi descartado delicadamente para retirada do etanol, e os tubos foram mantidos abertos por 5 a 10 minutos para evaporar todo o resto do etanol.

Após este procedimento foram adicionados 30 μ l de água livre de RNase/DNase, e foram incubadas à 55-60°C durante 10 minutos para facilitar a diluição do RNA.

E então, foram prosseguidas as quantificações pelo Nanodrop, e logo após, armazenada no freezer -80°.

- Qyagen (RNAeasy mini kit):

Para cada 100 μ L de buffer RLT foram adicionados 10 μ L de b-mercaptoetanol (bME). Como as biópsias apresentavam uma média de 30mg, de acordo com as orientações do kit, foram utilizadas 600 μ L de buffer RLT. As amostras com essa solução foram submetidas a trituração.

Após a trituração, o lisado foi centrifugado por 3 minutos a 14000 rpm à temperatura ambiente, e então retirado o sobrenadante e transferido para outro tubo. O volume foi mensurado (ficando cerca de 600 μ L) e adicionado o mesmo volume de etanol a 70% (1:1). Foi misturado imediatamente com pipeta.

Um volume do lisado não superior a 700 μ L foi transferido para uma coluna de rotação RNAeasy já acoplada em um tubo coletor de 2ml, e centrifugado a 10000 rpm por 15 segundos a temperatura ambiente. O filtrado foi descartado, e o restante do lisado foi submetido ao mesmo procedimento acima descrito.

Após esta etapa, foram adicionados 700 μ L do *buffer* RW1 na coluna de rotação RNAeasy acoplada em um tubo coletor de 2 ml, e submetido a

centrifugação por 15 segundos a 10000 rpm. Mais uma vez o filtrado foi descartado.

Foram adicionados 500 μ L do *buffer* RPE na coluna de rotação RNAeasy que já estava acoplado a um tubo coletor de 2 ml, e então foi submetido a centrifugação por 15 segundos a 10000 rpm; posteriormente, o filtrado foi mais uma vez descartado. Esta etapa foi realizada num total de duas vezes seguidas.

A coluna de rotação foi colocada em um tubo novo, e foi procedida nova centrifugação por 3 minutos a 14000 rpm; e após, novamente foi trocada para outro tubo e foram adicionados 40 μ L de água livre de RNase/DNase, e foi centrifugado por mais 1 minuto a 10000 rpm. Após essa última etapa, a amostra foi estocada a -80°C.

4.4.2. Tratamento do RNA com DNase I

Alíquotas de RNA total (4 – 6 μ g) foram tratadas com a enzima *DNase I* (volume igual a 30% da concentração de RNA; 1 U/ μ L – Promega, Madison, EUA) por 60 minutos a 37°C, com a finalidade de eliminar possíveis contaminantes de DNA. Em seguida, o RNA foi precipitado com 75 μ L de etanol absoluto e 3 μ L de acetato de sódio (0,2 M, pH 4.0-4.6) a -80°C, *overnight*. Após este período, o RNA foi centrifugado por 30 minutos (10000 rpm a 4°C) e lavado com etanol 75%. O RNA foi novamente centrifugado por 20 minutos (10000 rpm) e o sobrenadante desprezado. O precipitado foi deixado a temperatura ambiente por 10 minutos para completa secagem, e em seguida dissolvido em água livre de RNase/DNase (GIBCO, Gaithersburg, EUA).

4.4.3. Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA utilizou-se o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido), seguindo as instruções do fabricante. Uma mistura contendo dNTPs, iniciadores randômicos (*random primers*), transcriptase reversa e inibidor de RNase (1 U/ μ L de *RNaseOUT Ribonuclease Inhibitor* - Invitrogen Life Technologies, Califórnia, EUA) foi preparada e adicionada a um mesmo volume de RNA. A reação de síntese de cDNA foi feita a 25°C por 10 minutos, seguida por 2 horas de incubação a 42°C.

4.4.4. PCR em Tempo Real (qPCR)

Para análise quantitativa dos transcritos diferencialmente expressos foi feita PCR em tempo real. A reação de amplificação dos cDNAs foi realizada com PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK) e sondas específicas para os genes TGF- β 1 (TaqMan Hs00998133_m1), CTGF (TaqMan Hs01026927_g1), PDGF (TaqMan Hs00964426_m1), IL-6 (TaqMan Hs00985639_m1), IL-13 (TaqMan Ec03470543_m1), IL-7 (TaqMan Hs00174202_m1), CCL3 (TaqMan Hs04194942_s1), IFN- γ (TaqMan Hs00989291_m1), IL-17A (TaqMan Hs00174383), IL-22 (TaqMan Hs01574154) e RORc (TaqMan Hs01076122_m1), utilizando-se o equipamento ABIPrism 7900HT *sequence detection PCR machine* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Foi utilizado o gene endógeno 18S (TaqMan Hs03928990_g1), cuja expressão é constitutiva, para posterior análise comparativa do nível de expressão dos transcritos de interesse.

A expressão relativa dos genes foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Primeiramente calcula-se a relação entre o gene referência (controle endógeno 18S) e o gene alvo (gene em estudo) para todas as amostras. Este índice é denominado ΔCt . Em seguida, calcula-se o $-\Delta\Delta Ct$, que é a correção do ΔCt das amostras pelo ΔCt do grupo controle, o qual pode ser calculado subtraindo-se o ΔCt médio da amostra pelo ΔCt médio do controle. Em seguida, é obtido o valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, se a eficiência do primer for 100%, ou seja, se a amplificação estiver sendo feita de maneira exponencial em base 2.

4.5. Análise dos resultados

A expressão dos resultados das variáveis contínuas foi feita pelas médias e desvios padrão. Para verificação de possíveis diferenças entre média, foi usado o teste “t” de *Student* para amostras independentes, quando a distribuição foi gaussiana. Nos casos em que o conjunto amostral não passou no teste da normalidade foi usado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Correlações foram determinadas usando a correlação de Spearman. Todos os dados foram analisados com o GraphPad Prism 6.

5. Resultados

5.1. Artigo a ser submetido na revista *Clinical Rheumatology*

CCL3, IL-7, IL-13 and IFN γ are increased in skin's biopsy of Systemic Sclerosis.

R. S. G. Gonçalves ¹, M. C. Pereira ², A. T. Dantas ¹, C. D. L. Marques ¹, M. J. B. M. Rego ², I. R. Pitta², M. G. R. Pitta², A. L. B. P. Duarte¹

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

Abstract

Although a number of cytokines and chemokines have been investigated as possible mediators of fibrosis in Systemic Sclerosis (SSc), specific correlation between cytokines and organ involvement have not been found yet, and a cytokine profile characteristic of SSc is far to be identified. We established a profile of anti and profibrotic molecules involved in skin fibrosis of SSc patients. The mRNA expression was detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) in skin's biopsies from 14 patients with SSc and 5 healthy controls. TGF- β , PDGF, CTGF, CCL3, IL-6, IL-13, IL-7, IFN γ , IL-17, IL-22, and RORc were analysed in these samples. The CCL3, IL-13, IFN- γ and IL-7 were more expressed in the SSc's skin (respectively, $p = 0.0002$, $p = 0.0243$, $p = 0.0335$, $p = 0.0082$) when compared with healthy controls. We found positive correlation in expression levels between CCL3 and IL-7 ($p = 0.0050$ $r = 0.7187$), besides a negative correlation between IL-7 and TGF- β ($p = 0.0136$ $r = -0.6527$), and between IFN γ and TGF- β ($p = 0.0001$; $r = -0.8637$). Furthermore, we observed relation with clinical parameters and images data with the relative genes expressions. The increase of IL-7, IFN- γ , CCL3 and IL-13 relative mRNA expressions on the microenvironment of the SSc's skin suggests the hypothesis of participation of these molecules in the pathophysiology of SSc. This is an important finding because it allows development of better *in-vitro* models, and suggests potential disease biomarkers and therapeutic targets. We also ratified the potential antifibrotic role of IL-7 as well IFN- γ . The correlation between IL-7 and CCL3 in fibrosis needs to be better understood.

Keywords: Systemic Sclerosis. Gene expression profile. Skin. Cytokines.

Introduction

Systemic Sclerosis (SSc), although rare, is considered extremely important in Rheumatology, because of its significant impact on life's quality of affected individuals and its poor prognosis, and therefore is considered the most serious collagen's disease. To date, the available treatments shown to be ineffective and value the treatment of symptoms, and there is still no proven drug that acts by interfering in the progression of fibrosis. It is evident the need for studies that help in the discovery of new targets and new drugs to be used in the treatment of this disease. There are few studies that had used skin

sample *ex-vivo* trying somehow to establish a profile of the microenvironment (193, 194).

There are established roles of some profibrotic molecules in SSc physiopathology, as TGF β (*transforming growth factor beta*), CTGF (*connective tissue growth factor*), PDGF (*platelet-derived growth factor*), IL-13 (interleukin) and IL-6, CCL3 (*chemokine (C-C motif) ligand 3*), mainly in fibrosis. Others, however, had not a role well defined in the disease yet, as well IL-17, IL-22, IL-7, IFN γ (*Interferon gamma*), but the last two molecules could have a protective function. TGF- β seems to be a major cytokine in the process of fibrosis. This molecule have a lot functions such suppresses the production of matrix degrading metalloproteinases (MMPs), induces MMP inhibitors, acts as a chemoattractors and induces CTGF, thereby further enhancing the fibrotic response (93).

This study aims to quantify the mRNA expression of molecules with pro- (TGF β , CTGF, PDGF, IL-13, IL-6, CCL3, ROR γ , IL-17, IL-22) and antifibrotic action (IL-7, IFN γ) in skin's biopsy of patients with SSc and healthy individuals, thus contributing to better understanding of the pathophysiology of SSc.

Materials and methods

- Patients and tissue specimens

Skin biopsies were performed from cutaneous diffuse (dSSc) and cutaneous limited (lSSc) patients. Gene expressions were measured in skin biopsies from 7 patients with dSSc, 7 patients with lSSc and 5 healthy controls. All patients with SSc were biopsied at a lesional forearm site with a punch of 5 mm, and met the American College of Rheumatology (ACR) criteria for the classification of systemic sclerosis. The samples of the healthy control were obtained in plastic surgery. All patients were of sex female and the mean age $\pm$ standard deviation (SD) in the total patients group was $43,6 \pm 10,3$, and in the controls was $41,6 \pm 16$ years old ($p=0,57$). The table 1 shows clinical parameters of SSc patients. The Ethical Review Committee on Human Research of the Federal University of Pernambuco approved the study protocols and informed consent forms. The participants signed written informed consent.

- qRT-PCR

The samples were stored in RNeasy Lysis Buffer (Qiagen, Hilden, Germany) until arrived in the laboratory. The tissues were homogenized using *Tissue Ruptor* (QIAGEN). Total RNA was isolated from tissues with RNeasy Mini Kit (QIAGEN Sciences, Maryland, USA) or Trizol (Invitrogen) both according to the manufacturer's instructions. For cDNA synthesis 4-6 μ g of total RNA were used kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) according to manufacturer's protocol. The transcriptome of samples (TGF- β 1 (TaqMan Hs00998133_m1), CTGF (TaqMan Hs01026927_g1), PDGF (TaqMan Hs00964426_m1), IL-6 (TaqMan Hs00985639_m1), IL-13 (TaqMan Ec03470543_m1), IL-7 (TaqMan Hs00174202_m1), CCL3 (TaqMan Hs04194942_s1), IFN- γ (TaqMan

Hs00989291_m1), IL-17A (TaqMan Hs00174383), IL-22 (TaqMan Hs01574154) e RORc (TaqMan Hs01076122_m1), extracted from skin biopsies of SSc and healthy controls was observed using quantitative real-time- Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) on an Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR system. The gene expression was normalized using the ribosomal gene 18s. Data were analyzed with SDS version 2.3 software using the comparative C_t ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) method.

- Statistical analyses

Expression of results of continuous variables was assessed by means and standard deviations. For evaluation of the sample set was used the t student or nonparametric Mann-Whitney tests. Correlations were determined using Spearman's correlation. P values <0.05 were considered significant. The data were analyzed with GraphPad Prism 6.

Results

- **Increased mRNA expression of CCL3, IL13, IL7 and IFN γ in SSc patients**

The results of the relatives mRNA expressions from patients when compared with healthy controls were increased as follows CTGF (4-fold; p=0.2393), IL-6 (4-fold; p=0.2556), TGF- β (2000-fold; p=0.2047), CCL3 (3600-fold; p=0.0002), IL-13 (168-fold; p=0.0243), PDGF (1.2- fold; p=0.9613), IL-7 (658-fold; p=0.0335) and IFN γ (330-fold; p=0.0082). Only the levels of CCL3, IL-13, IL-7 and IFN γ were statistically significant as demonstrated in the figure 1. The IL-17 and IL-22 mRNA skin expressions were undetermined in both SSc patients and healthy controls.

- **Correlation between molecules mRNA expression levels**

There was a positive correlation between CCL3 and IL-7 (p = 0.0050; r = 0.7187, figure 2). TGF- β had a negative correlation with the IL-7 levels (p = 0.0136; r = -0.6527, figure 2), and with the levels of IFN- γ (p = 0.0001; r = -0.8637, figure 2). It was also observed a negative correlation between PDGF and IL-6 (p<0.05; r= -0.5385, data not shown). A tendency of correlation between CTGF and IL-13 (p = 0.0521, and r = -0.5341) was also observed (data not shown).

- **Relation of clinical manifestations with gene expression levels**

Patients with lung involvement (fibrosis or ground glass in high resolution computed tomography) had lower expression of PDGF (p= 0.0385) as observed in figure 3. We did not obtain significant results when compared mRNA expression levels with clinical parameters (presence of digital ulcers, esophageal dysmotility, pulmonary hypertension, renal impairment).

There was no statistical difference when compared mRNA expression between patients with diffuse and limited disease's form.

Discussion

We were able to establish the predominant molecules in skin biopsy samples, with evidence of increased levels of IL-7, CCL-3, IL-13 and IFN γ compared with the skin samples from healthy patients. As there is no ideal experimental model to SSc fibrosis this result is very important to help doing draws about *in vitro* studies. Some articles have already published results of mRNA expression's analyzes of Cadherin 11, COL1, CTGF (194), IL-17A, IL-21, IL-22, IL-17RA, IL-21R and IL-22R1 e IFN- γ IL-4, TGF- β (193) in skin biopsies, however CCL3, IL-7, IL-13 and IFN- γ were first described as important targets in our study.

Interestingly our study as Wu et al. (194) do not achieve statistical significance in TGF- β mRNA relative expression perhaps because the eventual presence of methylations or miRNAs. For IL-17 and IL-22, different from the results found by Zhou et al. (193), the mRNA expression were undetermined as the expression levels was lower than the detection limit of the RT-PCR reaction, therefore they were not sufficient for a statistical analysis needs. Another study in SSc which there was evaluation of IL-22 without the use of cell culture, failed to obtain expression of this molecule, but doing stimulation such expression was achieved (147). The explanation for this should be based on the possibility that in the skin *ex-vivo* sample without stimulation, the transcript could be no longer in the form of mRNA, but as protein, as we observed that once the transcription factor pathway Th17 (RORc) was expressed; or we also can assume it by the interference of epigenetics through methylation, or presence of miRNA, and others.

The correlation between TGF- β and IL-7 is already well established in the supernatant of cell cultures (69, 148, 149, 195), and therefore, this study again suggested the relation of down-regulation of these two molecules. Smad7 is the Smad family member with the best inhibitory effect. IL-7 stimulates production of Smad7 that inhibits TGF- β -mediated phosphorylation of Smad2/3, and competes with the binding Smad2/3 to TGF- β receptor. TGF- β also induces quickly Smad7 mRNA expression (messenger ribonucleic acid), suggesting also a negative feedback loop in the control signaling of TGF- β (69). The IFN γ has also a negative correlation with TGF- β (152, 196) well established in the supernatant of cell cultures, and our study hinted it. Despite the fact that there are articles published confirming this result, there is nothing yet that demonstrates how this signaling occurs in the skin.

There are no data related to SSc justifying the correlation between IL-7 and CCL3 observed in the present study. However, *Damás et al* in a study of angina showed that IL-7 increases the expression of various chemokines in peripheral blood mononuclear cells (PBMC's) from healthy subjects and patients with angina, and CCL3 is responsible for the further stimulate release of IL-7 by platelets (196). Other published studies confirm the potential of both IL-7 (197-201) as the CCL3 (198-203) in inflammatory stimulation of the cardiovascular system. The interaction of these two molecules should be further studied in SSc.

It is known that IL-13 decreases production of CCL3 (118). In this study

we do not found correlation between IL-13 and CCL3, but the results show increased expression of both, and perhaps the explanation for it is based in a negative feedback mechanism that was occurring between these two molecules, in such a way that IL-13 may be increased in order to reduce the production of CCL3, which can in turn be increased by the stimulation of IL-7.

The explanation for the statistical negative correlation between levels expressed of IL-6 with PDGF is still not understood, since both molecules are involved in fibrosis. However our findings in line with the *Tisato et al. (195)* results, confirmed the reasoning presence of interactions between these signaling pathways. *Tisato et al.* performed a study to evaluate the roles of some inflammatory molecules in the metabolic syndrome, and observed that there was an increase of IL-6 and a decrease of PDGF (118, 204), but they could not explain how the details of this correlation were.

Pulmonary fibrotic changes have significant impact on patients' survival. Charni et al. were the first to get a result of down-regulation of TGF- β and PDGF (19) in experiments using fibroblasts. These found could, somehow, justify our findings of the reduction of PDGF gene expression levels in patients who had pulmonary alterations in High Resolution Computed Tomography. However, it is necessary more researches to elucidate this.

Correlation's analysis between the expressions of IL-13 and CTGF had a significant inverse trend ($p=0,0521$ e $r = -0,5341$). Despite both molecules had already a profibrotic role defined by published articles, these results refer to the thought that, despite these two molecules have pro-fibrotic roles in the disease, the CTGF could have also an important inflammatory role in SS, as well as IL-13 could have its anti-inflammatory role in the same disease. This hypothesis is corroborated by *Murray et al.* in a study *in vitro* model of pulmonary fibrosis where was observed that IL-13 by itself is not capable to induce fibrosis (205). *Xie et al.* observed in studies that CTGF and TGF β activity was correlated with IL-4 and IL-13 cytokines (of the Th2 pathway). These cytokines decreased CTGF gene expression stimulated by TGF- β 1. This occurred through inhibition of Smad2/3's activation (which stimulates TGF- β) by the IL-13 (118).

Conclusion

The significant increase in expression of CCL3, IL-7, IL-13 and IFN γ in the patient's skin with SSc, besides enables a better development of drawings of *in vitro* study, suggests the potential therapeutic targets of these molecules, as well suggests at same time possible markers of disease.

The inverse correlation of IL-7 as well as IFN γ with the TGF- β further suggests the potential antifibrotic role of these two molecules, making them therefore, important targets for development of therapeutics.

The explanation of the correlation between IL-7 and CCL3 in SSc's physiology is still not established, but the found that there is an interaction of these two molecules in inflammation in the cardiovascular system and the finding of the positive correlation between them in our study, suggests that

more researches should be undertaken in order to elucidate this association in the pathology of fibrosis in SSc.

Acknowledgment

I thank Dr. Emerson Lima to perform biopsies of patients, and the plastic surgery department of the Clinical's Hospital by providing the control skin samples.

References

1. Zhou Y, Hou W, Xu K, Han D, Jiang C, Mou K, et al. The elevated expression of Th17-related cytokines and receptors is associated with skin lesion severity in early systemic sclerosis. *Human immunology*. 2015;76(1):22-9.
2. Wu M, Pedroza M, Lafyatis R, George AT, Mayes MD, Assassi S, et al. Identification of cadherin 11 as a mediator of dermal fibrosis and possible role in systemic sclerosis. *Arthritis & rheumatology*. 2014;66(4):1010-21.
3. Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2004;18(7):816-27.
4. Dubinett SM, Huang M, Dhanani S, Economou JS, Wang J, Lee P, et al. Down-regulation of murine fibrosarcoma transforming growth factor-beta 1 expression by interleukin 7. *Journal of the National Cancer Institute*. 1995;87(8):593-7.
5. Tisato V, Toffoli B, Monasta L, Bernardi S, Candido R, Zauli G, et al. Patients affected by metabolic syndrome show decreased levels of circulating platelet derived growth factor (PDGF)-BB. *Clinical nutrition*. 2013;32(2):259-64.
6. Miller AR, McBride WH, Dubinett SM, Dougherty GJ, Thacker JD, Shau H, et al. Transduction of human melanoma cell lines with the human interleukin-7 gene using retroviral-mediated gene transfer: comparison of immunologic properties with interleukin-2. *Blood*. 1993;82(12):3686-94.
7. Wei J, Bhattacharyya S, Tourtellotte WG, Varga J. Fibrosis in systemic sclerosis: emerging concepts and implications for targeted therapy. *Autoimmunity reviews*. 2011;10(5):267-75.
8. Zhang L, Keane MP, Zhu LX, Sharma S, Rozengurt E, Strieter RM, et al. Interleukin-7 and transforming growth factor-beta play counter-regulatory roles in protein kinase C-delta-dependent control of fibroblast collagen synthesis in pulmonary fibrosis. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(27):28315-9.
9. Lindahl GE, Stock CJ, Shi-Wen X, Leoni P, Sestini P, Howat SL, et al. Microarray profiling reveals suppressed interferon stimulated gene program in fibroblasts from scleroderma-associated interstitial lung disease. *Respiratory research*. 2013;14:80.

10. Damas JK, Waehre T, Yndestad A, Otterdal K, Hognestad A, Solum NO, et al. Interleukin-7-mediated inflammation in unstable angina: possible role of chemokines and platelets. *Circulation*. 2003;107(21):2670-6.
11. Mazzucchelli RI, Riva A, Durum SK. The human IL-7 receptor gene: deletions, polymorphisms and mutations. *Seminars in immunology*. 2012;24(3):225-30.
12. Wyss CA, Neidhart M, Altwegg L, Spanaus KS, Yonekawa K, Wischnewsky MB, et al. Cellular actors, Toll-like receptors, and local cytokine profile in acute coronary syndromes. *European heart journal*. 2010;31(12):1457-69.
13. Jones KL, Maguire JJ, Davenport AP. Chemokine receptor CCR5: from AIDS to atherosclerosis. *British journal of pharmacology*. 2011;162(7):1453-69.
14. Sattar N, Murray HM, Welsh P, Blauw GJ, Buckley BM, Cobbe S, et al. Are markers of inflammation more strongly associated with risk for fatal than for nonfatal vascular events? *PLoS medicine*. 2009;6(6):e1000099.
15. de Jager SC, Bongaerts BW, Weber M, Kraaijeveld AO, Rousch M, Dimmeler S, et al. Chemokines CCL3/MIP1alpha, CCL5/RANTES and CCL18/PARC are independent risk predictors of short-term mortality in patients with acute coronary syndromes. *PloS one*. 2012;7(9):e45804.
16. Koethe JR, Dee K, Bian A, Shintani A, Turner M, Bebawy S, et al. Circulating interleukin-6, soluble CD14, and other inflammation biomarker levels differ between obese and nonobese HIV-infected adults on antiretroviral therapy. *AIDS research and human retroviruses*. 2013;29(7):1019-25.
17. Lee YH, Nair S, Rousseau E, Allison DB, Page GP, Tataranni PA, et al. Microarray profiling of isolated abdominal subcutaneous adipocytes from obese vs non-obese Pima Indians: increased expression of inflammation-related genes. *Diabetologia*. 2005;48(9):1776-83.
18. Xie S, Sukkar MB, Issa R, Oltmanns U, Nicholson AG, Chung KF. Regulation of TGF-beta 1-induced connective tissue growth factor expression in airway smooth muscle cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2005;288(1):L68-76.
19. Charni Chaabane S, Coomans de Brachene A, Essaghir A, Velghe A, Lo Re S, Stockis J, et al. PDGF-D expression is down-regulated by TGFbeta in fibroblasts. *PloS one*. 2014;9(10):e108656.
20. Murray LA, Argentieri RL, Farrell FX, Bracht M, Sheng H, Whitaker B, et al. Hyper-responsiveness of IPF/UIP fibroblasts: interplay between TGFbeta1, IL-13 and CCL2. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2008;40(10):2174-82.

Table 1. Clinical parameters and image's data of SSc patients (n=14)

Characteristics	
Age (yrs)	
Mean $\pm$ SD (range)	43.67 $\pm$ 10.38 (28-65)
Gender	
Female	14 (100)
Disease duration (months)	
Mean $\pm$ SD (range)	108.31 $\pm$ 80.6 (2-258)
Clinical subgroups	
Diffuse cutaneous	7 (50)
Limited cutaneous	7 (50)
Gastroesophageal commitment	3 (21.4)
Chest CT changed	11 (78.6)
Rodnan score	
Mean (range)	7.3 (0-14)
Treatment	
Steroids	5 (35.7)
Azathioprine	2 (14.3)
Methotrexate	1 (7.1)
Cyclophosphamide	2 (14.3)
Mycophenolate mofetil	1 (7.1)
Without treatment	3 (21.4)

Yrs: years; SD: standard deviation; CT: computed tomography.

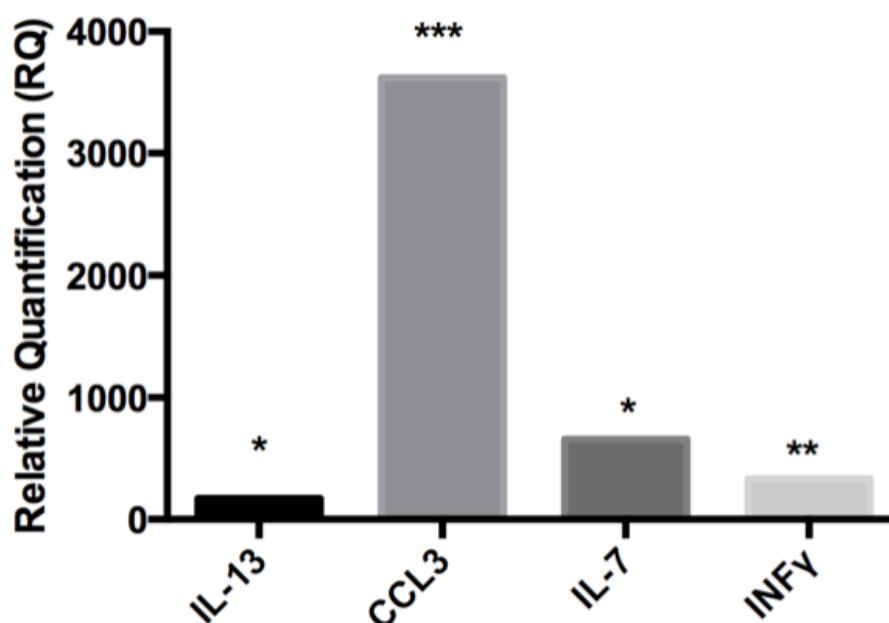


Fig.1 The relative quantification of mRNA expression: IL-13, CCL3, IL-7 and INF γ from skin's biopsies of SSc patients. SSc: systemic sclerosis. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$.

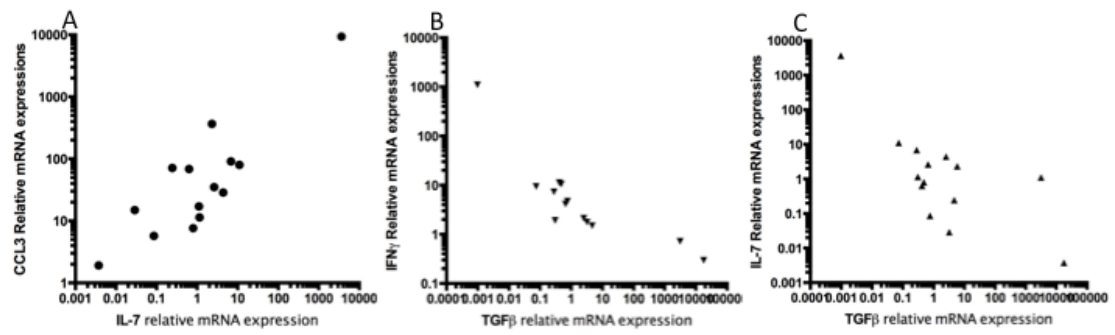


Fig.2. (A) Positive correlation between IL-7 and CCL3 relative mRNA expressions, $p < 0.005$. (B) Negative correlation between TGF β and IFN γ , and (C) between TGF β and IL-7 (respectively $p < 0.0005$ and $p < 0.05$). Values of relative mRNA expression in a logarithmic scale were used.

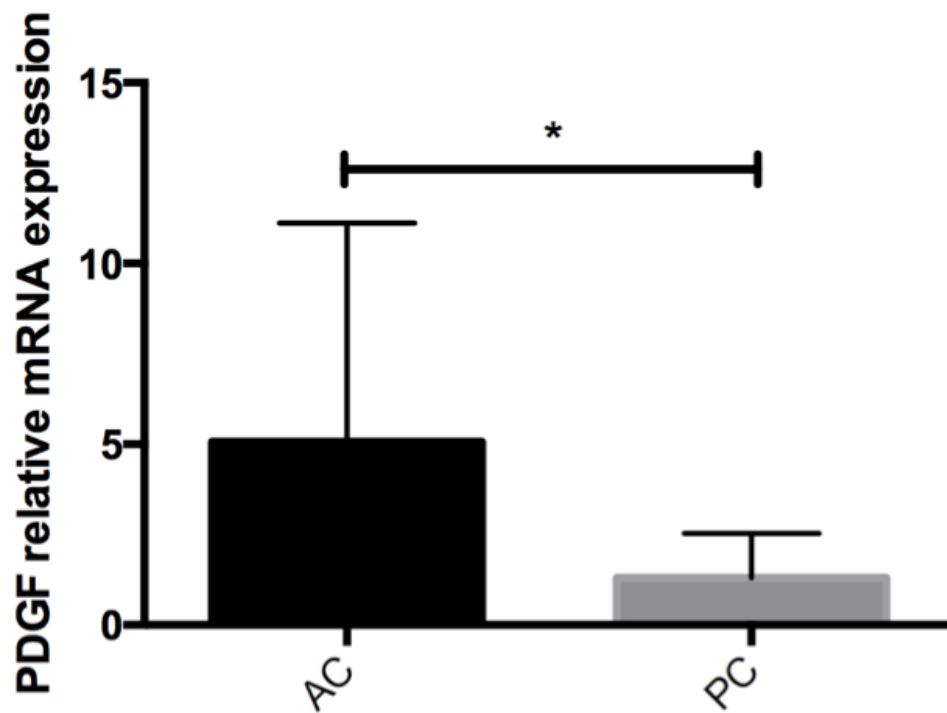


Fig.3 Relation between PDGF relative mRNA expression levels and presence of CT's changes. CT: computed tomography. AC: absence of changes. PC: presence of changes. * $p < 0.05$.

6. Discussão

Nós observamos um aumento significativo das expressões gênicas de IL-7, CCL-3, IL-13 e IFN γ em amostras de biópsia de pele de pacientes com ES quando comparadas com controles saudáveis. Não há modelo experimental ideal para estudar a fibrose da ES, e para tanto, este resultado é importante no intuito de ajudar tanto nos desenhos de estudos *in vitro*, como também sugerir que estas moléculas podem ser usadas como biomarcadores de doença, ou até mesmo como alvo terapêutico. *Wu et al.*(194) analisaram a expressão de mRNA de sete moléculas, mas apenas encontrou significância estatística em CTGF, COL1A e Cad-11. *Zhou et al.* (193) também mensuraram a expressão relativa de mRNA extraído de pele, e seus resultados evidenciaram aumento significativo em IL-17, IL-21, IL-22, IL-4, IFN γ e TGF- β . Nenhum destes estudos observou a relação de CCL3, IFN γ , IL-7 e IL-13 que o nosso estudo sugere.

Interessante ressaltar que *Zhou et al.* (193) evidenciaram aumento significativo do TGF- β , enquanto o nosso estudo e o de *Wu et al.*(194) não observaram essa significância. Para a IL-17 e a IL-22, diferente do resultado encontrado por Zhou et al. (193), não houve expressão de mRNA pois os níveis de expressão foram aquém do limite de detecção da reação de RT-PCR. Outro estudo avaliou a expressão de IL-22 em ES sem o uso de cultura de células, e também não conseguiu obter a expressão desta molécula; no entanto, ao fazer a estimulação, foi observada expressão de IL-22 (206). Uma possível explicação para a ausência de expressão na amostra baseia-se na possibilidade de que na amostra de pele *ex vivo*, sem estimulação, o transcrito já não estava mais na forma de mRNA, e sim, como proteína, uma vez que observamos que o fator de transcrição da via Th17 (RORc) encontra-se expresso; alternativamente a expressão pode não ter sido obtida por interferências da epigenética, ou seja, pela presença de metilações, de miRNA, entre outras.

A correlação entre os níveis de TGF- β e IL-7 já é bem estabelecido em sobrenadantes de cultura de células (146-148). No nosso estudo, esta relação de *down-regulation* foi mais uma vez corroborada (Apêndice 1). Smad7 é o membro da família Smad com o melhor efeito inibitório. IL-7 estimula a

produção de Smad7, que inibe a fosforilação do TGF- β -mediada de Smad2/3, e compete com a ligação de Smad2/3 ao receptor de TGF- β . Esta também induz rapidamente a expressão do mRNA (ácido ribonucléico mensageiro) Smad7, sugerindo também um *loop* de *feedback* negativo no controle da sinalização de TGF- β . *Poosti et al.* publicaram em 2014 um trabalho onde foi utilizada terapia com IFN γ peguado em fibrose renal, com boa resposta na atenuação da fibrose (153). O IFN γ também tem relação antagônica com o TGF- β (152, 207) em sobrenadantes de cultura de células, e o nosso trabalho também sugere este mesmo resultado, porém não há estudos publicados que evidenciem como ocorre esta sinalização na pele.

Não há dados publicados, relacionados à ES, que justifiquem a correlação entre IL-7 e CCL3 encontrada neste presente estudo. No entanto, *Damàs et al.*, em um estudo sobre angina, mostrou que IL-7 aumenta a expressão de várias quimiocinas inflamatórias em células mononucleares do sangue periférico de indivíduos saudáveis e portadores de angina, e que a CCL3 é responsável por estimular ainda mais a liberação de IL-7 pelas plaquetas (196). Seria possível, pois, que esse mesmo mecanismo inflamatório esteja presente na ES. Outros estudos publicados confirmam o potencial tanto da IL-7 (197-199, 201) como do CCL3 (198-203) na estimulação inflamatória do sistema cardiovascular. Portanto, a IL-7, por ser uma citocina pluripotente, poderia ao mesmo tempo ter um papel potencial no aumento do risco cardiovascular (196), e ter um papel antifibrótico na ES.

Sabidamente, a IL-13 reduz produção de CCL3, e ambas as expressões encontraram-se aumentadas neste estudo. Um provável mecanismo de *feedback* negativo poderá estar ocorrendo entre estas duas moléculas, de tal forma que a IL-13 pode estar aumentada na tentativa de reduzir a produção de CCL3, que pode, por sua vez, estar aumentada por estímulo da IL-7 (como mostra o Apêndice 1).

A análise de correlação entre as expressões de IL-13 e CTGF tiveram uma tendência significativa inversamente proporcional. Estes resultados remetem ao pensamento de que, apesar das duas moléculas terem papéis pro-fibróticos na doença, o CTGF teria um papel inflamatório importante na ES, assim como a IL-13 teria o seu papel anti-inflamatório na mesma doença.

Este pensamento é corroborado por Murray *et al.* em um estudo *in vitro* de modelo de fibrose pulmonar, observou que a IL-13 sozinha não é capaz de induzir fibrose (205). Xie *et al.* observaram que IL-4 e IL-13 (citocinas da via Th2) reduziram a expressão gênica de CTGF estimulada por TGF- β 1. Isso ocorreu através da inibição da ativação de Smad2/3 (que estimula TGF- β) pela IL-13 (118).

Alterações fibróticas pulmonares representam impacto importante na sobrevida dos pacientes. Charni *et al.*, foram os primeiros a obterem um resultado de *down-regulation* entre TGF- β e PDGF (204). Como é sabido que o TGF- β está implicado na indução da fibrose pulmonar (208, 209), esse achado poderia justificar a redução de expressão gênica do PDGF nos pacientes que tinham alterações pulmonares na tomografia computadorizada.

Tisato e colaboradores avaliaram algumas moléculas com papéis inflamatórios na síndrome metabólica, e observaram que havia aumento de IL-6 e redução de PDGF (195). Liu *et al.* mostraram que em câncer de pulmão houve uma relação de *up-regulation* da via de sinalização da IL-6 com o TGF- β , e como observado por Charni, o TGF- β tem relação de *down-regulation* com PDGF. A explicação para a correlação estatística dos níveis expressos de IL-6 com os do PDGF é ainda incompreendida, visto que ambas são moléculas envolvidas na fibrose. No entanto conforme os resultados anteriormente citados e o resultado deste presente trabalho, corroboram para o raciocínio da presença de interações dessas vias de sinalização, de maneira que o PDGF pode ser *down-regulated* tanto pelo TGF- β como pela IL-6.

7. Conclusão

O aumento significativo da expressão de CCL3, IL-7, IFN γ e IL-13 na pele do paciente com ES, ratifica a hipótese da participação dessas moléculas na fisiopatologia da ES. Esse é um dado importante pois permite desenvolvimento de melhores modelos de estudos *in vitro*, e sugere potenciais biomarcadores de doença e alvos terapêuticos.

A correlação inversa da IL-7, bem como do IFN γ , com o TGF- β corrobora ainda mais para o possível papel anti-fibrótico destas duas moléculas, tornando-as por tanto, importantes alvos para desenvolvimento de terapias.

A explicação para a correlação entre a IL-7 e CCL3 na fisiopatologia da ES ainda não está estabelecida, mas a existência na literatura de estudos que evidenciam a interação dessas duas moléculas na inflamação do sistema cardiovascular, e os achados da correlação positiva entre essas citocinas em nosso estudo, sugere que uma melhor elucidação desta associação na fisiopatologia da fibrose na ES deve ser priorizada.

8. Perspectivas

No projeto do doutorado será feita avaliação da atividade imunomoduladora e antifibrótica de estatinas em células mononucleadas do sangue periférico e em fibroblastos de biópsias cutânea de pacientes portadores de ES.

As estatinas constituem uma estabelecida classe de medicamentos, já utilizadas no tratamento de dislipidemias e com comprovado efeito na redução do risco cardiovascular. Evidências recentes têm sugerido uma potencial ação anti-inflamatória, imunomoduladora e antifibrótica, efeitos esses de extrema importância no controle de doenças autoimunes, como a Esclerose Sistêmica.

Tendo em vista o perfil de segurança desses medicamentos e o relativo baixo custo, a comprovação de benefícios do uso de estatinas na ES representa um importante avanço no tratamento da doença.

REFERÊNCIAS

1. Matucci-Cerinic M, Steen V, Nash P, Hachulla E. The complexity of managing systemic sclerosis: screening and diagnosis. *Rheumatology*. 2009;48 Suppl 3:iii8-13.
2. Katsumoto TR, Whitfield ML, Connolly MK. The pathogenesis of systemic sclerosis. *Annual review of pathology*. 2011;6:509-37.
3. Balbir-Gurman A, Braun-Moscovici Y. Scleroderma - new aspects in pathogenesis and treatment. *Best practice & research Clinical rheumatology*. 2012;26(1):13-24.
4. Chiffot H, Fautrel B, Sordet C, Chatelus E, Sibilia J. Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2008;37(4):223-35.
5. Silman AJ. Scleroderma--demographics and survival. *The Journal of rheumatology Supplement*. 1997;48:58-61.
6. Barnes J, Mayes MD. Epidemiology of systemic sclerosis: incidence, prevalence, survival, risk factors, malignancy, and environmental triggers. *Current opinion in rheumatology*. 2012;24(2):165-70.
7. Aden N, Nuttall A, Shiwen X, de Winter P, Leask A, Black CM, et al. Epithelial cells promote fibroblast activation via IL-1alpha in systemic sclerosis. *The Journal of investigative dermatology*. 2010;130(9):2191-200.
8. Mayes MD, Lacey JV, Jr., Beebe-Dimmer J, Gillespie BW, Cooper B, Laing TJ, et al. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis and rheumatism*. 2003;48(8):2246-55.
9. Ferri C, Valentini G, Cozzi F, Sebastiani M, Michelassi C, La Montagna G, et al. Systemic sclerosis: demographic, clinical, and serologic features and survival in 1,012 Italian patients. *Medicine*. 2002;81(2):139-53.
10. Dieude P, Boileau C, Allanore Y. Immunogenetics of systemic sclerosis. *Autoimmunity reviews*. 2011;10(5):282-90.
11. Arora-Singh RK, Assassi S, del Junco DJ, Arnett FC, Perry M, Irfan U, et al. Autoimmune diseases and autoantibodies in the first degree relatives of patients with systemic sclerosis. *Journal of autoimmunity*. 2010;35(1):52-7.
12. Allanore Y, Dieude P, Boileau C. Genetic background of systemic sclerosis: autoimmune genes take centre stage. *Rheumatology*. 2010;49(2):203-10.
13. Tsuchiya N, Kuroki K, Fujimoto M, Murakami Y, Tedder TF, Tokunaga K, et al. Association of a functional CD19 polymorphism with susceptibility to systemic sclerosis. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(12):4002-7.
14. Schwinzer R, Witte T, Hundrieser J, Ehlers S, Momot T, Hunzelmann N, et al. Enhanced frequency of a PTPRC (CD45) exon A mutation (77C-->G) in systemic sclerosis. *Genes and immunity*. 2003;4(2):168-9.
15. Rueda B, Broen J, Simeon C, Hesselstrand R, Diaz B, Suarez H, et al. The STAT4 gene influences the genetic predisposition to systemic sclerosis phenotype. *Human molecular genetics*. 2009;18(11):2071-7.
16. Zhou X, Tan FK, Reveille JD, Wallis D, Milewicz DM, Ahn C, et al. Association of novel polymorphisms with the expression of SPARC in normal fibroblasts and with susceptibility to scleroderma. *Arthritis and rheumatism*. 2002;46(11):2990-9.
17. Tan FK, Wang N, Kuwana M, Chakraborty R, Bona CA, Milewicz DM, et al. Association of fibrillin 1 single-nucleotide polymorphism haplotypes with

- systemic sclerosis in Choctaw and Japanese populations. *Arthritis and rheumatism*. 2001;44(4):893-901.
18. Rodnan GP, Benedek TG. An historical account of the study of progressive systemic sclerosis (diffuse scleroderma). *Annals of internal medicine*. 1962;57:305-19.
 19. Seibold JR SE, Leroy C & Steen VD. Systemic sclerosis. In: limited M-ybE, editor. *Rheumatology*. London UK1994.
 20. Klemperer P PAD, Baehr G. Diffuse Collagen Disease. *Jama*. 1942;119(4):331.
 21. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA, Jr., et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *The Journal of rheumatology*. 1988;15(2):202-5.
 22. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. *Arthritis and rheumatism*. 1980;23(5):581-90.
 23. Steen V, Medsger TA, Jr. Predictors of isolated pulmonary hypertension in patients with systemic sclerosis and limited cutaneous involvement. *Arthritis and rheumatism*. 2003;48(2):516-22.
 24. Steen V. Predictors of end stage lung disease in systemic sclerosis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2003;62(2):97-9.
 25. Nitsche A. Raynaud, digital ulcers and calcinosis in scleroderma. *Reumatologia clinica*. 2012;8(5):270-7.
 26. Garza-Rodriguez V, Villarreal-Alarcon MA, Ocampo-Candiani J. [Scleroderma: an update on the pathogenesis and treatment]. *Revista medica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 2013;51(1):50-7.
 27. Bertazzi GR, de Toledo RA, de Godoy MF, Geraldino GC, Fernandes GC, Polizelli DV, et al. [Skin manifestation in systemic sclerosis]. *Acta reumatologica portuguesa*. 2010;35(2):184-90.
 28. Abe M, Yokoyama Y, Amano H, Matsushima Y, Kan C, Ishikawa O. Effect of activated human mast cells and mast cell-derived mediators on proliferation, type I collagen production and glycosaminoglycans synthesis by human dermal fibroblasts. *European journal of dermatology : EJD*. 2002;12(4):340-6.
 29. Fischer DJ, Patton LL. Scleroderma: oral manifestations and treatment challenges. *Special care in dentistry : official publication of the American Association of Hospital Dentists, the Academy of Dentistry for the Handicapped, and the American Society for Geriatric Dentistry*. 2000;20(6):240-4.
 30. Clements P, Lachenbruch P, Siebold J, White B, Weiner S, Martin R, et al. Inter and intraobserver variability of total skin thickness score (modified Rodnan TSS) in systemic sclerosis. *The Journal of rheumatology*. 1995;22(7):1281-5.
 31. Nay J, Menias CO, Mellnick VM, Balfe DM. Gastrointestinal manifestations of systemic disease: a multimodality review. *Abdominal imaging*. 2014.
 32. D'Angelo WA, Fries JF, Masi AT, Shulman LE. Pathologic observations in systemic sclerosis (scleroderma). A study of fifty-eight autopsy cases and fifty-eight matched controls. *The American journal of medicine*. 1969;46(3):428-40.
 33. Chang B, Wigley FM, White B, Wise RA. Scleroderma patients with combined pulmonary hypertension and interstitial lung disease. *The Journal of rheumatology*. 2003;30(11):2398-405.

34. Steen VD, Powell DL, Medsger TA, Jr. Clinical correlations and prognosis based on serum autoantibodies in patients with systemic sclerosis. *Arthritis and rheumatism*. 1988;31(2):196-203.
35. Highland KB. Recent advances in scleroderma-associated pulmonary hypertension. *Current opinion in rheumatology*. 2014;26(6):637-45.
36. Lambova S. Cardiac manifestations in systemic sclerosis. *World journal of cardiology*. 2014;6(9):993-1005.
37. Steen VD, Medsger TA, Jr., Osial TA, Jr., Ziegler GL, Shapiro AP, Rodnan GP. Factors predicting development of renal involvement in progressive systemic sclerosis. *The American journal of medicine*. 1984;76(5):779-86.
38. Steen VD, Medsger TA, Jr. Severe organ involvement in systemic sclerosis with diffuse scleroderma. *Arthritis and rheumatism*. 2000;43(11):2437-44.
39. Visconti L, Atteritano M, Buemi M, Santoro D. [Renal and extra-renal involvement in sclerodermia]. *Giornale italiano di nefrologia : organo ufficiale della Societa italiana di nefrologia*. 2014;31(5).
40. Lorand V, Czirkjak L, Minier T. Musculoskeletal involvement in systemic sclerosis. *Presse medicale*. 2014;43(10 Pt 2):e315-28.
41. Wu M, Melichian DS, Chang E, Warner-Blankenship M, Ghosh AK, Varga J. Rosiglitazone abrogates bleomycin-induced scleroderma and blocks profibrotic responses through peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *The American journal of pathology*. 2009;174(2):519-33.
42. Bagnato G, Bitto A, Pizzino G, Irrera N, Sangari D, Cinquegrani M, et al. Simvastatin attenuates the development of pulmonary and cutaneous fibrosis in a murine model of systemic sclerosis. *Rheumatology*. 2013;52(8):1377-86.
43. Blom IE, Goldschmeding R, Leask A. Gene regulation of connective tissue growth factor: new targets for antifibrotic therapy? *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2002;21(6):473-82.
44. Charles C, Clements P, Furst DE. Systemic sclerosis: hypothesis-driven treatment strategies. *Lancet*. 2006;367(9523):1683-91.
45. Lam AP, Gottardi CJ. beta-catenin signaling: a novel mediator of fibrosis and potential therapeutic target. *Current opinion in rheumatology*. 2011;23(6):562-7.
46. Distler O, Pap T, Kowal-Bielecka O, Meyringer R, Guiducci S, Landthaler M, et al. Overexpression of monocyte chemoattractant protein 1 in systemic sclerosis: role of platelet-derived growth factor and effects on monocyte chemotaxis and collagen synthesis. *Arthritis and rheumatism*. 2001;44(11):2665-78.
47. Hunzelmann N, Brinckmann J. What are the new milestones in the pathogenesis of systemic sclerosis? *Annals of the rheumatic diseases*. 2010;69 Suppl 1:i52-6.
48. Kraling BM, Maul GG, Jimenez SA. Mononuclear cellular infiltrates in clinically involved skin from patients with systemic sclerosis of recent onset predominantly consist of monocytes/macrophages. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*. 1995;63(1):48-56.
49. Hasegawa M, Sato S, Takehara K. Augmented production of chemokines (monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) and MIP-1beta) in patients with systemic sclerosis: MCP-1 and MIP-1alpha may be involved in the development of pulmonary fibrosis. *Clinical and experimental immunology*. 1999;117(1):159-65.

50. Eckes B, Zigrino P, Kessler D, Holtkotter O, Shephard P, Mauch C, et al. Fibroblast-matrix interactions in wound healing and fibrosis. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2000;19(4):325-32.
51. Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *The Journal of pathology*. 2003;200(4):500-3.
52. Chen Y, Shi-Wen X, van Beek J, Kennedy L, McLeod M, Renzoni EA, et al. Matrix contraction by dermal fibroblasts requires transforming growth factor-beta/activin-linked kinase 5, heparan sulfate-containing proteoglycans, and MEK/ERK: insights into pathological scarring in chronic fibrotic disease. *The American journal of pathology*. 2005;167(6):1699-711.
53. Whitfield ML, Finlay DR, Murray JI, Troyanskaya OG, Chi JT, Pergamenschikov A, et al. Systemic and cell type-specific gene expression patterns in scleroderma skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(21):12319-24.
54. Rajkumar VS, Howell K, Csiszar K, Denton CP, Black CM, Abraham DJ. Shared expression of phenotypic markers in systemic sclerosis indicates a convergence of pericytes and fibroblasts to a myofibroblast lineage in fibrosis. *Arthritis research & therapy*. 2005;7(5):R1113-23.
55. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *The American journal of pathology*. 2007;170(6):1807-16.
56. Abraham DJ, Eckes B, Rajkumar V, Krieg T. New developments in fibroblast and myofibroblast biology: implications for fibrosis and scleroderma. *Current rheumatology reports*. 2007;9(2):136-43.
57. Liu S, Taghavi R, Leask A. Connective tissue growth factor is induced in bleomycin-induced skin scleroderma. *Journal of cell communication and signaling*. 2010;4(1):25-30.
58. Willis BC, duBois RM, Borok Z. Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2006;3(4):377-82.
59. Kuwana M, Okazaki Y, Yasuoka H, Kawakami Y, Ikeda Y. Defective vasculogenesis in systemic sclerosis. *Lancet*. 2004;364(9434):603-10.
60. Allanore Y, Batteux F, Avouac J, Assous N, Weill B, Kahan A. Levels of circulating endothelial progenitor cells in systemic sclerosis. *Clinical and experimental rheumatology*. 2007;25(1):60-6.
61. Bellini A, Mattoli S. The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2007;87(9):858-70.
62. Distler JH, Jungel A, Pilecky M, Zwerina J, Michel BA, Gay RE, et al. Hypoxia-induced increase in the production of extracellular matrix proteins in systemic sclerosis. *Arthritis and rheumatism*. 2007;56(12):4203-15.
63. Hong KH, Yoo SA, Kang SS, Choi JJ, Kim WU, Cho CS. Hypoxia induces expression of connective tissue growth factor in scleroderma skin fibroblasts. *Clinical and experimental immunology*. 2006;146(2):362-70.
64. Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, Shrimanker N, Akai Y, Hohenstein B, et al. Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(12):3810-20.

65. Baraut J, Michel L, Verrecchia F, Farge D. Relationship between cytokine profiles and clinical outcomes in patients with systemic sclerosis. *Autoimmunity reviews*. 2010;10(2):65-73.
66. Chizzolini C, Brembilla NC, Montanari E, Truchetet ME. Fibrosis and immune dysregulation in systemic sclerosis. *Autoimmunity reviews*. 2011;10(5):276-81.
67. Matsushita T, Hasegawa M, Hamaguchi Y, Takehara K, Sato S. Longitudinal analysis of serum cytokine concentrations in systemic sclerosis: association of interleukin 12 elevation with spontaneous regression of skin sclerosis. *The Journal of rheumatology*. 2006;33(2):275-84.
68. Fry TJ, Mackall CL. Interleukin-7: from bench to clinic. *Blood*. 2002;99(11):3892-904.
69. Zhang L, Keane MP, Zhu LX, Sharma S, Rozengurt E, Strieter RM, et al. Interleukin-7 and transforming growth factor-beta play counter-regulatory roles in protein kinase C-delta-dependent control of fibroblast collagen synthesis in pulmonary fibrosis. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(27):28315-9.
70. Varga JA, Trojanowska M. Fibrosis in systemic sclerosis. *Rheumatic diseases clinics of North America*. 2008;34(1):115-43; vii.
71. Klareskog L, Gustafsson R, Scheynius A, Hallgren R. Increased expression of platelet-derived growth factor type B receptors in the skin of patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 1990;33(10):1534-41.
72. Ludwicka A, Ohba T, Trojanowska M, Yamakage A, Strange C, Smith EA, et al. Elevated levels of platelet derived growth factor and transforming growth factor-beta 1 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with scleroderma. *J Rheumatol*. 1995;22(10):1876-83.
73. Baroni SS, Santillo M, Bevilacqua F, Luchetti M, Spadoni T, Mancini M, et al. Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. *N Engl J Med*. 2006;354(25):2667-76.
74. Sato S, Nagaoka T, Hasegawa M, Tamatani T, Nakanishi T, Takigawa M, et al. Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. *The Journal of rheumatology*. 2000;27(1):149-54.
75. Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, Sato S, Ihn H, Grotendorst GR, et al. Significant correlation between connective tissue growth factor gene expression and skin sclerosis in tissue sections from patients with systemic sclerosis. *The Journal of investigative dermatology*. 1995;105(2):280-4.
76. Leask A, Abraham DJ. The role of connective tissue growth factor, a multifunctional matricellular protein, in fibroblast biology. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*. 2003;81(6):355-63.
77. Bandinelli F, Del Rosso A, Gabrielli A, Giacomelli R, Bartoli F, Guiducci S, 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*. 2012;30(2 Suppl 71):S44-9.
78. Hasegawa M, Fujimoto M, Kikuchi K, Takehara K. Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. *The Journal of rheumatology*. 1997;24(2):328-32.
79. Fichtner-Feigl S, Fuss IJ, Young CA, Watanabe T, Geissler EK, Schlitt HJ, et al. Induction of IL-13 triggers TGF-beta1-dependent tissue fibrosis in chronic

- 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid colitis. *Journal of immunology*. 2007;178(9):5859-70.
80. Jinnin M, Ihn H, Yamane K, Tamaki K. Interleukin-13 stimulates the transcription of the human $\alpha 2(I)$ collagen gene in human dermal fibroblasts. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(40):41783-91.
 81. Fuschiotti P. CD8+ T cells in systemic sclerosis. *Immunologic research*. 2011;50(2-3):188-94.
 82. Medsger TA, Jr., Ivanco DE, Kardava L, Morel PA, Lucas MR, Fuschiotti P. GATA-3 up-regulation in CD8+ T cells as a biomarker of immune dysfunction in systemic sclerosis, resulting in excessive interleukin-13 production. *Arthritis and rheumatism*. 2011;63(6):1738-47.
 83. Huang M, Sharma S, Zhu LX, Keane MP, Luo J, Zhang L, et al. IL-7 inhibits fibroblast TGF-beta production and signaling in pulmonary fibrosis. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109(7):931-7.
 84. Schmidt K, Martinez-Gamboa L, Meier S, Witt C, Meisel C, Hanitsch LG, et al. Bronchoalveolar lavage fluid cytokines and chemokines as markers and predictors for the outcome of interstitial lung disease in systemic sclerosis patients. *Arthritis research & therapy*. 2009;11(4):R111.
 85. Kurasawa K, Hirose K, Sano H, Endo H, Shinkai H, Nawata Y, et al. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis and rheumatism*. 2000;43(11):2455-63.
 86. Murata M, Fujimoto M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K, et al. Clinical association of serum interleukin-17 levels in systemic sclerosis: is systemic sclerosis a Th17 disease? *Journal of dermatological science*. 2008;50(3):240-2.
 87. Mathian A, Parizot C, Dorgham K, Trad S, Arnaud L, Larsen M, et al. Activated and resting regulatory T cell exhaustion concurs with high levels of interleukin-22 expression in systemic sclerosis lesions. *Annals of the rheumatic diseases*. 2012;71(7):1227-34.
 88. Truchetet ME, Brembilla NC, Montanari E, Allanore Y, Chizzolini C. Increased frequency of circulating Th22 in addition to Th17 and Th2 lymphocytes in systemic sclerosis: association with interstitial lung disease. *Arthritis research & therapy*. 2011;13(5):R166.
 89. de Oliveira CM, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomao R. Cytokines and pain. *Revista brasileira de anesthesiologia*. 2011;61(2):255-9, 60-5, 137-42.
 90. Wahl SM. Transforming growth factor-beta: innately bipolar. *Current opinion in immunology*. 2007;19(1):55-62.
 91. Roberts AB, Russo A, Felici A, Flanders KC. Smad3: a key player in pathogenetic mechanisms dependent on TGF-beta. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2003;995:1-10.
 92. Kawakami T, Ihn H, Xu W, Smith E, LeRoy C, Trojanowska M. Increased expression of TGF-beta receptors by scleroderma fibroblasts: evidence for contribution of autocrine TGF-beta signaling to scleroderma phenotype. *The Journal of investigative dermatology*. 1998;110(1):47-51.
 93. Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2004;18(7):816-27.
 94. Hoyles RK, Derrett-Smith EC, Khan K, Shiwen X, Howat SL, Wells AU, et al. An essential role for resident fibroblasts in experimental lung fibrosis is defined

- by lineage-specific deletion of high-affinity type II transforming growth factor beta receptor. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2011;183(2):249-61.
95. Li M, Krishnaveni MS, Li C, Zhou B, Xing Y, Banfalvi A, et al. Epithelium-specific deletion of TGF-beta receptor type II protects mice from bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(1):277-87.
 96. Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature*. 1994;370(6488):341-7.
 97. Johnson K, Kirkpatrick H, Comer A, Hoffmann FM, Laughon A. Interaction of Smad complexes with tripartite DNA-binding sites. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(29):20709-16.
 98. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 2003;113(6):685-700.
 99. Ghosh AK, Varga J. The transcriptional coactivator and acetyltransferase p300 in fibroblast biology and fibrosis. *Journal of cellular physiology*. 2007;213(3):663-71.
 100. Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annual review of biochemistry*. 1998;67:753-91.
 101. Mori Y, Chen SJ, Varga J. Expression and regulation of intracellular SMAD signaling in scleroderma skin fibroblasts. *Arthritis and rheumatism*. 2003;48(7):1964-78.
 102. Dong C, Zhu S, Wang T, Yoon W, Li Z, Alvarez RJ, et al. Deficient Smad7 expression: a putative molecular defect in scleroderma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(6):3908-13.
 103. Pannu J, Gore-Hyer E, Yamanaka M, Smith EA, Rubinchik S, Dong JY, et al. An increased transforming growth factor beta receptor type I:type II ratio contributes to elevated collagen protein synthesis that is resistant to inhibition via a kinase-deficient transforming growth factor beta receptor type II in scleroderma. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(5):1566-77.
 104. Wu M, Melichian DS, de la Garza M, Gruner K, Bhattacharyya S, Barr L, et al. Essential roles for early growth response transcription factor Egr-1 in tissue fibrosis and wound healing. *The American journal of pathology*. 2009;175(3):1041-55.
 105. Bhattacharyya S, Wu M, Fang F, Tourtellotte W, Feghali-Bostwick C, Varga J. Early growth response transcription factors: key mediators of fibrosis and novel targets for anti-fibrotic therapy. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2011;30(4):235-42.
 106. Bhattacharyya S, Chen SJ, Wu M, Warner-Blankenship M, Ning H, Lakos G, et al. Smad-independent transforming growth factor-beta regulation of early growth response-1 and sustained expression in fibrosis: implications for scleroderma. *The American journal of pathology*. 2008;173(4):1085-99.
 107. Chen SJ, Ning H, Ishida W, Sodin-Semrl S, Takagawa S, Mori Y, et al. The early-immediate gene EGR-1 is induced by transforming growth factor-beta and mediates stimulation of collagen gene expression. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(30):21183-97.

108. Hubmacher D, Tiedemann K, Reinhardt DP. Fibrillins: from biogenesis of microfibrils to signaling functions. *Current topics in developmental biology*. 2006;75:93-123.
109. Denton CP, Merkel PA, Furst DE, Khanna D, Emery P, Hsu VM, et al. Recombinant human anti-transforming growth factor beta1 antibody therapy in systemic sclerosis: a multicenter, randomized, placebo-controlled phase I/II trial of CAT-192. *Arthritis and rheumatism*. 2007;56(1):323-33.
110. Santiago B, Gutierrez-Canas I, Dotor J, Palao G, Lasarte JJ, Ruiz J, et al. Topical application of a peptide inhibitor of transforming growth factor-beta1 ameliorates bleomycin-induced skin fibrosis. *The Journal of investigative dermatology*. 2005;125(3):450-5.
111. Trojanowska M, Varga J. Molecular pathways as novel therapeutic targets in systemic sclerosis. *Current opinion in rheumatology*. 2007;19(6):568-73.
112. Wei J, Ghosh AK, Sargent JL, Komura K, Wu M, Huang QQ, et al. PPARgamma downregulation by TGFss in fibroblast and impaired expression and function in systemic sclerosis: a novel mechanism for progressive fibrogenesis. *PloS one*. 2010;5(11):e13778.
113. Skhirtladze C, Distler O, Dees C, Akhmetshina A, Busch N, Venalis P, et al. Src kinases in systemic sclerosis: central roles in fibroblast activation and in skin fibrosis. *Arthritis and rheumatism*. 2008;58(5):1475-84.
114. Kubota S, Takigawa M. Cellular and molecular actions of CCN2/CTGF and its role under physiological and pathological conditions. *Clinical science*. 2015;128(3):181-96.
115. Cozzolino M, Biondi ML, Banfi E, Riser BL, Mehmeti F, Cusi D, et al. CCN2 (CTGF) gene polymorphism is a novel prognostic risk factor for cardiovascular outcomes in hemodialysis patients. *Blood purification*. 2010;30(4):272-6.
116. Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts. *Cytokine & growth factor reviews*. 1997;8(3):171-9.
117. Duncan MR, Frazier KS, Abramson S, Williams S, Klapper H, Huang X, et al. Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1999;13(13):1774-86.
118. Xie S, Sukkar MB, Issa R, Oltmanns U, Nicholson AG, Chung KF. Regulation of TGF-beta 1-induced connective tissue growth factor expression in airway smooth muscle cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2005;288(1):L68-76.
119. Frazier K, Williams S, Kothapalli D, Klapper H, Grotendorst GR. Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *The Journal of investigative dermatology*. 1996;107(3):404-11.
120. Bruno G, Cencetti F, Pertici I, Japtok L, Bernacchioni C, Donati C, et al. CTGF/CCN2 exerts profibrotic action in myoblasts via the up-regulation of sphingosine kinase-1/S1P signaling axis: Implications in the action mechanism of TGFbeta. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1851(2):194-202.
121. Dziadzio M, Usinger W, Leask A, Abraham D, Black CM, Denton C, et al. N-terminal connective tissue growth factor is a marker of the fibrotic phenotype in scleroderma. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*. 2005;98(7):485-92.

122. Bonner JC. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine & growth factor reviews*. 2004;15(4):255-73.
123. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiological reviews*. 1999;79(4):1283-316.
124. Noskovicova N, Petrek M, Eickelberg O, Heinzelmann K. PDGF Signaling in the Lung - From Lung Development and Disease to Clinical Studies. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2014.
125. Rhee S, Grinnell F. P21-activated kinase 1: convergence point in PDGF- and LPA-stimulated collagen matrix contraction by human fibroblasts. *The Journal of cell biology*. 2006;172(3):423-32.
126. Jinnin M, Ihn H, Mimura Y, Asano Y, Yamane K, Tamaki K. Regulation of fibrogenic/fibrolytic genes by platelet-derived growth factor C, a novel growth factor, in human dermal fibroblasts. *Journal of cellular physiology*. 2005;202(2):510-7.
127. Borkham-Kamphorst E, Herrmann J, Stoll D, Treptau J, Gressner AM, Weiskirchen R. Dominant-negative soluble PDGF-beta receptor inhibits hepatic stellate cell activation and attenuates liver fibrosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2004;84(6):766-77.
128. Chen YT, Chang FC, Wu CF, Chou YH, Hsu HL, Chiang WC, et al. Platelet-derived growth factor receptor signaling activates pericyte-myofibroblast transition in obstructive and post-ischemic kidney fibrosis. *Kidney international*. 2011;80(11):1170-81.
129. Rajkumar VS, Sundberg C, Abraham DJ, Rubin K, Black CM. Activation of microvascular pericytes in autoimmune Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis. *Arthritis and rheumatism*. 1999;42(5):930-41.
130. Distler JH, Akhmetshina A, Schett G, Distler O. Monocyte chemoattractant proteins in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Rheumatology*. 2009;48(2):98-103.
131. Zhang Y, McCormick LL, Desai SR, Wu C, Gilliam AC. Murine sclerodermatous graft-versus-host disease, a model for human scleroderma: cutaneous cytokines, chemokines, and immune cell activation. *Journal of immunology*. 2002;168(6):3088-98.
132. Sato S. Abnormalities of adhesion molecules and chemokines in scleroderma. *Current opinion in rheumatology*. 1999;11(6):503-7.
133. Ma B, Zhu Z, Homer RJ, Gerard C, Strieter R, Elias JA. The C10/CCL6 chemokine and CCR1 play critical roles in the pathogenesis of IL-13-induced inflammation and remodeling. *Journal of immunology*. 2004;172(3):1872-81.
134. Sutherland GR, Baker E, Fernandez KE, Callen DF, Goodwin RG, Lupton S, et al. The gene for human interleukin 7 (IL7) is at 8q12-13. *Human genetics*. 1989;82(4):371-2.
135. Morrissey PJ, Goodwin RG, Nordan RP, Anderson D, Grabstein KH, Cosman D, et al. Recombinant interleukin 7, pre-B cell growth factor, has costimulatory activity on purified mature T cells. *The Journal of experimental medicine*. 1989;169(3):707-16.
136. Takeda S, Gillis S, Palacios R. In vitro effects of recombinant interleukin 7 on growth and differentiation of bone marrow pro-B- and pro-T-lymphocyte clones and fetal thymocyte clones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86(5):1634-8.

137. Chantry D, Turner M, Feldmann M. Interleukin 7 (murine pre-B cell growth factor/lymphopoietin 1) stimulates thymocyte growth: regulation by transforming growth factor beta. *European journal of immunology*. 1989;19(4):783-6.
138. Murray R, Suda T, Wrighton N, Lee F, Zlotnik A. IL-7 is a growth and maintenance factor for mature and immature thymocyte subsets. *International immunology*. 1989;1(5):526-31.
139. Puel A, Ziegler SF, Buckley RH, Leonard WJ. Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency. *Nature genetics*. 1998;20(4):394-7.
140. Tan JT, Dudl E, LeRoy E, Murray R, Sprent J, Weinberg KI, et al. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(15):8732-7.
141. Schluns KS, Kieper WC, Jameson SC, Lefrancois L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nature immunology*. 2000;1(5):426-32.
142. Bolotin E, Annett G, Parkman R, Weinberg K. Serum levels of IL-7 in bone marrow transplant recipients: relationship to clinical characteristics and lymphocyte count. *Bone marrow transplantation*. 1999;23(8):783-8.
143. Fry TJ, Connick E, Falloon J, Lederman MM, Liewehr DJ, Spritzler J, et al. A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis. *Blood*. 2001;97(10):2983-90.
144. Napolitano LA, Grant RM, Deeks SG, Schmidt D, De Rosa SC, Herzenberg LA, et al. Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis. *Nature medicine*. 2001;7(1):73-9.
145. Lee G, Namen AE, Gillis S, Ellingsworth LR, Kincade PW. Normal B cell precursors responsive to recombinant murine IL-7 and inhibition of IL-7 activity by transforming growth factor-beta. *Journal of immunology*. 1989;142(11):3875-83.
146. Tang J, Nuccie BL, Ritterman I, Liesveld JL, Abboud CN, Ryan DH. TGF-beta down-regulates stromal IL-7 secretion and inhibits proliferation of human B cell precursors. *Journal of immunology*. 1997;159(1):117-25.
147. Dubinett SM, Huang M, Dhanani S, Economou JS, Wang J, Lee P, et al. Down-regulation of murine fibrosarcoma transforming growth factor-beta 1 expression by interleukin 7. *Journal of the National Cancer Institute*. 1995;87(8):593-7.
148. Miller AR, McBride WH, Dubinett SM, Dougherty GJ, Thacker JD, Shau H, et al. Transduction of human melanoma cell lines with the human interleukin-7 gene using retroviral-mediated gene transfer: comparison of immunologic properties with interleukin-2. *Blood*. 1993;82(12):3686-94.
149. Wei J, Bhattacharyya S, Tourtellotte WG, Varga J. Fibrosis in systemic sclerosis: emerging concepts and implications for targeted therapy. *Autoimmunity reviews*. 2011;10(5):267-75.
150. Duan H, Fleming J, Pritchard DK, Amon LM, Xue J, Arnett HA, et al. Combined analysis of monocyte and lymphocyte messenger RNA expression with serum protein profiles in patients with scleroderma. *Arthritis and rheumatism*. 2008;58(5):1465-74.
151. Dieude P, Guedj M, Wipff J, Avouac J, Fajardy I, Diot E, et al. Association between the IRF5 rs2004640 functional polymorphism and systemic sclerosis: a

- new perspective for pulmonary fibrosis. *Arthritis and rheumatism*. 2009;60(1):225-33.
152. Lindahl GE, Stock CJ, Shi-Wen X, Leoni P, Sestini P, Howat SL, et al. Microarray profiling reveals suppressed interferon stimulated gene program in fibroblasts from scleroderma-associated interstitial lung disease. *Respiratory research*. 2013;14:80.
 153. Poosti F, Bansal R, Yazdani S, Prakash J, Post E, Klok P, et al. Selective delivery of IFN-gamma to renal interstitial myofibroblasts: a novel strategy for the treatment of renal fibrosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2014.
 154. Weaver CT, Elson CO, Fouser LA, Kolls JK. The Th17 pathway and inflammatory diseases of the intestines, lungs, and skin. *Annual review of pathology*. 2013;8:477-512.
 155. Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *The New England journal of medicine*. 2009;361(9):888-98.
 156. Brembilla NC, Montanari E, Truchetet ME, Raschi E, Meroni P, Chizzolini C. Th17 cells favor inflammatory responses while inhibiting type I collagen deposition by dermal fibroblasts: differential effects in healthy and systemic sclerosis fibroblasts. *Arthritis research & therapy*. 2013;15(5):R151.
 157. Duhon T, Geiger R, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nature immunology*. 2009;10(8):857-63.
 158. Trifari S, Kaplan CD, Tran EH, Crellin NK, Spits H. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nature immunology*. 2009;10(8):864-71.
 159. Wilson MS, Madala SK, Ramalingam TR, Gochuico BR, Rosas IO, Cheever AW, et al. Bleomycin and IL-1beta-mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. *The Journal of experimental medicine*. 2010;207(3):535-52.
 160. Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*. 2006;126(6):1121-33.
 161. Eberl G, Littman DR. The role of the nuclear hormone receptor RORgammat in the development of lymph nodes and Peyer's patches. *Immunological reviews*. 2003;195:81-90.
 162. Radstake TR, van Bon L, Broen J, Hussiani A, Hesselstrand R, Wuttge DM, et al. The pronounced Th17 profile in systemic sclerosis (SSc) together with intracellular expression of TGFbeta and IFNgamma distinguishes SSc phenotypes. *PloS one*. 2009;4(6):e5903.
 163. Okamoto Y, Hasegawa M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Huu DL, Iwakura Y, et al. Potential roles of interleukin-17A in the development of skin fibrosis in mice. *Arthritis and rheumatism*. 2012;64(11):3726-35.
 164. Agarwal S, Misra R, Aggarwal A. Interleukin 17 levels are increased in juvenile idiopathic arthritis synovial fluid and induce synovial fibroblasts to produce proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases. *The Journal of rheumatology*. 2008;35(3):515-9.
 165. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and

- hematopoietic cytokines. *The Journal of experimental medicine*. 1996;183(6):2593-603.
166. Nakashima T, Jinnin M, Yamane K, Honda N, Kajihara I, Makino T, et al. Impaired IL-17 signaling pathway contributes to the increased collagen expression in scleroderma fibroblasts. *Journal of immunology*. 2012;188(8):3573-83.
 167. Truchetet ME, Brembilla NC, Montanari E, Lonati P, Raschi E, Zeni S, et al. Interleukin-17A+ cell counts are increased in systemic sclerosis skin and their number is inversely correlated with the extent of skin involvement. *Arthritis and rheumatism*. 2013;65(5):1347-56.
 168. Zurawski G, de Vries JE. Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. *Immunology today*. 1994;15(1):19-26.
 169. Burd PR, Thompson WC, Max EE, Mills FC. Activated mast cells produce interleukin 13. *The Journal of experimental medicine*. 1995;181(4):1373-80.
 170. Fuschiotti P, Larregina AT, Ho J, Feghali-Bostwick C, Medsger TA, Jr. Interleukin-13-producing CD8+ T cells mediate dermal fibrosis in patients with systemic sclerosis. *Arthritis and rheumatism*. 2013;65(1):236-46.
 171. de Waal Malefyt R, Figdor CG, Huijbens R, Mohan-Peterson S, Bennett B, Culpepper J, et al. Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN-gamma or IL-10. *Journal of immunology*. 1993;151(11):6370-81.
 172. McKenzie AN, Culpepper JA, de Waal Malefyt R, Briere F, Punnonen J, Aversa G, et al. Interleukin 13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(8):3735-9.
 173. Minty A, Chalon P, Derocq JM, Dumont X, Guillemot JC, Kaghad M, et al. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature*. 1993;362(6417):248-50.
 174. Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, McKenzie AN, Menon S, Zurawski G, et al. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(8):3730-4.
 175. Defrance T, Carayon P, Billian G, Guillemot JC, Minty A, Caput D, et al. Interleukin 13 is a B cell stimulating factor. *The Journal of experimental medicine*. 1994;179(1):135-43.
 176. Corry DB. IL-13 in allergy: home at last. *Current opinion in immunology*. 1999;11(6):610-4.
 177. McMahan ZH, Wigley FM. Novel investigational agents for the treatment of scleroderma. *Expert opinion on investigational drugs*. 2014;23(2):183-98.
 178. Zheng T, Oh MH, Oh SY, Schroeder JT, Glick AB, Zhu Z. Transgenic expression of interleukin-13 in the skin induces a pruritic dermatitis and skin remodeling. *The Journal of investigative dermatology*. 2009;129(3):742-51.
 179. Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J, et al. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *The Journal of clinical investigation*. 1999;103(6):779-88.

180. Chiaramonte MG, Donaldson DD, Cheever AW, Wynn TA. An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. *The Journal of clinical investigation*. 1999;104(6):777-85.
181. Fallon PG, Richardson EJ, McKenzie GJ, McKenzie AN. Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. *Journal of immunology*. 2000;164(5):2585-91.
182. Doucet C, Brouty-Boye D, Pottin-Clemenceau C, Canonica GW, Jasmin C, Azzarone B. Interleukin (IL) 4 and IL-13 act on human lung fibroblasts. Implication in asthma. *The Journal of clinical investigation*. 1998;101(10):2129-39.
183. Rankin AL, Mumm JB, Murphy E, Turner S, Yu N, McClanahan TK, et al. IL-33 induces IL-13-dependent cutaneous fibrosis. *Journal of immunology*. 2010;184(3):1526-35.
184. Sturgill J, McGee E, Menzies V. Unique cytokine signature in the plasma of patients with fibromyalgia. *Journal of immunology research*. 2014;2014:938576.
185. Karam MC, Merckbawi R, El-Kouba JE, Bazzi SI, Bodman-Smith KB. In *Leishmania* major-induced inflammation, interleukin-13 reduces hyperalgesia, down-regulates IL-1 β and up-regulates IL-6 in an IL-4 independent mechanism. *Experimental parasitology*. 2013;134(2):200-5.
186. Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T. Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunology today*. 1990;11(12):443-9.
187. Muangchan C, Pope JE. Interleukin 6 in systemic sclerosis and potential implications for targeted therapy. *The Journal of rheumatology*. 2012;39(6):1120-4.
188. Sfrent-Cornateanu R, Mihai C, Balan S, Ionescu R, Moldoveanu E. The IL-6 promoter polymorphism is associated with disease activity and disability in systemic sclerosis. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2006;10(4):955-9.
189. Bodolay E, Koch AE, Kim J, Szegedi G, Szekanecz Z. Angiogenesis and chemokines in rheumatoid arthritis and other systemic inflammatory rheumatic diseases. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2002;6(3):357-76.
190. Hasegawa M, Sato S, Fujimoto M, Ihn H, Kikuchi K, Takehara K. Serum levels of interleukin 6 (IL-6), oncostatin M, soluble IL-6 receptor, and soluble gp130 in patients with systemic sclerosis. *The Journal of rheumatology*. 1998;25(2):308-13.
191. Sato S, Hasegawa M, Takehara K. Serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 correlate with total skin thickness score in patients with systemic sclerosis. *Journal of dermatological science*. 2001;27(2):140-6.
192. Koch AE, Kronfeld-Harrington LB, Szekanecz Z, Cho MM, Haines GK, Harlow LA, et al. In situ expression of cytokines and cellular adhesion molecules in the skin of patients with systemic sclerosis. Their role in early and late disease. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*. 1993;61(5-6):239-46.
193. Zhou Y, Hou W, Xu K, Han D, Jiang C, Mou K, et al. The elevated expression of Th17-related cytokines and receptors is associated with skin lesion severity in early systemic sclerosis. *Human immunology*. 2015;76(1):22-9.
194. Wu M, Pedroza M, Lafyatis R, George AT, Mayes MD, Assassi S, et al. Identification of cadherin 11 as a mediator of dermal fibrosis and possible role in systemic sclerosis. *Arthritis & rheumatology*. 2014;66(4):1010-21.

195. Tisato V, Toffoli B, Monasta L, Bernardi S, Candido R, Zauli G, et al. Patients affected by metabolic syndrome show decreased levels of circulating platelet derived growth factor (PDGF)-BB. *Clinical nutrition*. 2013;32:259-64.
196. Damas JK, Waehre T, Yndestad A, Otterdal K, Hognestad A, Solum NO, et al. Interleukin-7-mediated inflammation in unstable angina: possible role of chemokines and platelets. *Circulation*. 2003;107(21):2670-6.
197. Mazzucchelli RI, Riva A, Durum SK. The human IL-7 receptor gene: deletions, polymorphisms and mutations. *Seminars in immunology*. 2012;24(3):225-30.
198. Wyss CA, Neidhart M, Altwegg L, Spanaus KS, Yonekawa K, Wischnowsky MB, et al. Cellular actors, Toll-like receptors, and local cytokine profile in acute coronary syndromes. *European heart journal*. 2010;31(12):1457-69.
199. Jones KL, Maguire JJ, Davenport AP. Chemokine receptor CCR5: from AIDS to atherosclerosis. *British journal of pharmacology*. 2011;162(7):1453-69.
200. Sattar N, Murray HM, Welsh P, Blauw GJ, Buckley BM, Cobbe S, et al. Are markers of inflammation more strongly associated with risk for fatal than for nonfatal vascular events? *PLoS medicine*. 2009;6(6):e1000099.
201. de Jager SC, Bongaerts BW, Weber M, Kraaijeveld AO, Rousch M, Dimmeler S, et al. Chemokines CCL3/MIP1alpha, CCL5/RANTES and CCL18/PARC are independent risk predictors of short-term mortality in patients with acute coronary syndromes. *PloS one*. 2012;7(9):e45804.
202. Koethe JR, Dee K, Bian A, Shintani A, Turner M, Bebawy S, et al. Circulating interleukin-6, soluble CD14, and other inflammation biomarker levels differ between obese and nonobese HIV-infected adults on antiretroviral therapy. *AIDS research and human retroviruses*. 2013;29(7):1019-25.
203. Lee YH, Nair S, Rousseau E, Allison DB, Page GP, Tataranni PA, et al. Microarray profiling of isolated abdominal subcutaneous adipocytes from obese vs non-obese Pima Indians: increased expression of inflammation-related genes. *Diabetologia*. 2005;48(9):1776-83.
204. Charni Chaabane S, Coomans de Brachene A, Essaghir A, Velghe A, Lo Re S, Stockis J, et al. PDGF-D expression is down-regulated by TGFbeta in fibroblasts. *PloS one*. 2014;9(10):e108656.
205. Murray LA, Argentieri RL, Farrell FX, Bracht M, Sheng H, Whitaker B, et al. Hyper-responsiveness of IPF/UIP fibroblasts: interplay between TGFbeta1, IL-13 and CCL2. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2008;40(10):2174-82.
206. Distler JH, Jungel A, Kowal-Bielecka O, Michel BA, Gay RE, Sprott H, et al. Expression of interleukin-21 receptor in epidermis from patients with systemic sclerosis. *Arthritis and rheumatism*. 2005;52(3):856-64.
207. Du J, Wang L, Liu L, Fan Q, Yao L, Cui Y, et al. IFN-gamma suppresses the high glucose-induced increase in TGF-beta1 and CTGF synthesis in mesangial cells. *Pharmacological reports : PR*. 2011;63(5):1137-44.
208. Koh RY, Lim CL, Uhal BD, Abdullah M, Vidyadaran S, Ho CC, et al. Inhibition of transforming growth factor-beta via the activin receptor-like kinase-5 inhibitor attenuates pulmonary fibrosis. *Molecular medicine reports*. 2015.
209. Porte J, Jenkins G. Assessment of the effect of potential antifibrotic compounds on total and alphaVbeta6 integrin-mediated TGF-beta activation. *Pharmacology research & perspectives*. 2014;2(4):e00030.

Apêndices

Apêndice 1. Desenho esquemático da interação das citocinas TGF β , IL-7, CCL3, IL-13 na fibrose da ES.

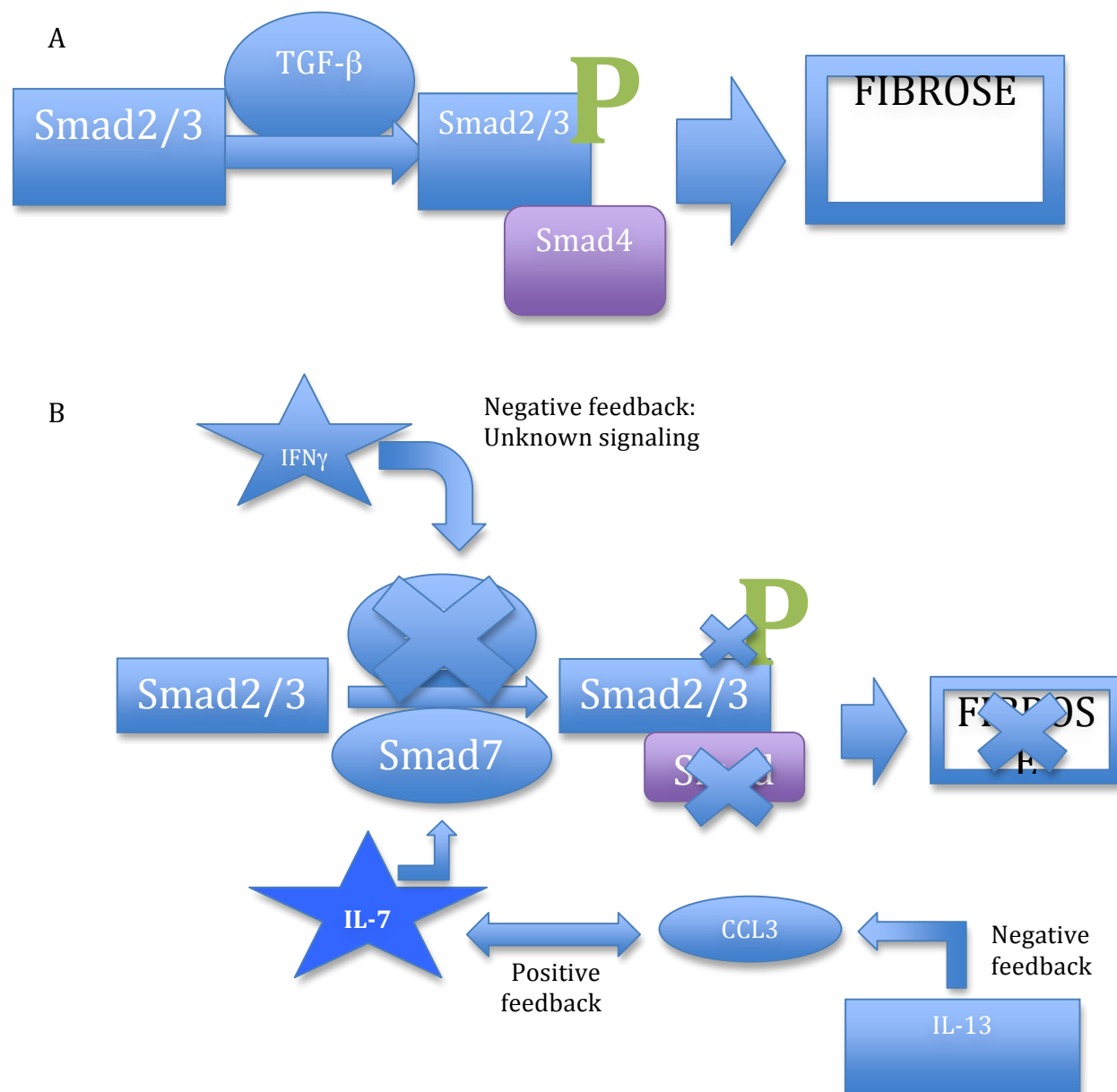


Figura . (A). O receptor de TGF fosforila Smad 2/3. Fosforiladas, elas se ligam a Smad4, e o complexo resultante transloca-se para o núcleo, e ativa transcrição através da ligação com a sequência CAGA, ou seja, iniciam a transdução de sinal. Smad7 inibe a fosforilação TGF- β -mediada de Smad2/3 e compete com a ligação Smad2/3 ao receptor do TGF- β . Por sua vez, o TGF- β então induz a produção tanto de IL-7 (B) quanto de Smad7, e esta por sua vez também é estimulada pela IL-7, sugerindo uma alça negativa ao feedback do controle de sinalização do TGF- β . No nosso estudo, pudemos sugerir que o CCL3 aumenta em resposta a estimulação da IL-7 (e vice-versa), e o aumento da expressão de CCL3, implica em aumento da IL-13 numa resposta ao *feedback* negativo já conhecido desta molécula em relação ao CCL3. Por sua vez, o achado da correlação negativa entre o TGF- β e IFN γ , corrobora os resultados dos artigos já publicados, mas permanencem desconhecidas as vias de sinalização para explicar este acontecimento.

10.2. Apêndice 2. Ficha clínica 1



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

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



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

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

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



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

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



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

74. Tomografia de Tórax 1. Normal 2. Alterada 3. Não realizada	<input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>
74.1 Alterações na tomografia de tórax 1. Padrão de vidro fosco 2. Fibrose pulmonar/ faveolamento 3. Envolvimento pleural 4. Granuloma residual 5. Não se aplica	<input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/> <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/> <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/> <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>
75. Espirometria 1. Normal 2. Alterada 3. Não realizada	<input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>
75.1 Alterações na espirometria 1. Distúrbio restritivo leve 2. Distúrbio restritivo moderado 3. Distúrbio restritivo grave 4. Distúrbio obstrutivo 5. Não se aplica	<input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/> <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>
76. ECG 1. Normal 2. Alterada 3. Não realizada	<input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>
76.1 Alterações no ECG 1. Hipertrofia de câmaras 2. Distúrbio do ritmo 3. Distúrbio de condução 4. Alterações isquêmicas 5. Não se aplica	<input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/> <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/> <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/> <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>
77. Ecocardiograma 1. Normal 2. Alterada 3. Não realizada	<input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>
77.1 Alterações no Ecocardiograma 1. Aumento de câmaras direitas 2. Aumento de câmaras esquerdas 3. Disfunção sistólica 4. Disfunção diastólica 5. Disfunção valvular: _____ 6. HAP leve 7. HAP moderada PSAP: _____ mmHg 8. HAP grave 9. Derrame pericárdico 10. Não se aplica	<input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/> <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/> <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/> <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>
78. Cateterismo cardíaco direito 1. Normal 2. Alterada 3. Não realizada	<input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>
78.1 Alterações no CATE direito 1. HAP leve 2. HAP moderada 3. HAP grave 4. Não se aplica	<input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>

TP: _____

AD: _____

IC: _____



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

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



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

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



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

HAQ – Health Assessment Questionnaire

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

Questionário sHAQ: 5 domínios adicionais (VAS):

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

Apêndice 3. Ficha clínica nº 2. (Preenchida no dia da Biópsia de pele)

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

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

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

HAQ – Health Assessment Questionnaire

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

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

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

Questionário sHAQ: 5 domínios adicionais (VAS):

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Apêndice 4.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA CIDADÃOS ALFABETIZADOS

« AVALIAÇÃO DE GENES PRO E ANTIFIBRÓTICOS E GENES DA VIA Th17 EM PACIENTES PORTADORES DE ESCLEROSE SISTÊMICA: DESCOBERTA DE NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS»

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

É importante ressaltar que:

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

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

Nós solicitamos a sua colaboração e participação neste estudo porque você é portador de esclerose sistêmica ou por você ser um voluntário não portador desta doença. Este estudo inclui a participação de 100 indivíduos. Entre os quais, 30 são voluntários sadios e 70 são portadores da esclerose sistêmica.

Para este estudo, precisamos coletar algumas células de sangue. A coleta de sangue é feita no braço e a quantidade coletada é equivalente a duas colheres de sopa (10-15 ml). Antes de iniciar a coleta, nós limparemos o seu braço com álcool, e todo material usado na coleta é descartável. A coleta será feita por profissionais treinados e competentes e orientados para reduzir os riscos. Para este estudo também será necessário realizar uma pequena biópsia da

pele. O objetivo é estudar também o que acontece na pele das pessoas que têm esclerose sistêmica, um dos órgãos mais comprometidos na doença. O procedimento será realizado por profissionais competentes devidamente treinados para reduzir os riscos para o paciente.

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. A biópsia da pele pode ser desconfortável e deixar uma pequena cicatriz. Com relação aos benefícios, você será submetido a uma avaliação clínica completa e, caso seja detectada alguma alteração, será prescrito o tratamento adequado.

Os dados coletados pelo estudo ficarão armazenados em arquivos no serviço de Reumatologia, sob a responsabilidade da Dra Andrea Dantas. Os resultados deste estudo serão apresentados em congressos, conferências ou em revistas médicas, mas não aparecerá seu nome. Suas informações nunca serão divulgadas, permanecerão confidenciais.

Você tem alguma pergunta sobre a sua participação neste estudo?

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

Dra. Andréa Tavares Dantas, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco e Médica do Hospital Das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE. E-mail: andreatdantas@uol.com.br. Telefone: 55 (81) 2126.3575.

Profa. Dra Angela Luzia Branco Pinto Duarte, Médica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE .E-mail: aduarte@terra.com.br. Telefone/Fax: 55 (81) 3454.0155. Profa. Dr. Suely Lins Galdino, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE. E-mail: suelylinsgaldino@gmail.com. Telefone/Fax: 55 (81) 2126-8346

Assim como, o coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/CCS, o Professor Dr. Geraldo Bosco Lindoso Couto, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, situado na Avenida da Engenharia s/n – 1o Andar, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Telefone/Fax: 55 (81) 2126-8588.

Você ficará com uma cópia deste documento. Nome do responsável pela coleta de sangue: _____ Se você aceitar participar deste estudo, por favor, preencha o formulário abaixo. Nome:

_____ RG: _____ Data: _____

Endereço: _____

Assinatura:

Testemunha

1:

RG:

Data:

Testemunha

2:

RG:

Data:

Pesquisador

Responsável:

Data:

Assinatura:

Apêndice 5.**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO PARA CIDADÃOS NÃO ALFABETIZADOS****« AVALIAÇÃO DE GENES PRO E ANTIFIBRÓTICOS E GENES DA VIA Th17 EM
PACIENTES PORTADORES DE ESCLEROSE SISTÊMICA:
DESCOBERTA DE NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS»**

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

É importante ressaltar que:

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

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

Nós solicitamos a sua colaboração e participação neste estudo porque você é portador de esclerose sistêmica ou por você ser um voluntário não portador desta doença. Este estudo inclui a participação de 100 indivíduos. Entre os quais, 30 são voluntários sadios e 70 são portadores da esclerose sistêmica.

Para este estudo, precisamos coletar algumas células de sangue. A coleta de sangue é feita no braço e a quantidade coletada é equivalente a duas colheres de sopa (10-15 ml). Antes de iniciar a coleta, nós limparemos o seu braço com álcool, e todo material usado na coleta é descartável. A coleta será feita por profissionais treinados e competentes e orientados para reduzir os riscos. Para este estudo também será necessário realizar uma pequena biópsia da

pele. O objetivo é estudar também o que acontece na pele das pessoas que têm esclerose sistêmica, um dos órgãos mais comprometidos na doença. O procedimento será realizado por profissionais competentes devidamente treinados para reduzir os riscos para o paciente.

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. A biópsia da pele pode ser desconfortável e deixar uma pequena cicatriz. Com relação aos benefícios, você será submetido a uma avaliação clínica completa e, caso seja detectada alguma alteração, será prescrito o tratamento adequado.

Os dados coletados pelo estudo ficarão armazenados em arquivos no serviço de Reumatologia, sob a responsabilidade da Dra Andrea Dantas. Os resultados deste estudo serão apresentados em congressos, conferências ou em revistas médicas, mas não aparecerá seu nome. Suas informações nunca serão divulgadas, permanecerão confidenciais.

Você tem alguma pergunta sobre a sua participação neste estudo?

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

Dra. Andréa Tavares Dantas, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco e Médica do Hospital Das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE. E-mail: andreatdantas@uol.com.br. Telefone: 55 (81) 2126.3575.

Profa. Dra Angela Luzia Branco Pinto Duarte, Médica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE .E-mail: aduarte@terra.com.br. Telefone/Fax: 55 (81) 3454.0155. Profa. Dr. Suely Lins Galdino, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE. E-mail: suelylinsgaldino@gmail.com. Telefone/Fax: 55 (81) 2126-8346

Assim como, o coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/CCS, o Professor Dr. Geraldo Bosco Lindoso Couto, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, situado na Avenida da Engenharia s/n – 1o Andar, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Telefone/Fax: 55 (81) 2126-8588.

Você ficará com uma cópia deste documento. Nome do responsável pela coleta de sangue: _____ Se você aceitar participar deste estudo, por favor responda o formulário abaixo. Eu

_____, a rago de _____

_____, assino o presente termo de consentimento. RG: _____ Data _____

_____ Endereço:

Testemunha

1: _____

RG:

Data:

Testemunha

2:

RG:

Data:

Pesquisador

Responsável:

_____ Data: _____

Assinatura:

ANEXOS**Anexo 1.**

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

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

1 Maior ou 2 Menores

Anexo 2. Instructions for authors to submitted articles in Clinical Rheumatology.

Types of papers

- . Original articles: word limit 4000 words, 45 references, no more than 6 figures/tables
- . Review articles: word limit 5000 words, 50 references, no more than 5 figures
- . **Brief Report: word limit 2000 words, 25 references, no more than 4 figures**
- . Case Based Review: a case report of extreme clinical interest incorporating a mini review in an area of new knowledge. Word limit 3500 words, 50 references, no more than 5 figures.
- . Letters to editor: up to 600 words
- . Editorial

Please note:

Case Reports are no longer accepted and instead authors are invited to submit a Case Based Review.

Translated questionnaires can only be included in Clinical Rheumatology articles if permission to use the questionnaire has been granted by the copyright holder.

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title Page

The title page should include:

The name(s) of the author(s)

A concise and informative title

The affiliation(s) and address(es) of the author(s)

The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

Scientific style

Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).

Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.

References

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

Journal article Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8 Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted: Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325-329

Article by DOI Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

Book South J, Blass B (2001) The future of modern genomics. Blackwell, London

Book chapter Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

ISSN.org LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (zip, 2 kB)

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file spbasic.bst which is included in Springer's LaTeX macro package.

Tables

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.