



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MELINE ANGÉLICA CUNHA ROTTER FERREIRA

**PERFIL DE CITOCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS E  
ADIPONECTINA EM PACIENTES COM ESCLEROSE  
SISTÊMICA**

MELINE ANGÉLICA CUNHA ROTTER FERREIRA

**PERFIL DE CITOCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS E  
ADIPONECTINA EM PACIENTES COM ESCLEROSE  
SISTÊMICA**

Dissertação apresentada ao Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Andréa Name Colado  
Simão

Londrina  
2018

MELINE ANGÉLICA CUNHA ROTTER FERREIRA

**PERFIL DE CITOCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS E  
ADIPONECTINA EM PACIENTES COM ESCLEROSE SISTÊMICA**

Dissertação apresentada ao Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profª. Drª. Andréa Name Colado Simão  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profª Drª Edna Maria Vissoci Reiche  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profª Drª Karen Brajão de Oliveira  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 14 de dezembro de 2018.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Ferreira, Meline Angelica Cunha Rotter .

Perfil de citocinas pró e anti-inflamatórias e adiponectina em pacientes com esclerose sistêmica / Meline Ângelica Cunha Rotter Ferreira. - Londrina, 2018.  
98 f. : il.

Orientador: Andrea Name Colado Simão.

Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, 2018.

Inclui bibliografia.

1. citocinas - Tese. 2. adiponectina - Tese. 3. esclerose sistêmica - Tese. 4. fibrose - Tese. I. Simão, Andrea Name Colado. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. III. Título.

“A nossa recompensa está no esforço, não no resultado. Um esforço total é uma vitória completa”

Mahatma Ghandi

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à Deus por me dar forças para sempre continuar lutando em benefício do próximo, com o alívio do sofrimento humano e às vezes a possível cura pelo exercício da medicina.

Agradeço ao meu marido Rubens, meus filhos Caio e Paola que compreenderam a necessidade de eu estar ausente em alguns momentos neste período de conclusão deste projeto. Agradeço aos meus pais que por vezes cuidaram de minha família para que eu pudesse obter mais conhecimento científico.

Agradeço à banca examinadora que aceitou o convite para avaliar da forma mais criteriosa possível o conjunto deste trabalho, possibilitando críticas que contribuam para o desenvolvimento e aprimoramento deste projeto.

Agradeço a toda equipe do grupo de pesquisa em Imunologia Aplicada que me deram todo apoio para a conclusão deste projeto.

Agradeço aos pacientes do Ambulatório de Reumatologia do Hospital Universitário de Londrina que aceitaram participar desta pesquisa. Espero muito poder contribuir de alguma forma para melhorar qualidade de vida destes pacientes.

À Universidade Estadual de Londrina e aos dedicados professores doutores do Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial/UEL que possibilitam o crescimento pessoal e profissional de tantos alunos.

Finalmente, gostaria de agradecer à minha orientadora Dra Andréa Name Colado Simão por me aceitar como orientada, abdicar por vezes de sua vida pessoal em prol da profissional, estar sempre disposta a resolver às mais diversas dúvidas e me ajudar na confecção deste trabalho.

FERREIRA, Meline Angélica Cunha Rotter. **Perfil de citocinas pró e anti-inflamatórias e adiponectina em pacientes com esclerose sistêmica**. 2018. 98 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A Esclerose Sistêmica (ES) é uma doença autoimune rara caracterizada por fibrose de múltiplos órgãos, envolvimento vascular e produção de autoanticorpos. Apresenta um prognóstico grave, mortalidade prematura, podendo ser considerada como uma doença de difícil controle terapêutico. A desregulação imune é um processo central na patogênese da ES. Linfócitos e macrófagos produzem citocinas que induzem dano tecidual, recrutam células inflamatórias adicionais e promovem a produção de matriz extracelular e fibrose. Os linfócitos T *helper* (Th) são provenientes de linfócitos Th CD4<sup>+</sup> precursores (Th0), que podem diferenciar-se em fenótipos diferentes e exclusivos - Th1, Th2, Th17 e células T reguladoras (Treg) dependendo do ambiente de citocinas, imunógeno e células envolvidas.

**OBJETIVO:** Avaliar os perfis de citocinas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e adiponectina e determinar modelos preditores que auxiliem no diagnóstico da ES.

**SUJEITOS E MÉTODOS:** Foram selecionados 117 participantes, sendo 42 pacientes com diagnóstico de ES (ES difusa, n=7 e ES limitada, n=35) e 75 indivíduos saudáveis (grupo controle). Todos os participantes foram avaliados quanto a sexo, etnia, índice de massa corporal (IMC), uso de medicamentos, entre outros dados. Os níveis plasmáticos das citocinas pró-inflamatórias: interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 e das anti-inflamatórias IL-4, fator transformador de crescimento-beta (TGF- $\beta$ ) e adiponectina foram determinados por imunofluorimetria (plataforma Luminox). As citocinas foram avaliadas individualmente e em perfis: pró-inflamatórios M1: (IL-1 $\beta$ +IL-6+TNF- $\alpha$ ) e Th1: (IL-2+IFN- $\gamma$ ). As citocinas anti-inflamatórias formaram os perfis Th2+Treg: (IL-4+TGF- $\beta$ ) e o sistema anti-inflamatório e imunoregulatório (IL-4+TGF- $\beta$ +Adiponectina). **RESULTADOS:** O diagnóstico de ES foi fortemente associado à alteração dos níveis de citocinas sendo responsável por 67,6% de sua variância, com um forte impacto na variação nos níveis de IL-2 (43,7%), IL-4 (26,0%) e adiponectina (24,2%) e moderado impacto na variação dos níveis de TGF- $\beta$  (19,3%) e IL-6 (12,7%). Os resultados também demonstraram que o diagnóstico está envolvido, principalmente no perfil Th2 e Treg, explicando 37,9% de sua variação. Quando a adiponectina foi adicionada ao perfil anti-inflamatório, a variação aumentou para 45,7%. Além disso, foi proposto um modelo estatístico utilizando citocinas pró (IL-2, IFN- $\gamma$ ) e anti-inflamatórias (TGF- $\beta$  e adiponectina) para prever a ES com alta sensibilidade (100%) e especificidade (91,7%). **CONCLUSÃO:** Pacientes com ES apresentaram um predomínio da resposta anti-inflamatória (Th2, Treg e adiponectina) e esses achados podem ser responsáveis pela característica fibrótica da doença. Além disso, este é o primeiro estudo a demonstrar níveis mais altos de adiponectina em pacientes com ES. Mais estudos são necessários para confirmar os resultados presentes, bem como investigar os achados contraditórios sobre a adiponectina.

**Palavras-chave:** Esclerose sistêmica. Citocinas. Adiponectina. Inflamação.

FERREIRA, Meline Angélica Cunha Rotter. **Pro-inflammatory, Anti-inflammatory Cytokines Profiles and Adiponectin in Patients with Systemic Sclerosis**. 2018. 98 p. Dissertation (Master's Degree in Clinical and Laboratory Pathophysiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Systemic sclerosis (SSc) is a rare autoimmune disorder characterized by multiorgan fibrosis, vascular involvement, and production of autoantibodies. SSc exhibits a severe prognosis and premature mortality and can still be considered as an disease of difficult therapeutic control. Immune dysregulation is a central process in the pathogenesis of SSc. Lymphocytes and macrophages produce cytokines, which induce tissue damage, recruit additional inflammatory cells, and promote extra-cellular matrix production and fibrosis. T helper (Th) lymphocytes are derived from precursor lymphocytes (Th0), which can differentiate into different and unique phenotypes - Th1, Th2, Th17 and regulatory T cells (Treg) depending on the environment of cytokines, immunogens and cells involved. **OBJECTIVE:** The main objective of this study was to evaluate pro- and anti-inflammatory cytokine profiles and adiponectin to determine predictive models that aid in the diagnosis of SSc. **SUBJECTS AND METHODS:** 117 patients were selected, 42 with SSc (SSc diffuse, n=7 and SSc limited, n=35) and 75 healthy individuals (control group). All participants were assessed for sex, ethnicity, body mass index (BMI), drug use, among other data. Plasma levels of pro-inflammatory cytokines interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), tumor necrosis factor-alfa (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-4 and IL-6 and of the anti-inflammatory cytokines IL-4, transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) and adiponectin were determined by immunofluorimetry (Luminex® platform). Cytokines were evaluated individually and in profiles. Pro-inflammatory profiles: M1 (IL-1 $\beta$  + IL-6 + TNF- $\alpha$ ), Th1 (IL-2+ IFN- $\gamma$ ). The anti-inflammatory cytokines formed the profile Th2 +Treg: (IL-4 + TGF- $\beta$ ) and the anti-inflammatory and immune regulatory system (IL-4 + TGF- $\beta$  + Adiponectin). **RESULTS:** Diagnosis of SSc was strongly associated with altered cytokine levels, accounting for 67.6% of its variance, with a strong impact on IL-2 (43.7%), IL-4 (26.0%) and adiponectin (24.2%) and a moderate impact on TGF- $\beta$  (19.3%) and IL-6 (12.7%). The results also showed that the diagnosis is mainly involved in the Th2 and Treg profiles, explaining 37.9% of their variation. When adiponectin was added to the anti-inflammatory profile, the variation was increased to 45.7%. In addition, a statistical model was proposed using pro (IL-2, IFN- $\gamma$ ) and anti-inflammatory (TGF- $\beta$  and adiponectin) cytokines to predict SSc with high sensitivity (100%) and specificity (91.7%). **CONCLUSION:** SSc patients had a predominance of the anti-inflammatory response (Th2, Treg and adiponectin) and these findings may be responsible for the fibrotic characteristic of the disease. In addition, this is the first study that demonstrated higher levels of adiponectin in SSc patients. More studies are necessary to confirm the present results as well as to investigate the contradictory findings on adiponectin.

**Keywords:** Systemic sclerosis. Cytokines. Adiponectin. Inflammation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> - Modelo para o papel das células T CD8 <sup>+</sup> na patogênese da ES..... | 21 |
| <b>Figura 2</b> - Fisiopatologia da Esclerose Sistêmica .....                                 | 29 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Table 1 -</b> Socio-demographic and laboratorial data in both healthy controls (HC) and Systemic Sclerosis (SSc) patients .....  | 68 |
| <b>Table 2 -</b> Results of multivariate General Linear Model (GLM) analysis with the cytokines levels (in Z transformation) as dependent variables.....  | 69 |
| <b>Table 3 -</b> Model-derived estimated marginal mean (SE) values (in z transformation after logarithm natural transformation) of all cytokines in healthy controls (HC) and Systemic Sclerosis (SSc) patients.....  | 70 |
| <b>Table 4 -</b> Outcome of a multivariate General Linear Model (GLM) analysis with the 7 z-unit weighted composite scores as dependent variables and Systemic Sclerosis as primary explanatory variable, while adjusting for age, sex and BMI as covariates..... | 71 |
| <b>Table 5 -</b> Model-derived estimated marginal mean (SE) values of 8 composite scores in healthy controls (HC) and Systemic Sclerosis (SSc) patients.....  | 72 |
| <b>Table 6 -</b> Binary logistic regression analyses with Systemic Sclerosis (SSc) as the dependent variable (and controls as the reference group) and composite scores (regression #1) or cytokines (regression #2) as input variables.....                      | 73 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|        |   |
|--------|---|
| ACR    | Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário                       |
| AEHU   | <i>American College of Rheumatology</i> (Colégio Americano de Reumatologia)   |
| ANOVA  | <i>Analysis of Variance</i> (Análise de Variância)                            |
| APC    | <i>Antigen-presenting cell</i> (Células apresentadoras de antígenos)          |
| AR     | Artrite Reumatóide  |
| AT1R   | <i>Angiotensin II type I receptor</i> (receptor de angiotensina II tipo I)    |
| BMI    | <i>Body Mass Index</i> (índice de massa corpórea)                             |
| CCL3   | <i>Chemokine (C-C motif) ligand 3</i> (quimiocina (C-C motivo) ligando 3)     |
| CA     | Circunferência abdominal  |
| CFM    | Ciclofosfamida  |
| CMSP   | Células mononucleares do sangue periférico                                    |
| CV     | Capacidade Vital  |
| DM     | <i>Diabetes mellitus</i>  |
| DRGE   | Doença do refluxo gastroesofágico   |
| DIP    | Doença intersticial pulmonar  |
| EDTA   | Ácido etilenodiaminotetracético   |
| ELISA  | <i>Ezyme-linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio Imunoenzimático)              |
| EULAR  | <i>European League Against Rheumatism</i> (Liga Européia Contra o Reumatismo) |
| ERK    | Ras-extracelular  |
| EROs   | Espécies reativas de oxigênio   |
| ES     | Esclerose Sistêmica   |
| ET-1   | Endotelina 1  |
| ETAR   | <i>Endothelin type A receptor</i> (receptor de endotelina tipo A)             |
| FAN    | Fator antinúcleo  |
| FOXP3  | <i>Forkhead box P3</i>  |
| FR     | Fenômeno de Raynaud   |
| FRP    | Fenômeno de Raynaud primário  |
| GATA-3 | Fator de transcrição de ação "trans" específico de células T                  |
| GLM    | <i>General Linear Model</i> (Modelo Linear Geral)                             |
| GM-CSF | Fator estimulador de colônia de macrófagos                                    |
| HCQ    | Hidroxicloroquina   |

|               |  |
|---------------|--|
| HLA           | <i>Human leukocyte antigen</i> (Antígeno Leucocitário Humano)                        |
| HMW           | <i>Higher molecular weight</i> (alto peso molecular)                                 |
| HPA           | Hipertensão arterial pulmonar  |
| IECA          | Inibidores da enzima de conversão de angiotensina                                    |
| IL            | Interleucina   |
| IFN           | Interferon   |
| IRF5          | <i>Interferon regulatory factor 5</i> (fator regulador do interferon 5)              |
| JNK           | Quinase N-terminal c-Jun   |
| KDa           | <i>Kilodalton</i>  |
| LTBP          | <i>Latent TGF-beta binding protein</i> ( Proteína latente de TGF- $\beta$ )          |
| LES           | Lupus Eritematoso Sistêmico  |
| LMW           | <i>Low molecular weight</i> (baixo peso molecular)                                   |
| LPS           | Lipopolissacarídeos  |
| MAPKs         | <i>Mitogen-activated protein kinases</i> (Proteínas quinases ativadas por mitógeno)  |
| MCP-1         | <i>Monocyte chemoattractant protein 1</i> (Proteína quimiotática de monócitos)       |
| MHC           | <i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexo Principal de Histocompatibilidade) |
| MEC           | Matriz extracelular  |
| M1            | Macrófago tipo 1   |
| MIP           | <i>Macrophage Inflammatory Proteins</i> (Proteínas Inflamatórias de Macrófagos)      |
| MMF           | Micofenolato Mofetil   |
| MMPs          | Metaloproteinases de matriz  |
| MTX           | Metotrexate  |
| NAG-2         | <i>Tetraspan novel antigen-2</i>   |
| NK            | <i>Natural Killer</i>  |
| NKT           | Células T Natural Killer   |
| PDGF          | <i>Platelet-derived growth factor</i> (Fator de crescimento derivado de plaquetas)   |
| RNM           | Ressonância nuclear magnética  |
| RNA           | <i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)   |
| RTX           | Rituximabe   |
| $\alpha$ -SMA | $\alpha$ - actina de músculo liso  |
| SD            | <i>Standard deviation</i> (desvio padrão)  |
| TGF- $\beta$  | <i>Transforming growth factor-beta</i> (Fator transformador de crescimento- beta)    |
| Th            | <i>T helper lymphocytes</i> (linfócitos T auxiliares)                                |

|        |   |
|--------|---|
| TLR    | <i>Toll like receptors</i> (receptor tipo <i>toll</i> )                           |
| TNF    | <i>Tumor Necrosis Factor</i> (Fator de necrose tumoral)                           |
| Tregs  | <i>Regulatory T cells</i> (células T regulatórias)                                |
| UEL    | Universidade Estadual de Londrina   |
| VCAM-1 | <i>Vascular Cell Adhesion Molecule -1</i> (Molécula de adesão celular vascular 1) |

## SUMÁRIO

|          |   |    |
|----------|---|----|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | 14 |
| 1.1      | FISIOPATOLOGIA DA ES .....  | 17 |
| 1.2      | ES E RESPOSTA IMUNE.....  | 19 |
| 1.3      | A RESPOSTA TH1, TH2 E TH17 NA ES .....                              | 20 |
| 1.4      | CÉLULAS T REGULATÓRIAS (TREG) E O TGF-B NA ES.....                  | 25 |
| 1.5      | CÉLULAS B E ES.....   | 28 |
| 1.6      | ADIPONECTINA E ES.....  | 29 |
| 1.7      | TRATAMENTO DA ES.....   | 31 |
| <b>2</b> | <b>JUSTIFICATIVA</b> .....  | 33 |
| <b>3</b> | <b>OBJETIVO</b> .....   | 34 |
| 3.1      | OBJETIVO GERAL .....  | 34 |
| 3.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 34 |
| <b>4</b> | <b>SUJEITOS E MÉTODOS</b> .....                                     | 35 |
| 4.1      | DELINEAMENTO DO ESTUDO E ASPECTOS ÉTICOS.....                       | 35 |
| 4.2      | DADOS DEMOGRÁFICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E ANTROPOMÉTRICOS.....          | 35 |
| 4.3      | COLETA DE SANGUE E EXAMES BIOQUÍMICOS .....                         | 36 |
| 4.4      | DOSAGEM DE CITOCINAS .....  | 36 |
| 4.5      | ANÁLISE ESTATÍSTICA .....   | 36 |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....                                 | 38 |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÕES DA DISSERTAÇÃO</b> .....                              | 74 |
| <b>7</b> | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....                                   | 75 |
|          | <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 76 |
|          | <b>APÊNDICES</b> .....  | 87 |
|          | APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)..... | 88 |
|          | APÊNDICE B – Ficha de Avaliação .....                               | 90 |
|          | <b>ANEXOS</b> .....   | 93 |
|          | ANEXO A – Documento de Aprovação do Comitê de Ética da UEL.....     | 94 |

## 1 INTRODUÇÃO

Esclerose Sistêmica (ES) é uma doença autoimune rara do tecido conjuntivo caracterizada por fibrose de múltiplos órgãos, envolvimento vascular e produção de autoanticorpos. Apresenta um prognóstico grave associado ao envolvimento órgão específico, mortalidade prematura, podendo ser considerada como uma doença de difícil controle terapêutico. (BONY et al., 2017). Embora certas manifestações cardinais como fenômeno de Raynaud (FR) e doença do refluxo gastroesofágico (DRGE), frequentemente ocorram no quadro inicial da doença, os sinais clínicos precoces podem variar desde uma doença inflamatória de pele, dedos edematosos, inflamação musculoesquelética, ou sintomas constitucionais como fadiga até comprometimento mais grave como fibrose e hipertensão arterial pulmonar (DENTON; KHANNA, 2017).

No registro de dados de pacientes com ES do *European Scleroderma Trials and Research group* (EUSTAR) de 1949 pacientes, a razão entre o sexo feminino e masculino foi de 6:1. A prevalência feminina é menor com a forma difusa da doença (4:1) e maior em pacientes jovens (8:1 antes dos 30 anos *versus* 5:1 depois dos 60 anos) (ELHAI et al., 2016). Na América do Norte, as taxas de incidência e prevalência de ES observadas nos Estados Unidos foram de 19,3 casos por milhão/habitantes e 242 casos por milhão/habitantes respectivamente. O pico de incidência ocorre entre 45 e 54 anos para mulheres afro-americanas e entre 65 a 74 anos para as mulheres brancas (MAYES et al., 2003). No Caribe, verificou-se uma incidência mais baixa, com um total de 17 casos de ES observados na população negra de Barbados durante um período de observação de 10 anos (1996 a 2006). Já na América do Sul, a incidência e a prevalência de ES observadas na cidade de Buenos Aires/Argentina foi de 21,2 casos por milhão/habitantes e 296 casos por milhão/habitantes respectivamente. No entanto, até o presente momento, não existem estudos brasileiros publicados que tenham avaliado a incidência ou prevalência de ES (HORIMOTO et al., 2017).

Dependendo da extensão do envolvimento da pele, a ES pode ser classificada nos seguintes subtipos: 1) Cutânea Limitada: o espessamento cutâneo é distal aos joelhos e cotovelos; 2) Cutânea Difusa: o espessamento envolve a porção proximal das extremidades e/ou do tronco além do espessamento distal e 3) Esclerodermia *sine* escleroderma: sem espessamento cutâneo, apenas com comprometimento de órgãos internos (DENTON; KHANNA, 2017). A progressão rápida da fibrose da pele, pulmões e outros órgãos internos caracteriza a ES cutânea difusa, enquanto as manifestações vasculares, geralmente com leve

envolvimento cutâneo e de órgãos internos, são características mais frequentes da ES cutânea limitada (FUSCHIOTTI, 2018; MEDSGER, 2003).

Tipicamente o FR é o primeiro sintoma em pacientes com ES. Outros sintomas iniciais frequentes são mal-estar, fadiga, artralgia e mialgia. Os pacientes que evoluem para a forma cutânea difusa podem apresentar edema de dedos e síndrome do túnel do carpo no início do quadro clínico. Alterações de pigmentação da pele podem ocorrer antes ou depois do início do endurecimento da pele, podendo estar presentes também refluxo gastroesofágico ou dispnéia. O envolvimento gastrointestinal é praticamente universal e pode variar de leve (testes funcionais de motilidade anormais) a grave, com comprometimento de todo o trato gastrointestinal. No entanto, o comprometimento pulmonar é a principal causa de mortalidade relacionada à ES. As manifestações pulmonares mais frequentes incluem a Doença Intersticial Pulmonar (DIP) e/ou a Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP); entretanto outras menos comuns podem ocorrer, tais como, pneumonia aspirativa, doença pleural, doença obstrutiva das vias aéreas e hemorragia alveolar. O envolvimento cardíaco costuma ser sutil, podendo ocorrer doenças do pericárdio, cardiomiopatia dilatada, neuropatia autonômica e arritmias, e quando presentes, a doença apresenta pior prognóstico. A crise renal esclerodérmica é uma manifestação típica da ES e as alterações patológicas dos vasos renais são semelhantes às aquelas observadas em outros vasos nos pacientes com ES. A insuficiência renal pode acometer pacientes com sobreposição de ES e Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) (HOCHEBERG et al., 2015; STEEN; MEDSGER, 2000).

Até 90% dos pacientes com ES podem apresentar positividade para autoanticorpos no teste de imunofluorescência indireta, conhecido como fator antinúcleo (FAN). Alguns padrões encontrados são praticamente exclusivos da ES, tais como o padrão nucleolar e o padrão centromérico e permitem estratificar precocemente sua história natural, além de auxiliar no manejo adequado da doença. Os autoanticorpos na ES incluem o anti-centrômero, que está associado a ES cutânea limitada e hipertensão pulmonar; o anti-topoisomerase I ou anti-Sc170, que está associado a ES cutânea difusa, fibrose pulmonar progressiva, úlceras digitais e contratura de mãos; e o anti-RNA polimerase III que está associado a ES cutânea difusa, crise renal esclerodérmica e contratura de mãos. Adicionalmente, o padrão nucleolar do FAN está relacionado à presença de fibrose pulmonar progressiva e HAP (DENTON; KHANNA, 2017; HOCHEBERG et al., 2015)

Em 2013 foram validados novos critérios de acordo com a *American College Rheumatology/European League Against Rheumatism* (ACR/EULAR) de classificação de ES (VAN DEN HOOGEN et al., 2013) (Quadro 1). Estes critérios foram propostos devido à falta

de sensibilidade do critério de classificação ACR de 1980, particularmente nos casos de ES precoce e de ES cutânea limitada. O maior interesse do ACR em se fazer o diagnóstico precoce é devido à existência de uma “janela” de oportunidade para se instituir o tratamento adequado, antes que ocorra o desenvolvimento de fibrose irreversível (ELHAI et al., 2015).

**Quadro 1.** Critérios de Classificação da Esclerose Sistêmica do *American College Rheumatology/European League Against Rheumatism\** (ACR/ EULAR)

| Item   | Sub-item (s)   | Pontuação** |
|--|--|-------------|
| Espessamento da pele dos dedos de ambas as mãos proxima às articulações metacarpofalangeanas   | -  | 9           |
| Espessamento da pele dos dedos ( <i>contar apenas a pontuação mais alta</i> )  | Dedos edemaciados  | 2           |
|  | Esclerodactilia (distal para as articulações metacarpofalângicas, mas proximal às articulações interfalangeanas proximais) | 4           |
| Lesão de polpa digital ( <i>contar apenas a pontuação mais alta</i> )  | Úlcera de polpa digital  | 2           |
|  | Úlcera de polpa digital cicatrizada  | 3           |
| Telangiectasia   | -  | 2           |
| Capilaroscopia   | -  | 2           |
| Hipertensão arterial pulmonar e / ou doença intersticial pulmonar ( <i>pontuação máxima: 2</i> )   | Hipertensão arterial pulmonar  | 2           |
|  | Doença intersticial pulmonar   | 2           |
| Fenômeno de <i>Raynaud</i>   | -  | 3           |
| Autoanticorpos relacionados à esclerodermia (anti-centrômero, anti-topoisomerase I ou anti-Scl-70, anti-RNA polimerase III) ( <i>pontuação máxima: 3</i> )   | Anti-centrômero  | 1           |
|  | Anti-topoisomerase I   | 1           |
|  | Anti-RNA-polimerase III  | 1           |
| * Estes critérios são aplicáveis a qualquer paciente considerado para inclusão em estudos de esclerose sistêmica. Os critérios não são aplicáveis a pacientes com espessamento da pele poupando os dedos ou para pacientes que têm transtorno esclerodérmico melhor explicado por outras doenças (por exemplo, fibrose esclerosante nefrogênica, morféia generalizada, fasciíte eosinofílica, escleredema <i>diabeticorum</i> , escleromixedema, eritromialgia, porfíria, líquen esclerose múltipla, doença do enxerto- <i>versus</i> -hospedeiro, quiroartropatia diabética). |  |             |
| ** A pontuação total é determinada pela soma do peso máximo (pontuação) em cada categoria. Pacientes com pontuação total $\geq 9$ são classificadas como tendo esclerose sistêmica definida.   |  |             |

**Fonte:** Adaptado de Van Den Hoogen *et al.* (2013).

A atividade da doença é determinada utilizando-se alguns parâmetros, tais como: 1) comprometimento cutâneo, avaliado pelo escore cutâneo de Rodnan modificado (Quadro 2); 2) comprometimento pulmonar, por tomografia computadorizada de tórax de alta resolução, espirometria, teste de caminhada de 6 minutos e ecocardiografia transtorácica; 3) comprometimento renal (*clearance* de creatinina, proteinúria, hematúria e, quando indicado, biópsia renal) (CARVALHO et al., 2014; HOCHEBERG et al., 2015).

**Quadro 2.** Escore Cutâneo Total – Método de *Rodnan* Modificado (ECT-RM)\*

| Direita |   |   |   |            | Esquerda |   |   |   |
|---------|---|---|---|------------|----------|---|---|---|
| 0       | 1 | 2 | 3 | Dedos      | 0        | 1 | 2 | 3 |
| 0       | 1 | 2 | 3 | Dorso mãos | 0        | 1 | 2 | 3 |
| 0       | 1 | 2 | 3 | Antebraços | 0        | 1 | 2 | 3 |
| 0       | 1 | 2 | 3 | Braços     | 0        | 1 | 2 | 3 |
| 0       | 1 | 2 | 3 | Coxas      | 0        | 1 | 2 | 3 |
| 0       | 1 | 2 | 3 | Pernas     | 0        | 1 | 2 | 3 |
| 0       | 1 | 2 | 3 | Dorso pés  | 0        | 1 | 2 | 3 |
|         |   |   |   | Face       | 0        | 1 | 2 | 3 |
|         |   |   |   | Tórax      | 0        | 1 | 2 | 3 |
|         |   |   |   | Abdôme     | 0        | 1 | 2 | 3 |

0 = pele normal

1 = espessamento cutâneo leve

2 = espessamento cutâneo moderado

3 = espessamento cutâneo intenso, com incapacidade de pregar a pele.

\*O ECT-RM pode variar entre 0 e 51.

**Fonte:** adaptado de Khanna *et al.* (2017).

### 1.1 FISIOPATOLOGIA DA ES

A etiopatogênese da ES é complexa e decorre de fatores ambientais associados à suscetibilidade genética. Têm sido descritos, como importantes fatores ambientais, agentes infecciosos, exposição a produtos químicos como solventes orgânicos e pó de sílica, implantes mamários de silicone, drogas quimioterápicas como os taxanos e gencitabina, além de certas formas de gadolínio, um agente de contraste usado na ressonância nuclear magnética (RNM) (DENTON; KHANNA, 2017). Em relação aos agentes infecciosos, muitos pacientes com ES têm anticorpos contra uma proteína UL94 derivada do citomegalovírus humano que partilha homologia com o *tetraspan novel antigen-2* (NAG-2), que é expresso na superfície da célula endotelial humana e fibroblastos. Os anticorpos anti-peptídeo UL94 ligam-se ao NAG-2 e induzem a expressão gênica do tipo “escleroderma-like” nas células endoteliais e fibroblastos (FURUE *et al.*, 2017). Já em relação à predisposição genética, foram evidenciados alguns alelos de HLA (*HLA-DQB1\*0301*, *HLA-DRB1\*01*, *DRB1\*04*, *DQB1\*0501*, *HLA-DRB1\*11*, *HLA-DPB1\*1301*) bem como o gene *IRF5* e as regiões do gene *STAT4*, outros genes que também contribuem são o *IRF4*, *CDH7* e *CD247*. Todos estes genes codificam proteínas envolvidas na resposta

imunológica e variantes nestes *loci* também estão associados a outras condições autoimunes. Isto se justifica pelo fato de haver outras desordens autoimunes associada a ES, tais como LES e Síndrome de Sjögren (BOSSINI-CASTILLO et al., 2015; RADSTAKE et al., 2010).

A patogênese da ES permanece desconhecida. Acredita-se que a autoimunidade e a vasculopatia precedem a ativação de fibroblastos e a fibrose intersticial. Autoanticorpos contra células endoteliais, lesão de isquemia e reperfusão após o FR, geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) com infiltração de células inflamatórias e subsequente produção de citocinas desencadeiam transformação miofibroblástica de células endoteliais e fibroblastos e induz produção excessiva de colágenos e outras moléculas que compõem a matriz extracelular (FURUE et al., 2017).

As duas principais características fisiopatológicas da ES são a microvasculopatia obliterante e a fibrose intersticial/vascular presentes em vários órgãos. A infiltração de órgãos-alvo pelas células inflamatórias é observada, com frequência, no estágio inicial da doença, particularmente em torno dos vasos sanguíneos. No entanto, nos estágios finais da ES, os principais achados são uma camada densa de colágeno na derme, perda de células e atrofia (GABRIELLI; AVVEDIMENTO; KRIEG, 2009).

Nos estágios iniciais da ES, as células endoteliais são ativadas e as moléculas de adesão expressas nestas células promovem a infiltração perivascular das células inflamatórias, o que resulta em disfunção endotelial e apoptose (GUIDUCCI et al., 2009). As células endoteliais ativadas também podem liberar endotelina-1 (ET-1), um potente vasoconstritor que promove a adesão de leucócitos, a proliferação de células musculares lisas dos vasos sanguíneos e a ativação de fibroblastos (MOTEGI et al., 2014). A reatividade vascular anormal associada à fibrose estrutural dos vasos sanguíneos pode resultar em hipóxia tecidual grave, fluxo sanguíneo capilar reduzido, hiperplasia intimal e fibrose da membrana externa. Em última análise, essas respostas podem resultar em manifestações clínicas correspondentes, como o FR, úlceras digitais, hipertensão pulmonar e crise renal hipertensiva (KAVIAN; BATTEUX, 2015). Já a fibrose, outra característica clínica da ES, resulta do aumento da síntese de matriz extracelular (MEC) (principalmente do colágeno tipos I e III) e redução de sua degradação, resultando em disfunção de fibroblastos, células musculares lisas e células estromais. Desta forma, o tecido conjuntivo normal é gradualmente substituído por abundante MEC, levando à disfunção orgânica causando alterações patológicas (KAVIAN; BATTEUX, 2015). Seja qual for o estímulo original, o dano vascular endotelial leva à consequente ativação da resposta imune com a liberação de várias citocinas, produção de autoanticorpos, ativação de fibroblastos e aumento da síntese de colágeno (BARAUT et al., 2010).

## 1.2 ES E RESPOSTA IMUNE

A desregulação imune é um processo central na patogênese da ES. Várias células da resposta imune inata e adaptativa contribuem na produção de citocinas em pacientes com ES (BARAUT et al., 2010; FURUE et al., 2017). As principais células do sistema imune inato que são de reconhecida importância na ES são os mastócitos, células natural *Killer* (NK) (CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>) /NKT-*like* (CD56<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>), macrófagos e células dendríticas (CDs)(RAJA; DENTON, 2015). As células NKT-*like* são um grupo amplo e diversificado de células T que coexpressam receptores de células T e receptores NK, que se agrupam muito próximo às células NK em termos de expressão de molécula de superfície de múltiplos parâmetros, mas exibem uma quiescência transcricional relativa, exigindo um meio inflamatório para exercer propriedades imunorreguladoras (COSSU et al., 2016).

No envolvimento cutâneo precoce da ES, são encontrados macrófagos na região perivascular da derme. Os macrófagos ativados produzem ligando 2 de quimiocina (motivo CC)(*CCL2*), fator transformador de crescimento-beta (TGF- $\beta$ ) e fator de crescimento derivados de plaquetas (PDGF). Os mastócitos, que servem como uma célula sentinela do sistema imunológico, são encontrados próximos aos miofibroblastos na derme de pacientes com ES. Eles expressam uma variedade de *toll like receptors* (TLRs) e secretam mediadores imunológicos tais como TGF- $\beta$ , interleucina (IL)-4, IL-13, PDGF, proteína quimiotática de monócito-1 (MCP-1), interferon (IFN)- $\alpha$  e ET-1. A estimulação do sistema inato pela via TLR promove ativação e maturação de CDs subsequentemente induzindo a proliferação de células T, desencadeando a resposta imune adaptativa (RAJA; DENTON, 2015).

Os linfócitos T *helper* (Th) são provenientes de linfócitos Th CD4<sup>+</sup> precursores (Th0), que podem diferenciar-se em fenótipos diferentes e exclusivos - Th1, Th2, Th17 e células T reguladoras (Treg) dependendo do ambiente de citocinas, imunógeno e células envolvidas. Essa classificação refere-se ao padrão de citocinas que induzem ou são produzidas pelos diferentes subtipos de linfócitos. O padrão Th1 refere-se à produção de citocinas envolvidas na estimulação do processo inflamatório, tais como o IFN- $\gamma$ , fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-1, IL-2 e IL-12. Já o padrão Th2 refere-se a um perfil de citocinas anti-inflamatório, com produção de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13. Outro padrão inflamatório é o perfil Th17 que é responsável pela produção de IL-17, IL-21 e IL-22 e o padrão de citocinas reguladoras conhecido como Treg responsável pela produção de TGF- $\beta$  e IL-10 envolvidos no processo de tolerância imunológica, foram adicionados a essa classificação (BARAUT et al., 2010).

A resposta imunológica das células Th1 e Th2 desempenha um papel fundamental no desenvolvimento da ES, mas também foi demonstrado que as células Th17 e Tregs participam na patogênese da doença (DANTAS et al., 2018).

Postula-se que um desequilíbrio na produção de citocinas por esses subgrupos de células impulse a inflamação nos estágios iniciais da doença (menos de 3 anos de duração), mediada pela resposta Th1 e Th17, e fibrose, nos estágios mais avançados (mais de 6 anos de duração) da ES mediada pelo predomínio de Th2 (BARAUT et al., 2010; DANTAS et al., 2018).

Vários estudos relataram alterações nos níveis séricos de citocinas em pacientes com ES, com resultados inconclusivos. Esses resultados discrepantes são explicados por vários aspectos, incluindo heterogeneidade genética na população de ES, diferenças na duração da doença, influência do tratamento sistêmico, tamanho da amostra e os diversos métodos de quantificação utilizados (COSSU et al., 2016; FUSCHIOTTI, 2011, 2018).

### 1.3 A RESPOSTA TH1, TH2 E TH17 NA ES

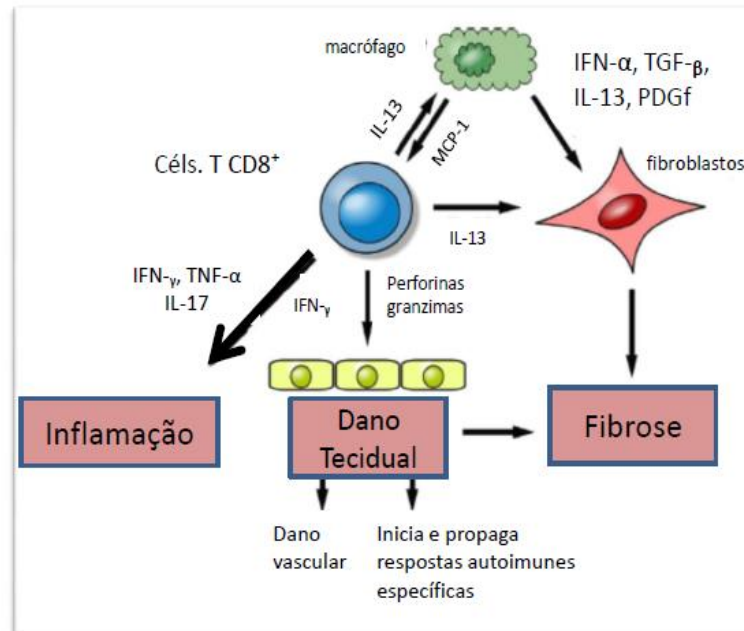
Os linfócitos Th1 produzem principalmente citocinas que estão envolvidas na resposta imune celular, como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2. O IFN- $\gamma$  é produzido pelas células T CD8<sup>+</sup>, células dendríticas e células NK em resposta à infecção viral, afim de estimular a fagocitose e a eliminação de patógenos pelos macrófagos. O IFN- $\gamma$ , como citocina imunorreguladora e antitumoral, aumenta a expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I (MHC-I) em células normais, favorece a apresentação de antígeno por células apresentadoras de antígeno (APC), ativação de células NK e B e migração de leucócitos. O IFN- $\gamma$  pode inibir a síntese de pré-colágeno por fibroblastos através das vias Jak /STAT e Y-box. Além disto, inibe a resposta Th2 via supressão de IL-4 e IL-10. Já o TNF- $\alpha$  é principalmente produzido por macrófagos e APC, mas também por células residentes teciduais, incluindo mastócitos da pele e queratinócitos. O TNF- $\alpha$  auxilia o recrutamento de neutrófilos e estimula a fagocitose por macrófagos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; JIANG et al., 2006).

Afim de examinar a produção de citocinas pelas células T de pacientes com ES, um estudo com uma grande coorte (n=53) avaliou os níveis de IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, fator estimulador de colônia de macrófagos (GM-CSF), IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  plasmáticos e intracelulares e habilidade intrínseca de subconjuntos de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> em produzir essas citocinas após ativação *in vitro*. Foram demonstrados altos níveis de IL-13 avaliados por imunofluorimetria (plataforma Luminex), produzidos após ativação de células TCD8<sup>+</sup> do sangue

periférico de pacientes com ES em comparação com controles saudáveis. Em contraste, as células TCD4<sup>+</sup> mostraram um nível mais baixo e mais variável de produção de IL-13. Esta anormalidade correlacionou-se com a extensão da fibrose e foi mais pronunciada nos pacientes com ES difusa do que em ES limitada. As outras citocinas avaliadas não diferiram entre os grupos (FUSCHIOTTI; MEDSGER; MOREL, 2009).

Estudos têm demonstrado, também, que as células TCD8<sup>+</sup> são predominantemente abundantes nas lesões da pele de pacientes nos estágios iniciais da doença cutânea difusa em comparação com pacientes com doença em estágio avançado (FUSCHIOTTI; MEDSGER; MOREL, 2009; LI et al., 2017). O isolamento de células TCD8<sup>+</sup> da pele lesionada de pacientes com ES difusa precoce demonstrou que eles expressam moléculas citolíticas e coexpressam níveis extremamente altos de IL-13 e IFN- $\gamma$ . Outros estudos (AYANO et al., 2015; FUSCHIOTTI et al., 2013) corroboram esses achados e sugerem que as células TCD8<sup>+</sup> contribuem para a patogênese da ES pela produção de altos níveis de citocinas com função pró-inflamatória e pró-fibrótica, bem como exibindo uma atividade citotóxica (FUSCHIOTTI, 2018).

A figura 1 mostra o papel das células T CD8<sup>+</sup> na ES proposto por Fuschiotti (2018).



**Fig. 1 Modelo para o papel das células T CD8<sup>+</sup> na patogênese da ES.** O esquema ilustra um mecanismo pelo qual as células T CD8<sup>+</sup> residentes do tecido, ativadas em resposta à estimulação induzida por antígeno, produzem citocinas que contribuem para a inflamação e promovem superprodução de colágeno por fibroblastos que resulta em excessiva fibrose. A ativação de vias citotóxicas mediadas por células podem estar envolvidas em danos vasculares precoces e, potencialmente, podem iniciar e propagar uma resposta autoimune específica. A apoptose de células alvo induzida por CD8<sup>+</sup> também pode contribuir para a fibrose.

IFN: interferon; TNF: fator de necrose tumoral; IL: interleucina; PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas; MCP-1: proteína quimiotática de monócitos; TGF: fator transformador do crescimento

**Fonte:** adaptado de Fuschiotti (2018).

Os componentes da imunidade natural, como a NK (CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>), e células *NK-like* (CD56<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>), também podem ter um papel no desenvolvimento e progressão da ES. Em 2016, Cossu e colaboradores investigaram a resposta das células CD56<sup>+</sup> a diferentes estímulos de ativação em pacientes com fenômeno de Raynaud Primário (FRP) de longa duração, ES precoce, segundo a classificação de Leroy e Medsger de 2001 (LEROY; MEDSGER, 2001), ES definida de acordo com os critérios ACR/ EULAR de 2013 ( Van den Hoogen, *et al.*, 2013) e controles saudáveis. Neste estudo, foram encontrados padrões claramente discriminativos entre os diferentes estágios da ES mais acentuadamente após a estimulação de Th1/Th2, com aumento da produção de IL-6, TNF- $\alpha$  e MIP-1 $\alpha$ /CCL3 em pacientes com ES definida em comparação com controles saudáveis e/ou FRP. Alterações iniciais foram observadas, em pacientes com ES precoce, com um padrão intermediário de secreção entre os controles saudáveis/FRP e a ES definida. As células CD56<sup>+</sup> de pacientes em diferentes estágios da ES respondem diferencialmente à estimulação de receptores do tipo TLR, destacando a relevância da imunidade natural na ES pré e pós-fibrótica (COSSU *et al.*, 2016).

O IFN-lambda 1 (IFN- $\lambda$ 1), também conhecido como IL-29, pertence à família de IFN do tipo III, pode ser expresso em múltiplos tecidos e é produzido por células mononucleares do sangue periférico humano (CMSP) e células dendríticas. Foi mostrado por Dantas e colaboradores (2015) aumento dos níveis de IFN- $\lambda$ 1 nos pacientes com ES. Além disso, encontrou-se uma correlação entre os níveis de IFN- $\lambda$ 1 e IFN- $\gamma$  e uma associação entre IFN- $\gamma$  e miosite (DANTAS *et al.*, 2015).

Várias análises evidenciam que tanto a resposta Th1 quanto a Th2 estão aumentadas na ES em comparação com controles saudáveis (SATO; HASEGAWA; TAKEHARA, 2001; TANG *et al.*, 2018). Embora a controvérsia persista, a resposta Th1 parece ser predominante nos estágios inflamatórios precoces da doença, e menos presente em estágios mais tardios (BREMBILLA; CHIZZOLINI, 2012; DANTAS *et al.*, 2018).

Os linfócitos Th2 produzem, principalmente, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, que contribuem para estimular a proliferação e diferenciação de células B. IL-6, assim como também a IL-4 e IL-13, são capazes de estimular a produção de colágeno e inibir a síntese de colagenase, e favorecem o processo de fibrose. A fibrose é a característica mais significativa da doença. Ativação e acúmulo de fibroblastos e deposição excessiva de MEC, especialmente colágeno, são as vias predominantes que levam à fibrose (WYNN, 2004).

A IL-4 e IL-13 compartilham um receptor comum, IL-4R $\alpha$ 1 e estimulam a diferenciação de células B com consequente produção de autoanticorpos (TABATA; KHURANA HERSHEY, 2007; WYNN, 2003). Muitos estudos demonstraram que IL-4 e IL-

13 podem ativar fibroblastos que aumentam a produção de MEC e colágeno. Em 2006, Distler e colaboradores mostraram que a proteína quimiocítica de monócitos 1 (MCP-1) estimulou a síntese de IL-4 em fibroblastos de pacientes com ES, e a estimulação do receptor de IL-4 com IL-4 aumentou significativamente a produção de colágeno nos fibroblastos dérmicos da ES (DISTLER et al., 2006). Já em 2007, Parel e colaboradores demonstraram que células T duplamente positivas CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> podem produzir altos níveis de IL-4, o que pode contribuir para o aumento da deposição de MEC por fibroblastos na pele de pacientes com ES (PAREL et al., 2007). Além disso, Binai e colaboradores (2012) ressaltaram que a IL-4 poderia induzir a expressão da  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) em monócitos de pacientes com ES, enquanto a expressão de  $\alpha$ -SMA aumentava a maturação de monócitos ao redor dos miofibroblastos (BINAI et al., 2012). Um estudo anterior a este, avaliou a regulação transcricional da IL-4 na expressão do gene do colágeno em fibroblastos cultivados de pele de pacientes com ES e pele saudável. Neste estudo, foi demonstrado que a IL-4 pode ser importante na promoção da biogênese das proteínas de colágeno por aumento da estabilidade e transcrição do ácido ribonucléico mensageiro (mRNA) do colágeno. Além disso, a ativação transcricional da expressão do gene do colágeno parece ter um efeito menos sensível sobre a ES do que sobre a pele saudável (LEE et al., 1996). Assim, a IL-4 não só poderia ativar fibroblastos para aumentar a produção de matriz extracelular e colágeno, mas também poderia regular a expressão de  $\alpha$ -SMA e gene do colágeno.

Em relação a IL-13, ela induz a expressão do gene *TGF $\beta$*  via IL-13R $\alpha$ 2 em macrófagos o que leva indiretamente à fibrose pois ativa fibroblastos, os diferencia em miofibroblastos e aumenta a deposição da MEC (FUSCHIOTTI, 2011). Portanto estas respostas parecem ter uma contribuição importante na patogênese da ES.

O fator de transcrição de ação "trans" específico de células T GATA-3 é uma proteína codificada pelo gene *GATA3* em humanos, capaz de regular a diferenciação de Th2 e a produção de IL-13 pelas células T efectoras Th2. Foi demonstrado por Baraut e colaboradores (2015) que o TGF- $\beta$  aumenta a síntese de IL-13 através da expressão do GATA-3 nos linfócitos T de pacientes com ES, confirmando que este fator de transcrição pode ser considerado como um novo alvo terapêutico nestes pacientes (BARAUT et al., 2015).

As células Th17 e suas citocinas associadas (IL-17, IL-22, IL-23) desempenham um papel crucial na patogênese de muitas doenças inflamatórias autoimunes, incluindo encefalomielite autoimune experimental, artrite reumatoide (AR), LES, síndrome de Sjögren e artrite induzida por colágeno (SINGH et al., 2014). Notavelmente, as células Th17 foram

implicadas na patogênese da ES. As células produtoras de IL-17 estão significativamente aumentadas no sangue periférico, lesões da pele e tecidos pulmonares de pacientes com ES (KURASAWA et al., 2000). Os níveis de IL-17A estão elevados nos estágios iniciais e ativos da ES (MURATA et al., 2008). Foi também demonstrado que os níveis de IL-6, IL-23 e IL-1 $\alpha$  estão elevados em pacientes com ES, citocinas estas que estimulam a síntese de IL-17 (LIU et al., 2016; RADSTAKE et al., 2009)

Um estudo prévio demonstrou níveis séricos elevados de IL-17 em pacientes com ES quando comparados com controles saudáveis e estes foram correlacionados com a extensão da fibrose cutânea pelo score de Rodnan modificado. Este estudo propôs uma hipótese de que a desregulação da produção de TGF- $\beta$  e IL-6 podem levar ao desequilíbrio de Th17 vs. Treg na ES (MURATA et al., 2008).

Um estudo publicado em 2014 conduzido por Yang e colaboradores, avaliou a presença de células Th17 e Treg em pacientes com ES e o papel das células Th17 na produção de colágeno em fibroblastos de pacientes com ES. Foram analisados, por imuno-histoquímica, os perfis celulares inflamatórios em amostras de pele de 13 pacientes com ES. Em CMSP de 45 pacientes com ES e 24 controles saudáveis foi avaliada por citometria de fluxo a porcentagem de células Th17 e Treg ; expressão gênica de colágeno tipo 1 e 3, ROR $\gamma$ t, *forkhead P3* (FOXP3) e IL-17 por reação em cadeia polimerase da transcrição reversa em tempo real; e IL-17 em soros e sobrenadantes de cultura por ensaio imunoenzimático (ELISA). Investigou-se também o efeito da IL-17 derivada de células Th17 no crescimento de fibroblastos e na produção de colágeno. Foi demonstrado infiltração de células inflamatórias, incluindo os linfócitos IL-17<sup>+</sup> e Treg (Foxp3<sup>+</sup>), nas amostras de pele de pacientes com ES precoce. As porcentagens de células Th17 circulantes e a produção de IL-17 foram elevadas em amostras de pacientes com ES ativa, enquanto a porcentagem de células Treg circulantes não foi afetada. O número de células Th17 estava intimamente relacionado com a atividade da doença. A IL-17 de pacientes com ES foi capaz de promover o crescimento de fibroblastos e a produção de colágeno, enquanto o anticorpo neutralizante de IL-17 bloqueou efetivamente a produção de colágeno. Desta forma, os autores concluíram que a progressão da ES pode estar relacionada à expansão das células Th17 circulantes e ao aumento da infiltração de células IL-17<sup>+</sup>. A IL-17 derivada de Th17 está envolvida no crescimento de fibroblastos e na produção de colágeno. Os autores sugeriram que o anticorpo bloqueador da IL-17 poderia ser uma estratégia útil para intervenção no curso fibrótico da ES (YANG et al., 2014).

#### 1.4 CÉLULAS T REGULATÓRIAS (TREG) E O TGF- $\beta$ NA ES

As células Treg são classificadas em Treg naturais (nTreg) e Treg induzida ou adaptativa (iTreg). Treg naturais, descritas como células T CD25<sup>+</sup> (receptor de IL-2 cadeia alfa) e CD4<sup>+</sup> expressam o fator de transcrição FOXP3 e estão naturalmente presentes no sistema imunológico normal (5-10% das células T CD4<sup>+</sup>). Sua deficiência favorece o surgimento de doenças autoimunes (BARAUT et al., 2010). As células Tregs circulantes podem ser subdivididas em frações de repouso ou ativadas pela expressão de FOXP3, CD25 (receptor de IL-2 cadeia alfa) e CD45RA (um marcador de células T naïve). Em repouso, as Tregs possuem o fenótipo FOXP3<sup>low</sup>CD45RA<sup>hi</sup>CD25<sup>low</sup> com função supressora e podem se proliferar e transformar-se em Tregs ativadas, reconhecidas pelo fenótipo FOXP3<sup>hi</sup>CD45RA<sup>low</sup>CD25<sup>hi</sup>. A terceira fração conhecida de Tregs, são as residentes em tecidos caracterizadas por serem subespecializadas e desempenharem um papel na regulação imune local (SLOBODIN; RIMAR, 2017).

As principais citocinas produzidas pelas células Treg são o TGF- $\beta$  e IL-10. O TGF- $\beta$  também pode inibir o desenvolvimento dos subtipos Th1 e Th2 (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). No entanto, o TGF- $\beta$  estimula o desenvolvimento de células Treg FOXP3<sup>+</sup> periféricas e, quando em combinação com citocinas produzidas durante respostas imunológicas inatas (como IL-1 e IL-6), promove o desenvolvimento do subtipo Th17 de células T CD4<sup>+</sup>. A habilidade do TGF- $\beta$  de suprimir as respostas imunológicas e inflamatórias, em parte por meio da produção de células Treg, e também de promover o desenvolvimento de células Th17 pró-inflamatórias, na presença de outras citocinas, é um exemplo interessante de como uma única citocina pode ter diversas ações (às vezes opostas), dependendo do contexto na qual é produzida (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Alguns estudos indicaram que as células Treg podem ser transformadas em células Th17 na presença de IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-23 ou TGF- $\beta$  (VALMORI et al., 2010). Tregs podem contribuir para o desenvolvimento da ES pela transformação em células Th17 dependendo do microambiente e Tregs residentes na pele podem se transformar em células Th2, produzindo suas citocinas pró-fibróticas (MACDONALD et al., 2015).

Evidências de alterações funcionais e numéricas de células Treg na ES foram demonstradas em vários estudos, mas seu papel na ES é ainda controverso. Radstak e colaboradores demonstraram um aumento no número total de células Treg em pacientes com ES, mas essas células tiveram uma capacidade funcional diminuída para suprimir as células T CD4<sup>+</sup> efectoras, que dependiam de um fator sérico não identificado (Radstak *et al.*, 2009).

Alguns estudos evidenciaram que o número de células Treg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> em lesões de pele e sangue periférico de pacientes com ES está significativamente aumentado (LIU et al., 2013). No entanto, outros estudos demonstraram que, em comparação com indivíduos saudáveis, o número de células Treg em pacientes com ES são reduzidos e apresentam uma função anormal (ANTIGA et al., 2010; KLEIN et al., 2011).

O desequilíbrio imunológico entre as células Treg e Th17 é uma característica da ES. A heterogeneidade funcional entre Treg pode ser elucidada pela separação de Treg em diferentes subconjuntos baseados na expressão de FOXP3 e CD45RA. Um estudo investigou o papel dos subconjuntos de Treg na ES e avaliou, por citometria de fluxo, a expressão de CD4, CD25, CD45RA, CTLA-4, FOXP3 e IL-17 em CMSPs de 31 pacientes com ES e 33 controles saudáveis. A frequência de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> foi significativamente elevada em pacientes com ES (3.6261,14 vs 1.9760,75, p<0,001) porém com diminuição da capacidade de imunossupressão, evidenciada pelo estado proliferativo das células T respondedoras de um doador saudável cocultivado com as células Treg de pacientes com ES ou outros doadores saudáveis. Neste estudo pode-se concluir que ocorre o aumento de Treg disfuncionais em pacientes com ES, potencialmente provocando o desequilíbrio imunológico entre as células Treg e Th17 (LIU et al., 2013).

O TGF- $\beta$  é uma potente citocina pró-fibrótica (Leask e Abraham, 2004). Análises de microarranjos de DNA indicam que um grupo de genes TGF- $\beta$  dependentes estão superexpressos em biópsias de lesões cutâneas de pacientes com esclerodermia (WHITFIELD et al., 2003). TGF- $\beta$  é também um bom indutor de miofibroblastos e modula a expressão de vários receptores de citocinas, incluindo receptores para TGF- $\beta$  e do PDGF. Na verdade, o TGF- $\beta$  constitui uma família de moléculas muito relacionadas codificadas por genes distintos, comumente designadas por TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3. As células do sistema imunológico sintetizam principalmente TGF- $\beta$ 1. O TGF- $\beta$ 1 é produzido por células Treg CD4<sup>+</sup>, macrófagos ativados e vários outros tipos celulares. O receptor de TGF- $\beta$ 1 consiste em duas proteínas diferentes (TGF- $\beta$ R1 e TGF- $\beta$ R2), ambas as quais fosforilam fatores de transcrição chamados de SMADs. Durante a ligação da citocina, um domínio quinase serina/treonina do TGF- $\beta$ R1 fosforila o SMAD2 e o SMAD3 que, juntos ao SMAD4 formam um complexo que se transloca para o núcleo, liga-se aos promotores dos genes alvo e regula a transcrição dos mesmos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Isso leva à regulação transcricional de genes alvo, incluindo aqueles que codificam proteínas da MEC, como os colágenos tipo I e III. Além da via SMAD, o TGF- $\beta$ 1 também é capaz de ativar as vias de sinalização independentes de SMAD, como quinase regulada por sinais Ras-Extra-Celular (ERK),

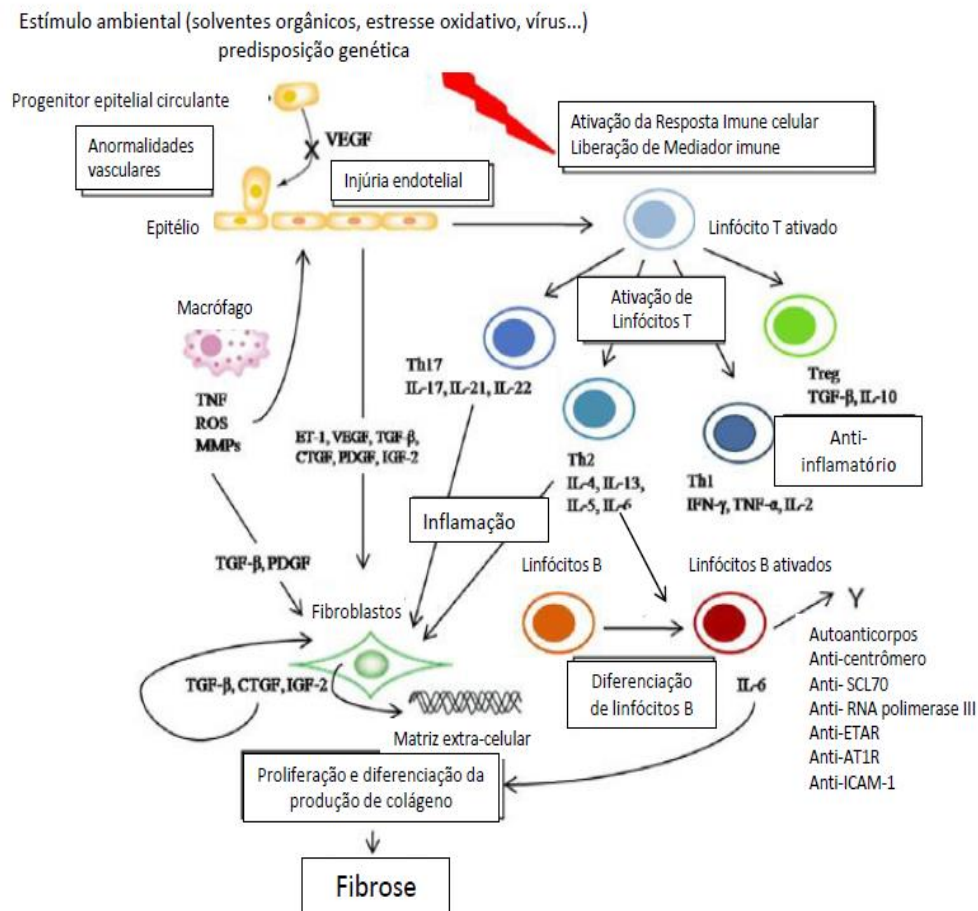
quinase N-terminal c-Jun (JNK), p38, proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) e fosfatidilinositol 3-quinase-Akt. Além disso, o TGF- $\beta$ 1 é uma das citocinas pró-fibróticas mais potentes, capaz de regular positivamente as proteínas da MEC, regular negativamente as metaloproteinases da matriz (MMPs), induzir a diferenciação dos miofibroblastos e modular a expressão de vários receptores de citocinas (BARAUT et al., 2015).

Análises imunohistoquímicas mostram que a expressão das isoformas do TGF- $\beta$  se apresenta de modos diversos. Em 1993, Sfikakis e colaboradores, investigaram a expressão das três isoformas do TGF- $\beta$  por biópsia de pele de pacientes com ES e controles saudáveis. Neste estudo foi evidenciado o aumento do TGF- $\beta$ 2 nas amostras de pele de pacientes com ES (SFIKAKIS et al., 1993). Já Ozbilgin e Inan, em 2003, tentaram elucidar o desempenho dos mastócitos e do TGF- $\beta$ 3 na patogênese da formação anormal do tecido conjuntivo na ES. Neste estudo, biópsias de pele de 20 pacientes com ES e de 5 indivíduos saudáveis foram estudadas por uma técnica de imunoperoxidase indireta para determinar a imunorreatividade do TGF- $\beta$ 3 na derme. Além disso, amostras de pele foram coradas com azul de toluidina para contar o número de mastócitos nas amostras de pele de pacientes com ES, e os tecidos foram examinados sob o microscópio eletrônico para avaliar as alterações ultraestruturais. Aumento da imunorreatividade de TGF- $\beta$ 3 foi detectado na derme na pele dos pacientes com ES, sugerindo a presença de uma subpopulação responsável pelo aumento da produção de colágeno. A contagem de mastócitos na pele de pacientes com ES foi significativamente maior ( $19,2 \pm 4,1$  / unidade) do que nos controles normais ( $4,4 \pm 1,2$  / unidade). Observações ultraestruturais indicaram que existe uma estreita relação entre os mastócitos e fibroblastos. Esses resultados sugerem que a fibrose na ES poderia evoluir por meio da ativação de fibroblastos e dos mecanismos regulatórios que parecem modular o comportamento dessas células em relação à produção de colágeno (Ozbilgin e Inan, 2003). Já no estudo de Dziadzio e colaboradores (2005), avaliou-se os níveis de TGF- $\beta$ 1 em soros de pacientes com ES pelo método de ELISA e encontraram uma correlação inversa inesperada entre os níveis de TGF- $\beta$ 1 e o escore cutâneo modificado de Rodnan (MRSS), uma medida clínica da gravidade da doença de pele. Sugerindo que o TGF- $\beta$ 1 ativo pode ser sequestrado na pele da ES ativa envolvida e que os níveis séricos estão reduzidos, apesar de fortes evidências implicarem as isoformas de TGF- $\beta$  na patogênese da fibrose (DZIADZIO et al., 2005).

## 1.5 CÉLULAS B E ES

As células B desempenham um papel crítico na autoimunidade pelo sistema imunológico humoral. As anormalidades das células B na ES são caracterizadas por ativação policlonal destas células, produção de autoanticorpos específicos que podem aparecer anos antes do espessamento cutâneo. Embora as células B sejam detectadas de forma variável nas lesões cutâneas da ES, há evidências de superativação destas células na sua patogênese (SANGES et al., 2017). As células B de pacientes com ES superexpressam o receptor estimulador de células B CD19 em 54% dos pacientes com ES precoce e em 28% naqueles com doença de longa duração em comparação com controles normais. Em contraste, a função de CD22, uma molécula de célula B inibitória, é inibida pelos autoanticorpos anti-CD22 presentes em pacientes com ES. Um aumento da relação CD19/CD22 pode facilitar a ativação sustentada de células B e consequente superprodução de vários anticorpos. Os anticorpos antinucleares são encontrados nos soros da vasta maioria dos pacientes com ES, e sua especificidade antigênica correlaciona-se significativamente com as características clínicas da doença. Eles são atualmente os biomarcadores mais confiáveis para diagnóstico, classificação e previsão de características clínicas específicas da ES. Certos autoanticorpos, como anticorpos anti-topoisomerase I, anti-centrômero, anti-RNA polimerase III, anti-U3 RNP, anti-Th/To e anti-U1 RNP, estão intimamente associados a características clínicas distintas e atividades da doença. Outros autoanticorpos dirigidos a uma variedade de autoantígenos citoplasmáticos, de membrana celular e extracelulares também foram detectados na ES. Alguns deles, tais como anti-moléculas de adesão intercelular-1 (ICAM-1), anti-endotelina tipo A (ETAR) e anti-angiotensina II tipo I (AT1R), podem ser funcional e patogênico. Os anticorpos anti-ICAM-1 induzem a produção de ROS e a expressão da molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), que pode facilitar a ligação de células imunes. Os autoanticorpos anti-ETAR e anti-AT1R, detectados na maioria dos pacientes com ES, são anticorpos agonistas que regulam positivamente a expressão de TGF- $\beta$ , IL-8 e VCAM-1 das células endoteliais e causam fibrose, vasoconstrição e recrutamento de células imunes (FURUE et al., 2017). Tendo delineado a importância das células B na patogênese da ES, parece que devemos direcionar terapias contra as células B nesta doença de difícil controle. A depleção de células B com rituximabe é uma estratégia promissora e deve ser testada em um estudo controlado randomizado apropriado (FURUE et al., 2017)

A figura 2 propõe um modelo esquemático da complexa rede citocinas envolvida na fisiopatologia da ES.



**Fig. 2 Fisiopatologia da Esclerose Sistêmica.** Lesões em células endoteliais iniciam a resposta imune inata (recrutamento de linfócitos, liberação de TNF e ROS por macrófagos) e adaptativa (produção de citocinas e fatores de crescimento). Os linfócitos T e B ativados produzem citocinas pró-fibróticas e pró-inflamatórias. Os linfócitos B também produzem autoanticorpos envolvidos na autoimunidade. A inflamação crônica e o defeito de recrutamento (devido a anormalidades vasculares) levam à fibrose. ET-1: endotelina-1; VEGF: fator de crescimento vascular; TGF-β: fator de crescimento transformador beta; CTGF: fator de crescimento do tecido conjuntivo; PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas; IGF-2: fator de crescimento semelhante a insulina 2; TNF: fator de necrose tumoral; ROS: espécies reativas de oxigênio; MMP: metaloproteínas de matriz; IL: interleucina; ETAR: endotelina tipo A; AT1R: angiotensina II tipo 1; ICAM: moléculas de adesão intercelular-1

**Fonte:** adaptado de Baraut *et al.*, 2010 e Furue *et al.*; 2017

## 1.6 ADIPONECTINA E ES

O tecido adiposo possui uma função endócrina que ajuda a regular processos imunes e a inflamação, secretando mediadores bioativos chamados adipocinas. Adipocinas, incluindo adiponectina, leptina e resistina, são sintetizadas no tecido adiposo e mostraram-se importantes na patogênese das doenças autoimunes (COELHO; OLIVEIRA; FERNANDES, 2013). A adiponectina é uma proteína plasmática de 30 kDa produzida principalmente por adipócitos / macrófagos, que funciona como um fator anti-inflamatório e antifibrótico

(SHEHZAD et al., 2012). A adiponectina inibe a maturação, a proliferação e a atividade fagocítica de macrófagos, bem como a produção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  em resposta à estimulação com lipopolissacarídeos (LPS). Além disso, a adiponectina promove a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos, cujo acúmulo pode desencadear inflamação ou disfunção do sistema imune. Reduz a secreção e a atividade do TNF- $\alpha$  e da IL-6 e induz a produção de mediadores anti-inflamatórios, como IL-10 e antagonista do receptor de IL-1 (IL-1 RA), em monócitos, macrófagos e células dendríticas. A adiponectina também aumenta o número de células Treg. Por outro lado, promove a maturação e ativação de células dendríticas. Curiosamente, tanto o TNF- $\alpha$  quanto a IL-6 são inibidores potentes da secreção de adiponectina, o que sugere a existência de um *feedback* negativo entre as citocinas pró-inflamatórias e a adiponectina. Outros efeitos anti-inflamatórios da adiponectina envolvem a supressão da atividade citotóxica de células NK induzida por IL-2. Na imunidade adaptativa, inibe a ativação e proliferação de linfócitos T e linfopoiese de células B (VERSINI et al., 2014).

Foi realizada uma meta-análise sobre os níveis séricos / plasmáticos de adiponectina em pacientes com ES e controles, e foram analisados subgrupos com base na etnia e / ou tipo de doença. Onze estudos (511 pacientes com ES e 341 controles) foram incluídos e revelou-se que os níveis de adiponectina foram significativamente menores em pacientes com ES do que nos controles. A estratificação por etnia mostrou baixo nível de adiponectina associado à ES em caucasianos, embora esse resultado não tenha sido estatisticamente significativo. A estratificação por tipo de doença revelou que o nível de adiponectina foi significativamente menor na ES difusa, mas não na ES limitada, do que no controle. Nesta meta-análise concluiu-se que os níveis de adiponectina circulante é significativamente menor em pacientes com ES do que nos controles. Essa diferença era aparente no tipo difuso de ES, mas não no tipo limitado (LEE; SONG, 2016).

Outra meta-análise incluiu quatorze estudos e entre eles, seis avaliaram os níveis séricos de adiponectina em pacientes com ES, seis estudaram os níveis séricos de leptina em pacientes com ES, e dois deles níveis séricos de adiponectina e leptina em pacientes com ES. Os resultados mostraram que os níveis séricos de adiponectina nos pacientes com ES eram significativamente menores do que nos controles normais. No entanto, não houve diferenças significativas nos níveis séricos de leptina entre pacientes com ES e controles saudáveis. Nesta meta-análise, concluiu-se que os níveis séricos de adiponectina, mas não os níveis séricos de leptina, em pacientes com ES foram significativamente menores do que em controles normais (ZHAO et al., 2017). Outro estudo avaliou o nível de adiponectina por

ELISA sanduíche em soro de 29 pacientes e 30 controles saudáveis e tentou-se correlacionar com o envolvimento orgânico pulmonar. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nos níveis séricos de adiponectina entre os pacientes com ES e os controles. No entanto, as concentrações séricas de adiponectina foram significativamente menores em pacientes com doença ativa que inativa. Eles também se correlacionaram com a capacidade vital (CV) e negativamente com o índice de atividade da doença de Valentini. Neste estudo concluiu-se que a adiponectina sérica deve ser investigada como candidata a marcador de atividade de doença (OLEWICZ-GAWLIK *et al*, 2015).

Apesar de controverso, alguns estudos demonstraram aumento de adiponectina em doenças autoimunes como LES, AR, Síndrome de Sjogren, ES e polimiosite (SADA *et al*, 2006; ŠENOLT *et al*, 2006; TOUSSIROT *et al*, 2010). As propriedades anti-inflamatórias bem documentadas da adiponectina foram assunto de debate no que diz respeito às doenças reumáticas inflamatórias (KHALTAEV *et al*, 2004). Esta discrepância já foi observada em estudos que evidenciavam uma produção aumentada de moléculas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-8, MCP-1 e metaloproteinase de matriz (MMP) após a estimulação da adiponectina (LAPPAS; PERMEZEL; RICE, 2005; ROVIN; SONG, 2006). Essa característica pró-inflamatória pode ser explicada pelo fato de que a adiponectina circula principalmente como um hexâmero de baixo peso molecular (LMW) e um multímero de alto peso molecular (HMW) que induz respostas específicas de isoformas. Foi descoberto que apenas a adiponectina LMW apresenta propriedades anti-inflamatórias e a adiponectina HMW pode ser responsável por efeitos pró-inflamatórios (NEUMEIER *et al*, 2006). Desse modo, a análise de isoformas de adiponectina específicas pode ser de grande importância na determinação desses diversos efeitos. Além disso existe uma diferença em relação à produção desta adipocina de acordo com o sexo do indivíduo, uma vez que ocorre inibição da secreção de adiponectina HMW pela testosterona (XU *et al*, 2005).

### 1.7 TRATAMENTO DA ES

O tratamento da ES ainda se constitui um desafio e deve ser conduzido com uma profunda compreensão dos conceitos atuais da patogênese da doença sendo baseado em seus subtipos e suas manifestações clínicas. É a doença mais letal do tecido conjuntivo com várias opções de tratamento que demonstraram fornecer apenas benefícios modestos a moderados (KOWAL-BIELECKA *et al*, 2017).

Embora os desfechos do tratamento não sejam satisfatórios, agentes imunossupressores e imunomoduladores, como corticosteróides, hidroxicloroquina (HCQ), metotrexato (MTX), ciclofosfamida (CFM), micofenolato mofetil (MMF) e rituximabe (RTX), estão sendo

utilizados atualmente (FURUE et al., 2017). Os corticosteróides inibem a produção de citocinas por macrófagos (IL-1 e TNF- $\alpha$ ) e linfócitos (IL-2), via inibição da transcrição de NF- $\kappa$ B e a HCQ inibe os TLR e reduzem os níveis de IFN- $\alpha$ , estas medicações são utilizadas para sintomas como mialgia, artralgia e artrite (BARAUT et al., 2010).

O MTX inibe os linfócitos T e as moléculas de adesão em sua superfície; o MMF é um inibidor da produção de colágeno tipo I e da proliferação de linfócitos; a CFM suprime as respostas das células T e B (BARAUT et al., 2010) e o RTX é um anti-CD20, ou seja, um depletor de células B. Estes imunossupressores demonstraram benefícios para o tratamento do espessamento cutâneo e da DIP (FURUE et al., 2017).

A bosentana, um inibidor específico da endotelina-1, demonstrou ser eficaz na redução da frequência de úlceras digitais recidivantes, mas não alterou a progressão da doença pulmonar intersticial em pacientes com ES (BARAUT et al., 2010).

Algumas terapias emergentes ainda necessitam de estudos mais conclusivos. O fresolimumabe, um anticorpo neutralizante que atinge todas as três isoformas do TGF- $\beta$ , também diminui a fibrose da pele com a redução histológica dos miofibroblastos dérmicos. Quanto ao anticorpo anti-IL-6 (tocilizumabe), um ensaio randomizado controlado revelou uma tendência a reduzir o espessamento da pele em comparação com o placebo, mas não de forma significativa (FURUE et al., 2017).

A eficácia limitada das terapias disponíveis pode ser explicada por vários fatores, incluindo heterogeneidade da doença, falta de compreensão completa da fisiopatologia, uso limitado de combinação de medicamentos ou terapia de manutenção. Além disso, a baixa incidência da doença dificulta a realização de ensaios clínicos para demonstrar benefício. No entanto, muitos avanços no campo foram feitos pelo uso de terapias imunossupressoras que pelo menos impediram a progressão da doença. (ELDOMA; POPE, 2018).

Uma vez que as fases da doença exibem perfis de citocinas diferentes, torna-se fundamental que o tratamento seja específico à fase da doença em que o paciente se encontra, procurando restabelecer o equilíbrio entre os perfis Th1/Th2 ou Th17/Treg. No futuro, a restauração deste equilíbrio mostra-se como uma estratégia terapêutica mais eficaz, assim como o tratamento de AR com os moduladores de citocinas.

## **2 JUSTIFICATIVA**

A patogênese da ES é complexa e ainda pouco compreendida, o que dificulta o desenvolvimento de novos medicamentos que sejam realmente eficazes para o tratamento. Até o presente momento, estudos que avaliaram os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias em indivíduos com ES apresentaram resultados conflitantes. Além disso, há uma escassez de estudos que tenham avaliado o perfil de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias concomitantemente. Sendo assim, a avaliação do conjunto destas moléculas se faz necessária para o maior entendimento da fisiopatologia da ES. O melhor entendimento do envolvimento das citocinas na fisiopatologia da ES poderá contribuir para a descoberta de novos biomarcadores associados à doença assim como possíveis novos alvos terapêuticos.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar os níveis plasmáticos e os perfis de citocinas pró e anti-inflamatórias e de adiponectina e determinar modelos preditores que auxiliem no diagnóstico da ES.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Comparar os níveis séricos das citocinas pró e anti-inflamatórias e de adiponectina em pacientes com ES e controles saudáveis.
- Estabelecer os perfis de citocinas (pró e anti-inflamatórias) que predominam em pacientes com ES.
- Propor modelos de predição de ES utilizando as citocinas avaliadas individualmente ou em perfis.

## 4 SUJEITOS E MÉTODOS

### 4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO E ASPECTOS ÉTICOS

Este é um estudo caso-controle que incluiu 117 participantes de ambos os sexos, com idade entre 18 e 70 anos, sendo 42 pacientes com diagnóstico de ES (ES difusa: n=7 e ES limitada: n=35) atendidos no Ambulatório de Reumatologia do Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário (AEHU) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e 75 indivíduos saudáveis (grupo controle) selecionados entre doadores de sangue do Hemocentro Regional de Londrina. Os critérios de exclusão foram o paciente apresentar doenças renais, adrenais, hepáticas, infecciosas agudas e crônicas e oncológicas. O diagnóstico de ES foi realizado pelo médico reumatologista de acordo com os critérios propostos pelo ACR/ EULAR de 2013 (Van Den Hoogen *et al.*, 2013).

A realização dessa pesquisa seguiu as normas de boas práticas clínicas (Organização Pan-americana de Saúde, 2005) e foi conduzida de acordo com os princípios expressos na Declaração de Helsinki e suas alterações posteriores. O Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UEL aprovou o estudo conforme o número CAAE: 65509817.7.0000.5231, Número do Parecer: 2.183.282 (ANEXO A). O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi obtido de todos os indivíduos que aceitaram participar do estudo (APÊNDICE A).

### 4.2 DADOS DEMOGRÁFICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E ANTROPOMÉTRICOS

Os dados demográficos, epidemiológicos e antropométricos foram obtidos em uma consulta clínica realizada pelo médico reumatologista de acordo com uma ficha de avaliação (APÊNDICE B) estabelecida pelos pesquisadores. Informações sobre estilo de vida e atividade física foram coletadas.

Para os dados antropométricos foram registradas as seguintes informações: peso corporal, realizado em uma balança digital com precisão de 0,1 Kg no período da manhã e com os indivíduos vestindo roupas leves e sem sapatos; altura, mensurada por um estadiômetro com precisão de 0,1 cm; Circunferência abdominal (CA), utilizando uma fita métrica na região entre a última costela e a crista íliaca com os pacientes em pé e expresso em cm e o IMC foi calculado pela divisão entre o peso corporal e o quadrado da altura e expresso em Kg/m<sup>2</sup>. A pressão arterial foi aferida utilizando um esfigmomanômetro calibrado, no braço

esquerdo dos pacientes, sentados, com no mínimo 5 minutos de repouso (PICKERING et al., 2005). O diagnóstico de hipertensão arterial foi estabelecido em pacientes cuja pressão arterial estava  $\geq 140/90$  mmHg ou em uso de algum medicamento anti-hipertensivo (JAMES et al., 2014).

#### 4.3 COLETA DE SANGUE E EXAMES BIOQUÍMICOS

Após jejum de 12 horas, os pacientes foram submetidos a uma coleta de material sanguíneo com punção venosa utilizando tubos estéreis (BD Vacutainer UltraTouch, Franklin Lakes, NJ, EUA) de coleta à vácuo com anticoagulante contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). As amostras foram encaminhadas ao laboratório para a realização do cadastro, processamento, separação por centrifugação a 2.500 rpm, 10 min. e armazenamento. O plasma foi aliquoteado em microtubos de centrifugação de 2 mL devidamente identificados com número e iniciais de cada paciente e armazenados em *freezer* - 80°C até a realização da dosagem de citocinas.

#### 4.4 DOSAGEM DE CITOCINAS

Os níveis plasmáticos das citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6) e das anti-inflamatórias (IL-4) e adiponectina foram determinados simultaneamente, utilizando *kit ProcartaPlex* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Viena, Austria), por imunofluorimetria utilizando a plataforma Luminex. Os níveis plasmáticos do TGF- $\beta$  também foram avaliados utilizando o *kit ProcartaPlex Human TGF beta 1 Simplex* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Viena, Austria). Os resultados foram expressos em pg/mL

Após a dosagem, os níveis séricos de citocinas foram transformados nas mesmas escalas (escore z) para comparação individual e criação de perfis: 1) Perfis pró-inflamatórios: M1 (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ), Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$ ); 2) Perfis anti-inflamatórios: Th2+Treg (IL-4, TGF- $\beta$ ); Th2+ Treg+ adipo (IL-4, TGF- $\beta$ + adiponectina) segundo Maes e Carvalho (2018) (MAES; CARVALHO, 2018).

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de variância (ANOVA) e análise de tabelas de contingência (teste de Qui-quadrado) foram utilizadas para avaliar diferenças nos dados nominais e contínuos

(demográficos e clínicos) entre os grupos de estudo. Empregamos uma análise multivariada de modelo linear geral (GLM) para delinear os efeitos do diagnóstico sobre os níveis de citocinas ou escores compostos, enquanto ajustamos para idade, IMC, sexo e etnia. Quando a análise GLM multivariada mostrou efeitos significativos, o teste de efeito entre os sujeitos foi empregado para verificar os efeitos do diagnóstico (e variáveis confundidoras) nas citocinas ou nos escores compostos. A média marginal estimada do modelo generalizado, com desvio padrão (DP), foram computados. Os resultados das comparações múltiplas foram corrigidos com p para taxa de falsas descobertas (FDR) (Benjamini e Hochberg, 1995). As associações entre as variáveis foram avaliadas usando os coeficientes de correlação de Pearson. Utilizamos a análise de regressão logística binária para delinear os melhores preditores de ES (como variável dependente e não-ES como grupo referência); os 8 níveis de citocinas ou escores compostos ponderados pela unidade z foram usados como variáveis explicativas. Análises de regressão sempre foram verificadas por multicolinearidade e todos os resultados foram *bootstrapped* (2000 *bootstraps*) e os últimos resultados foram mostrados se houver diferenças entre os resultados *bootstrapped* e não *bootstrapped*. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando IBM SPSS, versão do Windows 24. A significância estatística foi estabelecida em  $\alpha < 0,05$  (bicaudais). Com base nos conhecidos perfis de citocinas M1, Th1, Th2 e Treg (MAES; CARVALHO, 2018), calculamos as pontuações compostas ponderadas pela unidade z representando esses fenótipos da seguinte forma:

- 1) Macrófago M1: computado como valor de z  $IL-1$  ( $zIL-1$ ) +  $zIL-6$  +  $zTNF-\alpha$ ;
- 2) Perfil Th1: computado como  $zIFN-\gamma$  +  $zIL-2$ ;
- 3) M1+ Th1: computado como  $zIL-1$  +  $zIL-6$  +  $zTNF-\alpha$  +  $zIL-2$  +  $zIFN-\gamma$
- 4) Th2 + perfil Treg: computado como  $zIL-4$  +  $zTGF-\beta$ ;
- 5) Th2+Treg+adipo: computado como  $zIL-4$  +  $zTGF-\beta$ + z adiponectina, e refletindo um índice anti-inflamatório e regulatório imune.
- 6) M1+Th1/ Th2+Treg: computado como  $z(zIL-1 + zIL-6 + zTNF-\alpha + zIL-2 + zIFN-\gamma) - z(zIL-4 + zTGF-\beta)$ ;
- 7) M1+ Th1/ Th2+ Treg+ adipo: computado como  $z(zIL-1 + zIL-6 + zTNF-\alpha + zIL-2 + zIFN-\gamma) - z(zIL-4 + zTGF-\beta+z adiponectina)$

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho foram apresentados e discutidos em um artigo científico intitulado: **INCREASED ADIPONECTIN, TH2, AND TREG RESPONSES IN PATIENTS WITH SYSTEMIC SCLEROSIS: USE AS A PREDICTOR OF DIAGNOSIS** e será submetido à revista *CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE*.

### **INCREASED ADIPONECTIN, TH2, AND TREG RESPONSES IN PATIENTS WITH SYSTEMIC SCLEROSIS: USE AS A PREDICTOR OF DIAGNOSIS**

Meline Angélica Cunha Rotter Ferreira<sup>1,2</sup>, Michael Maes<sup>3,4</sup>, Andréa Name Colado Simão<sup>5</sup>.

<sup>1</sup>Laboratory of Research in Applied Immunology, University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

Department of Dermatology, University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

<sup>2</sup>Department of Rheumatology – University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

<sup>3</sup> IMPACT Strategic Research Centre, School of Medicine, Deakin University, Geelong, VIC, Australia.

<sup>4</sup> Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

<sup>5</sup> Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Laboratory of Research in Applied Immunology, University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

\* Corresponding author: Andréa Name Colado Simão.

Postal address: Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology – Rua Robert Koch, n 60. University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil. CEP: 86038-440. Tel.: +55-43-3371-2321; Fax: +55-43-3371-2619.

## ABSTRACT

Immune dysregulation is a central process in the pathogenesis of Systemic Sclerosis (SSc). The main objective of this study was to evaluate pro- and anti-inflammatory cytokine profiles and adiponectin and to determine predictive models that aid in the diagnosis of SSc. 117 patients were selected, 42 patients with systemic sclerosis and 75 healthy individuals. Cytokines were evaluated individually and in profiles. Pro-inflammatory profiles: M1 (IL-1 $\beta$  + IL-6 + TNF- $\alpha$ ), Th1 (IL-2+ IFN- $\gamma$ ). The anti-inflammatory cytokines formed the profile Th2 +Treg: (IL-4 + TGF- $\beta$ ) and the anti-inflammatory system (IL-4 + TGF- $\beta$  + Adiponectin). Diagnosis of SSc was strongly associated with altered cytokine levels, accounting for 67.6% of its variance, with a strong impact on IL-2 (43.7%), IL-4 (26.0%), IL -6 (12.7%), TGF- $\beta$  (19.3%) and adiponectin (24.2%). The results also showed that the diagnosis is mainly involved in the Th2 and Treg profiles, explaining 37.9% of their variation. When adiponectin was added to the anti-inflammatory profile, the effect was increased to 45.7%. In addition, a statistical model was proposed using pro (IL-2 and IFN- $\gamma$ ) and anti-inflammatory (TGF- $\beta$  and adiponectin) cytokines to predict SSc with high sensitivity (100%) and specificity (91.7%). SSc patients had a predominance of the anti-inflammatory response and these findings may be responsible for the fibrotic characteristic of the disease. This is a first study that demonstrated higher levels of adiponectin in SSc patients than controls. More studies are necessary to confirm the present results as well as to investigate the contradictory findings on adiponectin.

**Key words:** Systemic sclerosis; Scleroderma; Cytokines; Adiponectin.

## INTRODUCTION

Systemic sclerosis (SSc) is a rare autoimmune disorder characterized by multiorgan fibrosis, vascular involvement, and production of autoantibodies. SSc exhibits a severe prognosis associated with specific organ involvements and premature mortality and can still be considered as an disease of difficult therapeutic control [1]. Although certain cardinal manifestations, such as Raynaud's phenomenon and gastroesophageal reflux are often early

clinical manifestations, other clinical features can be present in SSc such as fatigue, myalgia, arthralgia [2].

SSc can generally be classified into one of two major disease subsets based on the extent of skin involvement: those with proximal involvement are classified as diffuse cutaneous SSc, whereas those with restricted involvement affecting the limbs distal to the elbows or knees, with or without face and neck involvement, are classified as limited cutaneous systemic sclerosis. A small number (<5%) of patients have clinical features (most commonly Raynaud's phenomenon, digital ulcers, and pulmonary arterial hypertension) and autoantibodies that are specific to SSc, but no skin involvement (so-called *sine* scleroderma) [2].

Vascular injury is an early event in scleroderma. It precedes fibrosis and involves small vessels, particularly the arterioles. The vascular damage, which occurs in virtually all organs, consists of large gaps between endothelial cells, loss of integrity of the endothelial lining, and vacuolization of endothelial-cell cytoplasm. In addition, there are several basal lamina-like layers, perivascular infiltrates of mononuclear immune cells (with rare lymphocytes) in the vessel wall, obliterative microvascular lesions, and rarefaction of capillaries. The remarkable paucity of small blood vessels is a characteristic finding in later stages of scleroderma [3].

Immune dysregulation is a central process in the pathogenesis of SSc. Lymphocytes and macrophages produce cytokines, which induce tissue damage, recruit additional inflammatory cells, and promote extra-cellular matrix production and fibrosis. The classification in Th1/Th2 cytokines aims to differentiate on one side, the Th1 group which produces interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), tumor necrosis factor- alfa (TNF- $\alpha$ ), interleukin -1(IL-1), IL-2, and IL-12, defined as cytokines involved in the cellular immune response, and on

another side, the Th2 group, which produces IL-4, IL-13, IL-5, IL-6, and IL-10, which includes the cytokines involved in humoral immune response. Other cytokines such as Th17, which include IL-17, IL-21, IL-22 play a major role in inflammation and T regulatory cell (Treg) involved in the immune tolerance process which produces IL-10 and TGF- $\beta$  were added to this classification [4]. The Th1/Th2-cell immune response plays a pivotal role in the development of the disease, but it has also been demonstrated that Th17 and Treg cells participate in the pathogenesis of SSc. It is postulated that an imbalance in cytokines production by these cell subsets drives inflammation in the early stages (disease duration < 3 years) of the disease (Th1 and Th17 predominantly) and fibrosis in the later stages (disease duration > 6 years) of SSc (Th2 predominantly) [5].

In turn, adiponectin, a cytokine mainly produced by adipocytes, functions as one of anti-inflammatory and anti-fibrotic factors in healthy individuals (Rovin and Song, 2006) and its aberrant expression has been reported in various pathological conditions. For instance, serum adiponectin levels are elevated in a certain subset of autoimmune diseases, including systemic lupus erythematosus (SLE), rheumatoid arthritis (RA), inflammatory bowel disease, and type 1 diabetes *mellitus* [7–9]. Indeed, studies on circulating adiponectin in patients with SSc compared to those with controls have shown mixed results [10].

Studies that assessed cytokine levels in patients with SSc are quite scarce [4,5,11], and studies that have concomitantly evaluated those cytokines with adiponectin in SSc are still scarcest [12,13] while there is insufficient information whether these cytokine or cytokine profiles may be used as laboratory biomarkers for SSc. In addition, cytokines quantification is often performed without considering pro and anti-inflammatory responses in the same patient. Hence, the main objective of this study is to evaluate cytokine profiles and the pro and anti-inflammatory in SSc patients as well as to determine models of cytokine profiles which could help to predict the diagnosis.

## **SUBJECTS AND METHODS**

### **Subjects**

This study recruited 117 individuals. Forty two patients with SSc (SSc diffuse n=7 and SSc limited n=35) were selected from the ambulatory of Rheumatology of the University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil and 75 were healthy controls. The diagnosis of SSc was determined by ACR/EULAR classification criteria for SSc [14]. Exclusion criteria were acute or chronic infectious, oncological, renal, adrenal and hepatic diseases. Information on lifestyle factors such as, smoking and physical activity, and medical history was obtained at clinical evaluation. The individuals of both groups self-reported that they did not drink alcohol regularly. This study was conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki and all procedures involving human subjects/patients were approved by the Ethical Committee of the University of Londrina, Paraná, Brazil (CAAE: 65509817.7.0000.5231). Written informed consent was obtained from all subjects.

### **Anthropometric and Blood Pressure Measurements**

Anthropometric measurements were assessed. Body weight was measured to the nearest 0.1 kg in the morning by using an electronic scale, with individuals wearing light clothing and no shoes; height was measured to the nearest 0.1 cm by using a stadiometer. BMI was calculated as weight (kg) divided by height (m) squared. Waist circumference was measured on standing subjects midway between the lowest rib and the iliac crest. Three blood pressure measurements were taken with a calibrated sphygmomanometer and a 1-min interval between on the left arm of seated patients. Subjects with blood pressure  $\geq 140/90$  mmHg or in the use of antihypertensive medications were considered to have arterial hypertension [15].

### **Cytokines Plasma Levels**

After fasting for 12 h, venous blood was withdrawn with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) using sterile tubes (BD Vacutainer UltraTouch; Franklin Lakes, NJ, USA). Whole blood was centrifuged at 2500 r.p.m. for 10 min and plasma samples were separated and divided into aliquots and then stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  for subsequent analysis. Levels of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6 and adiponectin were performed using kit ProcartaPlex (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Viena, Austria) and TGF- $\beta$  was performed using ProcartaPlex Human TGF beta 1 Simplex (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Viena Austria) both techniques for Luminesx<sup>®</sup> platform. Cytokines were analyzed individually and in profiles as follows: **Pro-Inflammatory**: macrophagic **M1**: computed as z interleukin-1 (zIL-1) + zIL-6 + zTNF- $\alpha$ ; **Th1**: zIL-2+ zIFN- $\gamma$ ; **M1+ Th1**: computed as zIL-1 + zIL-6 + zTNF- $\alpha$  + zIL-2 + zIFN- $\gamma$ ; **Anti-Inflammatory**: **Th2 + Treg**: computed as zIL-4 + zTGF- $\beta$ ; **Th2+Treg+adip**: computed as zIL-4+ zTGF- $\beta$ + z adip [16].

### **Statistical Analysis**

We used analysis of variance (ANOVA) to assess differences in scale variables among diagnostic groups, and analysis of contingency tables ( $X^2$  test) to check associations between nominal variables. The continuous variables were expressed as mean $\pm$ SD and interquartile range (q 25 and q75) values. We employed multivariate general linear model (GLM) analysis to delineate the effects of diagnosis on cytokine levels or composite scores while adjusting for age, BMI and sex. When the multivariate GLM analysis showed significant effects of diagnosis, we used tests for between-subject effects to check the effects of diagnosis (and extraneous variables) on cytokines or the composite scores. Model-generated estimated marginal mean values with SE were computed. Results of multiple comparisons were p-corrected for false discovery rate (FDR) [17]. Associations between variables were assessed

using Pearson's product moment correlation coefficients. We used binary logistic regression analysis to delineate the best predictors of scleroderma (as dependent variable and no-scleroderma as reference group); the 8 cytokine levels or z unit weighted composite scores were used as explanatory variables. Regression analyses were always checked for multicollinearity and all results were bootstrapped (2000 bootstraps) and the latter results are shown if there are differences between the bootstrapped and non-bootstrapped results. All statistical analyses were performed using IBM SPSS, Windows version 24. Statistical significance was set at alpha <0.05 (two tailed). Based on the known M1, Th1, Th2 and Treg cytokine profile [16] we have computed z unit weighted composite scores representing these phenotypes as follows:

1) macrophagic M1 profile: computed as z value of interleukin IL-1 ( $z_{IL-1}$ ) +  $z_{IL-6}$  +  $z_{TNF-\alpha}$ ;

2) Th1 profile: computed as  $z_{IFN-\gamma}$  +  $z_{IL-2}$ ;

3) M1+ Th1: computed as  $z_{IL-1}$  +  $z_{IL-6}$  +  $z_{TNF-\alpha}$  +  $z_{IL-2}$  +  $z_{INF-\gamma}$

4) Th2 + Treg profile: computed as  $z_{IL-4}$  +  $z_{TGF-\beta}$ ;

5) Th2+Treg+adipo: computed as  $z_{IL-4}$  +  $z_{TGF-\beta}$  + z adiponectin, and reflecting an anti-inflammatory and immune regulatory index;

6) M1+Th1/ Th2+Treg: computed as  $z(z_{IL-1} + z_{IL-6} + z_{TNF-\alpha} + z_{IL-2} + z_{IFN-\gamma}) - z(z_{IL-4} + z_{TGF-\beta})$ ;

7) M1+ Th1/ Th2+ Treg+ adipo: computed as  $z(z_{IL-1} + z_{IL-6} + z_{TNF-\alpha} + z_{IL-2} + z_{IFN-\gamma}) - z(z_{IL-4} + z_{TGF-\beta} + z \text{ adiponectin})$

## RESULTS

SSc patients had a mean disease duration of 11.56 (6.65) years. Regarding the clinical manifestations, 25 (59.5%) patients were affected by pulmonary fibrosis, 18 (42.8%) patients had pulmonary hypertension evidenced by the echocardiogram and 6 (14.2%) patients had digital ulcers. The laboratory data showed 37 (88%) patients antinuclear antibody (ANA) positive, 6 (14.2%) patients had positive anti-Scl-70 and 38 (90.4%) had positive anti-centromere. The medications used by the patients were: cyclophosphamide (CFM) (n=3; 7.1%), rituximab (RTX) (n=3; 7.1%), mycophenolate mofetil (MMF) (n=11; 26.1%), methotrexate (MTX) (n=13; 30.9%), azathioprine (AZA) (n=1; 2.3%), amlodipine (AMLO) (n=16; 38%), bosentan (n=4; 9.5%), hydroxychloroquine (HCQ) (n=7; 16.6%) (data not shown).

**Table 1** shows the socio-demographic and biomarker data of patients with SSc and healthy controls. There were no significant differences in BMI, smoking and systolic and diastolic blood pressure between both groups. There were somewhat more women in the scleroderma group than in controls, whilst there were more Caucasians than non-Caucasians in the scleroderma group as compared with controls. Without p-correction and without adjustment for possible effects of extraneous variables we found that IL-6, IL-2, IL-4, and TGF- $\beta$  as well as adiponectin were significantly higher in scleroderma patients than in controls. There were no significant differences in IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  between both study groups. In Table 2 we further examine these differences after considering the effects of age, sex, ethnicity and BMI.

**Table 2** shows the results of a multivariate GLM analysis with the 8 cytokine levels as dependent variables and diagnosis (scleroderma *versus* controls) as primary explanatory variable, while adjusting for sex, ethnicity, age and BMI. Tests for between-subject effects showed that IL-6, IL-2, IL-4, TGF- $\beta$  and adiponectin were significantly different between both study groups. There was a strong association between diagnosis and IL-2 (explaining 43.7% of the variance), IL-4 (26.0% of the variance), adiponectin (24.2% of the variance) and moderate association between diagnosis and TGF- $\beta$  (19.3% of the variance) and IL-6 (12.7% of the variance). These differences remained significant after p-correction for FDR. Table 2

shows that there were no significant effects of sex, age and BMI on the cytokine levels. Also smoking did not have a significant effect on the cytokine levels ( $F=0.50$ ,  $df=8/57$ ,  $P=0.850$ ). We have also examined the effects of medication drugs on the cytokines (by entering these data in the multivariate GLM analysis) and could not find any. Thus, there were no significant effects of HCQ ( $F=0.23$ ,  $df=8/58$ ,  $p=0.989$ ;  $n=6$ ), MTX ( $f=1.40$ ,  $df=8/58$ ,  $df=0.217$ ;  $n=13$ ), ANLO ( $F=0.88$ ,  $df=8/58$ ,  $p=0.542$ ;  $n=16$ ) and MMF ( $F=1.63$ ,  $df=8/58$ ,  $p=0.135$ ;  $n=10$ ) on the cytokine levels.

**Table 3** shows the model-generated estimated marginal means (in z transformations) obtained by this GLM analysis. IL-6, IL-2, IL-4, TGF- $\beta$  and adiponectin were significantly higher in patients with scleroderma than in healthy controls.

**Table 4** shows the results of a multivariate GLM analysis with the 7 z-unit weighted composite scores as dependent variables and diagnosis as primary explanatory variable, while adjusting for sex, ethnicity, age and BMI. Tests for between-subject effects showed significant associations between diagnosis and Th1, M1+Th1, Th2+Treg, M1+Th1/Th2+Treg, Th2+Treg+adiponectin, and M1+Th1/Th2+Treg+adiponectin. All these differences remained significant after p-correction for FDR. Table 4 shows that without p-correction there was an association between BMI and the 7 z-unit weighted composite scores ( $P=0.039$ ). However, after p-correction for FDR this association was no longer significant ( $P=0.078$ ). Also, not one of the tests for between-subjects effects showed (after p-correction) a significant association between BMI and the composite scores. Smoking did not have any significant effect on the composite scores ( $F=0.53$ ,  $df=4/61$ ,  $P=0.716$ ). Moreover, we could not find any effects of HCQ ( $F=0.21$ ,  $df=4/62$ ,  $P=0.932$ ), MTX ( $F=1.03$ ,  $df=4/62$ ,  $P=0.400$ ), ANLO ( $F=1.23$ ,  $df=4/62$ ,  $P=0.310$ ) and MMF ( $F=0.61$ ,  $df=4/62$ ,  $P=0.658$ ).

Interestingly, there were significant associations between M1 and Th1 ( $r=0.540$ ,  $P<0.001$ ,  $n=84$ ), M1 and Th2+Treg ( $r=0.557$ ,  $P<0.001$ ,  $n=83$ ) Th1 and Th2+Treg ( $r=0.513$ ,  $P<0.001$ ,  $n=83$ ) and among M1+Th1 and Th2+Treg ( $r=0.594$ ,  $P<0.001$ ,  $n=83$ ). These correlations allowed the profiles to be evaluated together by the GLM multivariate analysis.

**Table 5** shows that Th1, M1+Th1, Th2+Treg, and Th2+Treg+adiponectin were significantly higher in scleroderma as compared with controls, while M1+Th1/Th2+Treg and M1+Th1/Th2+Treg+adiponectin were significantly lower in scleroderma patients than in controls.

**Table 6** shows the results of 2 binary logistic regression analyses with scleroderma as dependent variable and or the composite scores or the cytokines as explanatory variables. The first regression analysis showed that scleroderma was significantly discriminated from controls using Th2+Treg+adiponectin (positive association) and M1 (negative association) as explanatory variables ( $X^2=55.09$ ,  $df=2$ ,  $P<0.001$ , Nagelkerke=0.726); 84.5% of all subjects were correctly classified with a sensitivity of 85.7% and a specificity of 83.3%. The second regression analysis shows that scleroderma was associated with IL-2, TGF- $\beta$  and adiponectin (all positively) and IFN- $\gamma$  (negatively) ( $X^2=67.76$ ,  $df=4$ ,  $P<0.001$ , Nagelkerke=0.820); 95.8% of all subjects were correctly classified with a sensitivity of 100% and a specificity of 91.7%.

## DISCUSSION

The major finding of the present study is that there was a highly significant association between SSc and cytokine as well as adiponectin levels, explaining 67.6% of their variance, with a particularly strong impact on IL-2, IL-4, adiponectin, and a moderate impact on TGF- $\beta$  and IL-6. In the present study, we demonstrated that patients with SSc had higher plasma levels of IL-2, IL-4, IL-6, TGF- $\beta$ , and adiponectin. In relation to cytokines profile, our data demonstrated that diagnosis involves mainly Th2 and Treg profile, explaining 37.9% of their variation. When adiponectin was added to anti-inflammatory profile, the effect was increased to 45.7%. In addition, the present study proposes a statistical model using pro (IL-2

and  $\text{INF-}\gamma$ ) and anti-inflammatory cytokines ( $\text{TGF-}\beta$  and adiponectin) to predict SSc with high sensitivity (100%) and specificity (91.7%).

Macrophages M1 are characterized by the production of pro-inflammatory cytokines as IL-1, IL-6 and  $\text{TNF-}\alpha$  [18]. In the present study, serum levels of IL-6 in patients with SSc were significant higher when compared with healthy controls, unlike IL-1 and  $\text{TNF-}\alpha$  which did not show significant increase. Our study agree with Dantas et al. (2018) that demonstrate no significative levels of  $\text{TNF-}\alpha$  in SSc. On the other hand, Gourh et al. (2009) observed higher levels of  $\text{TNF-}\alpha$  in early SSc [19].

IL-6 serum levels are increased in SSc [20–22]. Multiple lines of evidence indicate that IL-6 is also critical in SSc pathogenesis and our data evidenced higher IL-6 levels in patients with this disease than in controls. IL-6 is a multifunction cytokine that plays a key role in acute phase responses, regulates cell proliferation, activation, and differentiation . Furthermore, IL-6 induces collagen production by dermal fibroblasts in the presence of trans-signaling by soluble IL-6 receptor and participates in the imbalanced degradation of extracellular matrix (ECM) that is controlled by matrix metalloproteinases (MMP) and their inhibitors [23]. Furthermore, an IL-6 targeted therapy in SSc seems to be promising [24,25].

Our study, in reverse of others [26,27], did not show elevations in IL-1 $\beta$  serum levels in SSc patients, probably because this cytokine is implicated in the early stages of disease pathogenesis [4,28] and our patients already had a more advanced disease. In terms of IL-1 $\beta$ , which is mainly released by macrophages, it can exert inflammatory effects on fibroblasts and the endothelium [27]. IL-1 $\beta$  has other crucial functions such as inducing leukocyte recruitment to the site of injury, inducing proinflammatory mediators, and increasing the expression of  $\text{TGF-}\beta$ , which is a key profibrotic growth factor [29,30]. Furthermore, it has

been found that IL-1 $\beta$  and TGF- $\beta$ 2 can act synergistically to drive endothelial to mesenchymal transition [31].

In our study, the Th1 profile was represented by cytokines IL-2 and IFN- $\gamma$  and it was demonstrated a strong association between the diagnosis of SSc and serum levels of IL-2 which corroborates with other studies that also showed elevated serum levels of this cytokine in comparison to healthy controls [5,32]. IL-2 is known to be secreted in response to the mitogenic or antigenic stimulation of T cells which then promote proliferation and maturation of activated B and T cells. Furthermore IL-2 favours the expansion of effector Treg cells [33]. In addition, a previous study demonstrated that IL-2 levels were identified predominantly among patients with the rapidly progressive disease and with the diffuse SSc, suggesting a role of this pro-inflammatory cytokine in disease activity [34]. On the other hand, our study did not demonstrate significant levels of IFN- $\gamma$ . The majority of studies demonstrating increased expression of IFN- $\gamma$  in SSc patients were in patients with the disease at an early stage, with less than 3 years in duration [35,36]. The dysregulation in IFN- $\gamma$  and IFN- $\gamma$  inducible genes is implicated in the pathogenesis of SSc [37,38]. Moreover, increased expression of “interferon signature” has been identified in peripheral blood of SSc patients [39]. However, our data demonstrated that only 6.9% Th1 variation subset depends on diagnosis of SSc.

In the present study, we showed an increase in the Th2 response compared to the Th1 response, which corroborates with other studies [5,40,41] that also show a greater participation of this response in the pathophysiology of the disease. Classic Th2 cytokines include IL-4, IL-5 and IL-13. IL-4 is a multifunctional cytokine produced by activated Th2 cells. A widely held assumption is that monocytes are the predominant source of pro-fibrotic mediators responsible for fibrosis; however, Th2 cells are a potent source of pro-fibrotic mediators and elucidation of their co-operative roles will yield new drug targets [42]. Our study is in agreement with others [43,44]. IL-4 is critical in polarizing the Th2 response

mediated through its receptor and STAT6 [45]. *In vitro* studies IL-4 has been reported to stimulate proliferation of fibroblasts [46,47] and induce differentiation of fibroblasts to myofibroblasts, which play a key role in the development of fibrosis [48]. Moreover, IL-4 can directly stimulate collagen biosynthesis in human fibroblasts [45,49]. Activation and accumulation of fibroblasts and excessive deposition of extracellular matrix (ECM), especially collagen, are the predominant pathways which lead to fibrosis [50].

Tregs, comprising about 5–15 % of the CD4<sup>+</sup> Tcell compartment, are responsible for maintaining immunologic self-tolerance and preventing potentially damaging autoimmune and protective immune responses. The regulatory function of Tregs consists in suppression of activated effector T cells and antigen-presenting cells and is mediated by a variety of mechanisms. These mechanisms include production of suppressive cytokines, such as TGF $\beta$  and IL-10 [33]. Evidence for functional and numerical changes in Treg cells in SSc has been demonstrated in several studies, but the role of Treg cells in SSc is still controversial. Radstake *et al.* [51] demonstrated an increase in the total number of Treg cells in SSc patients, but these cells had a diminished functional capacity to suppress effector CD4<sup>+</sup> T cells, which depended on an unidentified serum factor. Some studies have shown that the number of Treg cells in skin and peripheral blood lesions of ES patients is significantly increased [52]. However, other studies have shown that, in comparison to healthy individuals, the number of Treg cells in SSc patients is reduced and they exhibit an abnormal function [53,54].

The Treg profile was represented by TGF- $\beta$  in our study. The results obtained in the present study are in agreement with previous [55] that also showed an increase in TGF- $\beta$  levels in patients with SSc compared to controls. TGF- $\beta$  is a key fibrogenic cytokine that regulates a multitude of biological functions including cell proliferation, differentiation, apoptosis, tissue homeostasis and regeneration [4,11]. Due to its diversified activities, malfunctions in TGF- $\beta$ -related processes can lead to severe, multifaceted diseases. The extent

of TGF- $\beta$  involvement in vasculopathy characteristic of SSc remains relatively unknown, but its homeostatic functions in both endothelial cells and vascular smooth muscle cells (VSMCs), as well as its role in tissue fibrosis, have made TGF- $\beta$  an attractive target for multiple drug development [56–58]. Analysis of SSc patient skin biopsy specimens demonstrated levels of TGF- $\beta$  signaling to parallel disease severity as measured by the modified Rodnan Skin Score (mRSS) [59]. Together, our outcome confirms the robust impact of Th2 and Treg profile cytokines in the pathophysiology of SSc.

In contrast to the others [10,13,60] our study evidenced high levels of adiponectin in SSc patients compared to controls. Adiponectin is a 30 kDa plasma cytokine mainly produced in white adipose tissue by mature adipocytes and non-fat cells, although it can also be found in skeletal muscle cells, cardiac myocytes and endothelial cells. Its secretion is suppressed by TNF- $\alpha$  and its production is also regulated by other proinflammatory cytokines, like IL-6 [61]. Although controversial, some studies have shown an increase in adiponectin in autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, Sjogren's Syndrome, SSc and polymyositis [8,62]. This proinflammatory feature can be explained by the different isoforms. This adipokine circulates primarily as a low molecular weight hexamer (LMW) and a high molecular weight multimer (HMW) that induces specific isoform responses. It has been found that only adiponectin LMW exhibits anti-inflammatory properties and adiponectin HMW may be responsible for pro-inflammatory effects [63]. Thus, the analysis of specific adiponectin isoforms may be of great importance in the determination of these opposite effects.

In order to interpret the cytokine profiles in SSc we have computed specific cytokine indexes as explained elsewhere [16]. Firstly, the cytokines values were transformed or standardized into z scores, which allows comparing variables with different units or scales. Secondly, z unit weighted composite scores were computed based on immune

phenotype patterns including inflammatory profile (M1 and Th1) and anti-inflammatory profile (Th2, Treg, and adiponectin). This procedure revealed that the Th2, Treg, and adiponectin are all strongly activated and interconnected in SSc.

The main limitation of the cross-sectional design, which does not allow make inferences on causal relationships. A second limitation is that the majority of patients had the limited form of SSc and this makes it difficult to extrapolate the data to the diffuse form. Our patients also had a long duration of disease and this cytokine profile may not reflect the disease in the early stages. However, the present study also has several strengths. First, to our knowledge, this is the first study to evaluate cytokine profiles in patients with SSc using the new z unit weighted composite scores reflecting cytokine profiles. Secondly, cytokines levels were evaluated with a Luminex<sup>®</sup> platform, a more sensitive technology than ELISA. The third strength is that this study combines a multivariate statistical approach, which allows controlling for many possible confounding variables including sex, age, BMI and ethnicities.

In conclusion, patients with SSc showed an increase in the pro-inflammatory and anti-inflammatory response, with anti-inflammatory response predominance. This finding may be responsible for the fibrotic characteristic of the disease. In addition, this is the first study that demonstrated higher adiponectin levels in SSc patients. More studies are necessary to confirm the present results as well as to investigate the contradictory findings on adiponectin, especially verifying the levels of its specific isoforms.

## **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare that they have no competing interests.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the National Council of Brazilian Research-CNPq and by Araucária Foundation from the state of Paraná. We thank the University Hospital of State University of Londrina and HUTec Foundation for technical and administrative supports.

## REFERENCES

1. Bony C, Goulabchand R, Maria ATJ, Le Quellec A, Rivière S, Jorgensen C, et al. Serum-Mediated Oxidative Stress from Systemic Sclerosis Patients Affects Mesenchymal Stem Cell Function. *Front Immunol* [Internet]. 2017;8. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.00988/full>
2. Denton CP, Khanna D. Systemic sclerosis. *Lancet* [Internet]. Elsevier Ltd; 2017;390:1685–99. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30933-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30933-9)
3. abrielli A, Avvedimento E V., Krieg T. Scleroderma. *N Engl J Med*. 2009;1989–2003.
4. Baraut J, Michel L, Verrecchia F, Farge D. Relationship between cytokine profiles and clinical outcomes in patients with systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* [Internet]. Elsevier B.V.; 2010;10:65–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2010.08.003>
5. Dantas AT, Almeida AR de, Sampaio MCPD, Cordeiro MF, Oliveira PSS de, Mariz H de A, et al. Different profile of cytokine production in patients with systemic sclerosis and association with clinical manifestations. *Immunol Lett* [Internet]. Elsevier; 2018;198:12–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.03.011>
6. Rovin BH, Song H. Chemokine induction by the adipocyte-derived cytokine adiponectin. *Clin Immunol*. 2006;120:99–105.

7. Šenolt L, Pavelka K, Housa D, Haluzik M. Increased adiponectin is negatively linked to the local inflammatory process in patients with rheumatoid arthritis. *Cytokine*. 2006;35:247–52.
8. Tousssirot É, Gaugler B, Bouhaddi M, Nguyen NU, Saas P, Dumoulin G. Elevated adiponectin serum levels in women with systemic autoimmune diseases. *Mediators Inflamm*. 2010;2010.
9. Fantuzzi G. Adiponectin and inflammation: Consensus and controversy. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121:326–30.
10. Lee YH, Song GG. Meta-analysis of circulating adiponectin, leptin, and resistin levels in systemic sclerosis. *Z Rheumatol* [Internet]. 2016; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00393-016-0172-5>
11. Raja J, Denton CP. Cytokines in the immunopathology of systemic sclerosis. *Semin Immunopathol*. 2015;37:543–57.
12. Tomčík M, Arima K, Hulejová H, Kuklová M, Filková M, Braun M, et al. Adiponectin relation to skin changes and dyslipidemia in systemic sclerosis. *Cytokine*. 2012;58:165–8.
13. Zhao JH, Huang XL, Duan Y, Wang YJ, Chen SY, Wang J. Serum adipokines levels in patients with systemic sclerosis: A meta-analysis. *Mod Rheumatol*. 2017;27:298–305.
14. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 Classification Criteria for Systemic Sclerosis: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Collaborative Initiative. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2013;65:2737–47. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/art.38098>

15. James PA, Oparil S, Carter BL, Cushman WC, Dennison-Himmelfarb C, Handler J, et al. 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA*. 2014;311:507–20.
16. Maes M, Carvalho AF. The Compensatory Immune-Regulatory Reflex System (CIRS) in Depression and Bipolar Disorder. *Mol Neurobiol. Molecular Neurobiology*; 2018;1–19.
17. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Ser B*. 1995;57:289–300.
18. Ginhoux F, Schultze JL, Murray PJ, Ochando J, Biswas SK. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. *Nat Immunol*. 2016;17:34–40.
19. Gourh P, Arnett FC, Assassi S, Tan FK, Huang M, Diekman L, et al. Plasma cytokine profiles in systemic sclerosis: Associations with autoantibody subsets and clinical manifestations. *Arthritis Res Ther*. 2009;11:1–11.
20. Khan K, Xu S, Nihtyanova S, Derrett-Smith E, Abraham D, Denton CP, et al. Clinical and pathological significance of interleukin 6 overexpression in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2012;71:1235–42.
21. Kawaguchi Y. Contribution of Interleukin-6 to the Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *J Scleroderma Relat Disord* [Internet]. 2017;2:6–12. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.5301/jsrd.5000258>
22. Denton CP, Ong VH. Interleukin-6 and Related Proteins as Biomarkers in Systemic Sclerosis. *J Scleroderma Relat Disord* [Internet]. 2017;2:13–9. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.5301/jsrd.5000266>

23. O'Reilly S, Ciechomska M, Cant R, Van Laar JM. Interleukin-6 (IL-6) trans signaling drives a STAT3-dependent pathway that leads to hyperactive transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) signaling promoting SMAD3 activation and fibrosis via gremlin protein. *J Biol Chem*. 2014;289:9952–60.
24. O'Reilly S, Cant R, Ciechomska M, van Laar JM. Interleukin-6: a new therapeutic target in systemic sclerosis? *Clin Transl Immunol* [Internet]. 2013;2:e4. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/cti.2013.2>
25. Khanna D, Denton CP, Jahreis A, van Laar JM, Frech TM, Anderson ME, et al. Safety and efficacy of subcutaneous tocilizumab in adults with systemic sclerosis (faSScinate): a phase 2, randomised, controlled trial. *Lancet*. 2016;387:2630–40.
26. Zhang Y-J, Zhang Q, Yang G-J, Tao J-H, Wu G-C, Huang X-L, et al. Elevated serum levels of interleukin-1 $\beta$  and interleukin-33 in patients with systemic sclerosis in Chinese population. *Z Rheumatol* [Internet]. 2016;77:151–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00393-016-0202-3>
27. Hussein MR, Hassan HI, Hofny ERM, Elkholy M, Fatehy NA, Abd Elmoniem AEA, et al. Alterations of mononuclear inflammatory cells, CD4/CD8<sup>+</sup> T cells, interleukin 1 $\beta$ , and tumour necrosis factor  $\alpha$  in the bronchoalveolar lavage fluid, peripheral blood, and skin of patients with systemic sclerosis. *J Clin Pathol*. 2005;58:178–84.
28. Brembilla NC, Chizzolini C. T cell abnormalities in systemic sclerosis with a focus on Th17 cells. *Eur Cytokine Netw*. 2012;23:128–39.
29. Markovics JA, Araya J, Cambier S, Somanath S, Gline S, Jablons D, et al. Interleukin-1 $\beta$  induces increased transcriptional activation of the transforming growth factor- $\beta$ -activating integrin subunit  $\beta$ 8 through altering chromatin architecture. *J Biol Chem*. 2011;286:36864–74.

30. Andriamanalijaona R, Felisaz N, Kim S-J, King-Jones K, Lehmann M, Pujol J-P, et al. Mediation of interleukin-1  $\beta$  -induced transforming growth factor  $\beta$  1 expression by activator protein 4 transcription factor in primary cultures of bovine articular chondrocytes: Possible cooperation with activator protein 1. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2003;48:1569–81. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/art.11020>
31. Maleszewska M, Moonen JRAJ, Huijkman N, van de Sluis B, Krenning G, Harmsen MC. IL-1 $\beta$  and TGF $\beta$ 2 synergistically induce endothelial to mesenchymal transition in an NF $\kappa$ B-dependent manner. *Immunobiology*. 2013;218:443–54.
32. Kurzinski K, Torok KS. Cytokine profiles in localized scleroderma and relationship to clinical features. *Cytokine* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;55:157–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2011.04.001>
33. Liston A, Gray DHD. Homeostatic control of regulatory T cell diversity. *Nat Rev Immunol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2014;14:154–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3605>
34. Lis A, Brzezińska-Wcisło L. [Interleukin-2 and interleukin-6 in serum as markers of disease progression in systemic sclerosis]. *Pol Merkur Lekarski* [Internet]. 2001;11:206–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11761811>
35. Fuschioti P, Medsger TA, Morel PA. Effector CD8<sup>+</sup> T cells in systemic sclerosis patients produce abnormally high levels of interleukin-13 associated with increased skin fibrosis. *Arthritis Rheum*. 2009;60:1119–28.
36. Li G, Larregina AT, Domsic RT, Stolz DB, Medsger TA, Lafyatis R, et al. Skin-Resident Effector Memory CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>T Cells Exhibit a Profibrotic Phenotype in Patients with Systemic Sclerosis. *J Invest Dermatol* [Internet]. The Authors; 2017;137:1042–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2016.11.037>

37. Farina GA, York MR, Di Marzio M, Collins CA, Meller S, Homey B, et al. Poly(I:C) drives type I IFN- and TGF $\beta$ -mediated inflammation and dermal fibrosis simulating altered gene expression in systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2010;130:2583–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2010.200>
38. Tan FK, Zhou X, Mayes MD, Gourh P, Guo X, Marcum C, et al. Signatures of differentially regulated interferon gene expression and vasculotrophism in the peripheral blood cells of systemic sclerosis patients. *Rheumatology*. 2006;45:694–702.
39. Assassi S, Mayes MD, Arnett FC, Gourh P, Agarwal SK, McNearney TA, et al. Systemic sclerosis and lupus: Points in an interferon-mediated continuum. *Arthritis Rheum*. 2010;62:589–98.
40. Baraut J, Farge D, Jean-Louis F, Masse I, Grigore EI, Arruda LCM, et al. Transforming growth factor- $\beta$  increases interleukin-13 synthesis via GATA-3 transcription factor in T-lymphocytes from patients with systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther* [Internet]. Arthritis Research & Therapy; 2015;17:1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13075-015-0708-0>
41. Macdonald KG, Dawson NAJ, Huang Q, Dunne J V., Levings MK, Broady R. Regulatory T cells produce profibrotic cytokines in the skin of patients with systemic sclerosis. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;135:946–955.e9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2014.12.1932>
42. O'Reilly S, Hugel T, van Laar JM. T cells in systemic sclerosis: a reappraisal. *Rheumatology* [Internet]. 2012;51:1540–9. Available from: <https://academic.oup.com/rheumatology/article-lookup/doi/10.1093/rheumatology/kes090>

43. Parel Y, Aurrand-Lions M, Scheja A, Dayer JM, Roosnek E, Chizzolini C. Presence of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> double-positive T cells with very high interleukin-4 production potential in lesional skin of patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2007;56:3459–67.
44. Distler JHW, Jünger A, Caretto D, Schulze-Horsel U, Kowal-Bielecka O, Gay RE, et al. Monocyte chemoattractant protein 1 released from glycosaminoglycans mediates its profibrotic effects in systemic sclerosis via the release of interleukin-4 from T cells. *Arthritis Rheum.* 2006;54:214–25.
45. Aoudjehane L, Pissia A, Scatton O, Podevin P, Massault PP, Chouzenoux S, et al. Interleukin-4 induces the activation and collagen production of cultured human intrahepatic fibroblasts via the STAT-6 pathway. *Lab Invest.* 2008;88:973–85.
46. Sommer M, Eismann U, Gerth J, Stein G. Interleukin 4 co-stimulates the PDGF-BB- and bFGF-mediated proliferation of mesangial cells and myofibroblasts. *Nephron.* 2002;92:868–80.
47. Sempowski GD, Beckmann MP, Derdak S, Phipps RP. Subsets of murine lung fibroblasts express membrane-bound and soluble IL-4 receptors. Role of IL-4 in enhancing fibroblast proliferation and collagen synthesis. *J Immunol* [Internet]. 1994;152:3606–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7908305>
48. Saito A, Okazaki H, Sugawara I, Yamamoto K, Takizawa H. Potential action of IL-4 and IL-13 as fibrogenic factors on lung fibroblasts in vitro. *Int Arch Allergy Immunol.* 2003;132:168–76.
49. Postlethwaite AE, Holness MA, Katai H, Raghov R. Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix proteins in response to interleukin 4. *J Clin Invest.* 1992;90:1479–85.

50. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: A prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest.* 2007;117:557–67.
51. Radstake TRDJ, van Bon L, Broen J, Wenink M, Santegoets K, Deng Y, et al. Increased Frequency and Compromised Function of T Regulatory Cells in Systemic Sclerosis (SSc) Is Related to a Diminished CD69 and TGF $\beta$  Expression. Unutmaz D, editor. *PLoS One* [Internet]. 2009;4:e5981. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0005981>
52. Liu X, Gao N, Li M, Xu D, Hou Y, Wang Q, et al. Elevated Levels of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T Cells in Systemic Sclerosis Patients Contribute to the Secretion of IL-17 and Immunosuppression Dysfunction. *PLoS One.* 2013;8:2–9.
53. Antiga E, Quaglino P, Bellandi S, Volpi W, Del Bianco E, Comessatti A, et al. Regulatory T cells in the skin lesions and blood of patients with systemic sclerosis and morphoea. *Br J Dermatol.* 2010;162:1056–63.
54. Klein S, Kretz CC, Ruland V, Stumpf C, Haust M, Hartschuh W, et al. Reduction of regulatory T cells in skin lesions but not in peripheral blood of patients with systemic scleroderma. *Ann Rheum Dis.* 2011;70:1475–81.
55. Dantas AT, Gonçalves SMC, Almeida AR de, Gonçalves RSG, Sampaio MCPD, Vilar K de M, et al. Reassessing the Role of the Active TGF- $\beta$  1 as a Biomarker in Systemic Sclerosis: Association of Serum Levels with Clinical Manifestations. *Dis Markers* [Internet]. 2016;2016:1–6. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/dm/2016/6064830/>
56. Pang K, Ryan JF, Baxevanis AD, Martindale MQ. Evolution of the TGF- $\beta$  signaling pathway and its potential role in the ctenophore, *mnemiopsis leidyi*. *PLoS One.* 2011;6.

57. Rahimi RA, Leof EB. TGF- $\beta$  signaling: A tale of two responses. *J Cell Biochem.* 2007;102:593–608.
58. Tsujino K, Reed NI, Atakilit A, Ren X, Sheppard D. Transforming growth factor- $\beta$  plays divergent roles in modulating vascular remodeling, inflammation, and pulmonary fibrosis in a murine model of scleroderma. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* [Internet]. 2017;312:L22–31. Available from: <http://ajplung.physiology.org/lookup/doi/10.1152/ajplung.00428.2016>
59. Verrecchia F, Laboureau J, Verola O, Roos N, Porcher R, Bruneval P, et al. Skin involvement in scleroderma - Where histological and clinical scores meet. *Rheumatology.* 2007;46:833–41.
60. Olewicz-Gawlik A, Danczak-Pazdrowska A, Kuznar-Kaminska B, Batura-Gabryel H, Katulska K, Wojciech S, Trzybulska D HP. Circulating adipokines and organ involvement in patients with systemic sclerosis. *Acta Reum Port.* 2015;40:156–62.
61. Shehzad A, Iqbal W, Shehzad O, Lee YS. Adiponectin: regulation of its production and its role in human diseases. *Hormones (Athens).* 2012;11:8–20.
62. Sada K-E, Yamasaki Y, Maruyama M, Sugiyama H, Yamamura M, Maeshima Y, et al. Altered levels of adipocytokines in association with insulin resistance in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* [Internet]. 2006;33:1545–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16881111>
63. Neumeier M, Weigert J, Scha A, Wehrwein G. Different effects of adiponectin isoforms in human monocytic cells. *J Leukoc Biol.* 2006;79:803–8.

**Table 1- Socio-demographic and laboratorial data in both healthy controls (HC) and patients with scleroderma**

| Variable                 | HC<br>(n= 75)       | Scleroderma<br>(n= 42) | F/X <sup>2</sup> / Y | df    | P value          |
|--------------------------|---------------------|------------------------|----------------------|-------|------------------|
| Ethnicity (C/NC)         | 55/20               | 39/3                   | 6.50                 | 1     | <b>0.011</b>     |
| Sex (F/M)                | 54/21               | 39/3                   | 7.18                 | 1     | <b>0.007</b>     |
| Smoking (yes/no)         | 6/69                | 3/38                   | 0.02                 | 1     | 0.895            |
| Age (years)              | 49.4 (7.2)          | 53.0 (12.6)            | 3.89                 | 1/115 | 0.051            |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> ) | 26.0 (4.0)          | 25.2 (5.6)             | 0.74                 | 1/105 | 0.393            |
| SBP (mmHg)               | 120.1 (19.8)        | 118.2 (16.7)           | 0.23                 | 1/107 | 0.631            |
| DBP(mmHg)                | 77.1 (12.6)         | 72.6 (10.1)            | 3.66                 | 1/107 | 0.058            |
| IL-1 $\beta$ (pg/mL)     | 0.014 (0.014-0.374) | 0.085 (0.085-0.085)    | 0.91                 | 1/82  | 0.342            |
| IL-6 (pg/mL)             | 0.022 (0.021-6.583) | 0.807 (0.417-2.931)    | 8.28                 | 1/82  | <b>0.005</b>     |
| TNF- $\alpha$ (pg/mL)    | 0.100 (0.100-0.100) | 0.228 (0.085-0.746)    | 2.92                 | 1/82  | 0.91             |
| IL-2 (pg/mL)             | 0.001 (0.001-0.001) | 0.100 (0.001-0.619)    | 73.96                | 1/82  | <b>&lt;0.001</b> |
| IFN- $\gamma$ (pg/mL)    | 0.549 (0.100-1.674) | 0.602 (0.016-1.514)    | 2.10                 | 1/82  | 0.151            |
| IL-4 (pg/mL)             | 0.042 (0.042-0.042) | 0.118 (0.118-1.807)    | 30.52                | 1/82  | <b>&lt;0.001</b> |
| TGF- $\beta$ (pg/mL)     | 649 (254-1848)      | 1698 (1247-2240)       | 23.44                | 1/98  | <b>&lt;0.001</b> |
| Adipone ctin (pg/mL)     | 11.791(6719-17206)  | 27.728 (20000-36250)   | 28.32                | 1/95  | <b>&lt;0.001</b> |

Data are expressed as mean ( $\pm$ SD) or median (25%-75%).

C: Caucasian, NC: Not Caucasian, F: Female, M: Male, BMI: Body Mass Index, SBP: Systolic Blood Pressure IL; DBP: Diastolic Blood Pressure; IL: Interleukin, TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor alpha, IFN- $\gamma$ : Interferon gamma, TGF- $\beta$ : Transforming Growth Factor beta.

**Table 2- Results of multivariate General Linear Model (GLM) analysis with the cytokines levels (in Z transformation) as dependent variables**

| Type tests              | Dependent Variables | Explanatory variables | F     | df   | P value          | Partial Eta Squared |
|-------------------------|---------------------|-----------------------|-------|------|------------------|---------------------|
| <b>Multivariate</b>     | all 8 cytokines     | Diagnosis             | 15.39 | 8/59 | <b>&lt;0.001</b> | <b>0.676</b>        |
|                         |                     | Sex                   | 0.99  | 8/59 | 0.454            | 0.118               |
|                         |                     | Age                   | 1.18  | 8/59 | 0.328            | 0.138               |
|                         |                     | BMI                   | 1.86  | 8/59 | 0.083            | 0.202               |
|                         |                     | Ethnicity             | 1.386 | 8/59 | 0.222            | 0.161               |
| Between-subject effects | IL-1 $\beta$        | Diagnosis             | 0.85  | 1/73 | 0.360            | 0.011               |
|                         | IL-6                | Diagnosis             | 10.63 | 1/73 | <b>0.002</b>     | <b>0.127</b>        |
|                         | TNF- $\alpha$       | Diagnosis             | 3.46  | 1/73 | 0.067            | 0.045               |
|                         | IFN- $\gamma$       | Diagnosis             | 2.68  | 1/73 | 0.106            | 0.035               |
|                         | IL-2                | Diagnosis             | 56.63 | 1/73 | <b>&lt;0.001</b> | <b>0.437</b>        |
|                         | IL-4                | Diagnosis             | 25.67 | 1/73 | <b>&lt;0.001</b> | <b>0.260</b>        |
|                         | TGF- $\beta$        | Diagnosis             | 21.24 | 1/73 | <b>&lt;0.001</b> | <b>0.193</b>        |
|                         | adiponectin         | Diagnosis             | 27.49 | 1/73 | <b>&lt;0.001</b> | <b>0.242</b>        |

BMI: body mass index; IL: Interleukin; TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor alpha; IFN- $\gamma$ : Interferon gamma; TGF- $\beta$ : Transforming Growth Factor beta; df: degree of freedom

**Table 3- Model-derived estimated marginal mean (SE) values (in z transformation after logarithm natural transformation) of all cytokines in healthy controls (HC) and patients with Systemic Sclerosis (SSc)**

| <b>Variables</b>               | <b>HC</b>           | <b>SSc</b>          | <b>P value</b>   |
|--------------------------------|---------------------|---------------------|------------------|
| <b>IL-1<math>\beta</math></b>  | -0.07 (0.20)        | + 0.15 (0.24)       | 0.360            |
| <b>IL-6</b>                    | <b>-0.08 (0.18)</b> | <b>+0.65 (0.22)</b> | <b>0.002</b>     |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | -0.03 (0.18)        | +0.39 (0.22)        | 0.067            |
| <b>IFN-<math>\gamma</math></b> | +0.17 (0.18)        | -0.21 (0.22)        | 0.106            |
| <b>IL-2</b>                    | <b>-0.67 (0.14)</b> | <b>+0.67 (0.17)</b> | <b>&lt;0.001</b> |
| <b>IL-4</b>                    | <b>-0.46 (0.16)</b> | <b>+0.56 (0.20)</b> | <b>&lt;0.001</b> |
| <b>TGF-<math>\beta</math></b>  | <b>-0.39 (0.13)</b> | <b>+0.56 (0.19)</b> | <b>&lt;0.001</b> |
| <b>adiponectin</b>             | <b>-0.46 (0.11)</b> | <b>+0.46 (0.16)</b> | <b>&lt;0.001</b> |

HC: Healthy Controls; IL: Interleukin; TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor alpha; IFN- $\gamma$ : Interferon gamma; TGF- $\beta$ : Transforming Growth Factor beta.

**Table 4- Outcome of a multivariate General Linear Model (GLM) analysis with the 7 z-unit weighted composite scores as dependent variables and Systemic Sclerosis as primary explanatory variable, while adjusting for age, sex and BMI as covariates**

| Type tests              | Dependent variables    | Explanatory variables | F     | df   | P value          | Partial eta squared |
|-------------------------|------------------------|-----------------------|-------|------|------------------|---------------------|
| Multivariate            | all 7 composite scores | Diagnosis             | 15.03 | 4/63 | <b>&lt;0.001</b> | <b>0.488</b>        |
|                         |                        | Sex                   | 1.87  | 4/63 | 0.126            | 0.106               |
|                         |                        | Age                   | 1.88  | 4/63 | 0.125            | 0.107               |
|                         |                        | BMI                   | 2.70  | 4/63 | <b>0.039</b>     | <b>0.146</b>        |
|                         |                        | Ethnicity             | 1.658 | 4/63 | 0.101            | 0.116               |
| Between-subject effects | M1                     | Diagnosis             | 3.80  | 1/66 | 0.056            | 0.054               |
|                         | Th1                    | Diagnosis             | 4.91  | 1/66 | <b>0.030</b>     | <b>0.069</b>        |
|                         | M1+ Th1                | Diagnosis             | 5.90  | 1/66 | <b>0.018</b>     | <b>0.082</b>        |
|                         | Th2+Treg               | Diagnosis             | 40.20 | 1/66 | <b>&lt;0.001</b> | <b>0.379</b>        |
|                         | M1+ Th1/ Th2+Treg      | Diagnosis             | 10.97 | 1/66 | <b>0.002</b>     | <b>0.142</b>        |
|                         | Th2+Treg+adipo         | Diagnosis             | 55.45 | 1/66 | <b>&lt;0.001</b> | <b>0.457</b>        |
|                         | M1+Th1/Th2+Treg+adipo  | Diagnosis             | 14.06 | 1/66 | <b>&lt;0.001</b> | <b>0.176</b>        |

BMI: body mass index

- 1) macrophagic M1 profile: computed as z value of interleukin IL-1 (zIL-1) + zIL-6 + zTNF- $\alpha$ ;
- 2) Th1 profile: computed as zIFN- $\gamma$  + zIL-2;
- 3) M1+ Th1: computed as zIL-1 + zIL-6 + zTNF- $\alpha$  + zIL-2 + zIFN- $\gamma$
- 4) Th2 + Treg profile: computed as zIL-4 + zTGF- $\beta$ ;
- 5) Th2+Treg+adipo: computed as zIL-4 + zTGF- $\beta$ + z adiponectin, and reflecting an anti-inflammatory and immune regulatory index;
- 6) M1+Th1/ Th2+Treg: computed as z(zIL-1 + zIL-6 + zTNF- $\alpha$  + zIL-2 + zIFN- $\gamma$ ) - z(zIL-4 + zTGF- $\beta$ );
- 7) M1+ Th1/ Th2+ Treg+ adipo: computed as z(zIL-1 + zIL-6 + zTNF- $\alpha$  + zIL-2 + zINF- $\gamma$ ) - z(zIL-4 + zTGF- $\beta$ +z adiponectin)

**Table 5- Model-derived estimated marginal mean (SE) values of 8 composite scores in healthy controls (HC) and patients with Systemic Sclerosis (SSc)**

| Variables                        | HC                  | SSc                 | P value          |
|----------------------------------|---------------------|---------------------|------------------|
| <b>M1</b>                        | -0.01 (0.20)        | +0.49 (0.24)        | 0.056            |
| <b>Th1</b>                       | <b>-0.26 (0.19)</b> | <b>+0.27 (0.23)</b> | <b>0.030</b>     |
| <b>M1+ Th1</b>                   | <b>-0.14 (0.19)</b> | <b>+0.44 (0.23)</b> | <b>0.018</b>     |
| <b>Th2+ Treg</b>                 | <b>-0.60 (0.16)</b> | <b>+0.65 (0.19)</b> | <b>&lt;0.001</b> |
| <b>M1+Th1/ Th2+Treg</b>          | <b>+0.52 (0.20)</b> | <b>-0.26 (0.23)</b> | <b>0.002</b>     |
| <b>Th2+ Treg + adipo</b>         | <b>-0.76 (0.15)</b> | <b>+0.58 (0.17)</b> | <b>&lt;0.001</b> |
| <b>M1+ Th1/ Th2+ Treg+ adipo</b> | <b>+0.59 (0.18)</b> | <b>-0.24 (0.21)</b> | <b>&lt;0.001</b> |

- 1) macrophagic M1 profile: computed as z value of interleukin IL-1 (zIL-1) + zIL-6 + zTNF- $\alpha$ ;
- 2) Th1 profile: computed as zIFN- $\gamma$  + zIL-2;
- 3) M1+ Th1: computed as zIL-1 + zIL-6 + zTNF- $\alpha$  + zIL-2 + zIFN- $\gamma$
- 4) Th2 + Treg profile: computed as zIL-4 + zTGF- $\beta$ ;
- 5) Th2+Treg+adipo: computed as zIL-4 + zTGF- $\beta$ + z adiponectin, and reflecting an anti-inflammatory and immune regulatory index;
- 6) M1+Th1/ Th2+Treg: computed as z(zIL-1 + zIL-6 + zTNF- $\alpha$  + zIL-2 + zIFN- $\gamma$ ) - z(zIL-4 + zTGF- $\beta$ );
- 7) M1+ Th1/ Th2+ Treg+ adipo: computed as z(zIL-1 + zIL-6 + zTNF- $\alpha$  + zIL-2 + zIFN- $\gamma$ ) - z(zIL-4 + zTGF- $\beta$ +z adiponectin)

**Table 6- Binary logistic regression analyses with Scleroderma as the dependent variable (and controls as the reference group) and composite scores (regression #1) or cytokines (regression #2) as input variables**

|           | <b>Explanatory Variables</b> | <b>B</b> | <b>SE</b> | <b>Wald</b> | <b>df</b> | <b>P value</b>   | <b>OR</b> | <b>95% CI</b> |
|-----------|------------------------------|----------|-----------|-------------|-----------|------------------|-----------|---------------|
| <b>#1</b> | Th2+ Treg+ adipo             | 4.29     | 1.09      | 15.49       | 1         | <b>&lt;0.001</b> | 78.77     | 8.60-615.49   |
|           | M1                           | -0.93    | 0.43      | 4.72        | 1         | <b>0.030</b>     | 0.40      | 0.17-0.91     |
| <b>#2</b> | IFN- $\gamma$                | -1.89    | 0.88      | 4.35        | 1         | <b>0.037</b>     | 0.16      | 0.03-0.90     |
|           | IL-2                         | 3.06     | 0.94      | 10.65       | 1         | <b>0.001</b>     | 21.36     | 3.4-134.29    |
|           | TGF- $\beta$                 | 3.83     | 1.82      | 4.96        | 1         | <b>0.035</b>     | 46.14     | 1.32-16.18    |
|           | adipo                        | 1.82     | 0.75      | 5.95        | 1         | <b>0.015</b>     | 6.16      | 1.43-26.50    |

df: degree of freedom; B:intercept; SE: standard error; OR: odds ratio; CI: confidence interval;

Th2+Treg+adipo: computed as  $z_{IL-4} + z_{TGF-\beta} + z_{adiponectin}$ ;

M1: Macrophage type 1; computed as  $z_{interleukin-1} (z_{IL-1}) + z_{IL-6} + z_{TNF-\alpha}$

IFN- $\gamma$ : Interferon gamma, IL: Interleukin TGF- $\beta$ : Transforming Growth Factor beta.

#1: 84.5% of all subjects were correctly classified with a sensitivity of 85.7% and a specificity of 83.3%

#2: 95.8% of all subjects were correctly classified with a sensitivity of 100% and a specificity of 91.7%.

## 6 CONCLUSÕES DA DISSERTAÇÃO

- Os níveis plasmáticos de IL-2, IL-4, IL-6, TGF- $\beta$  e adiponectina foram significativamente maiores em pacientes com ES do que em controles saudáveis.
- Pacientes com ES apresentaram aumento da resposta anti-inflamatória avaliada pelos perfis Th2 e Treg e de adiponectina, e redução da relação pró-inflamatória/ anti-inflamatória avaliado pelo índice M1+Th1/Th2+Treg+adiponectina.
- Foi proposto um modelo preditor de ES utilizando as citocinas IL-2, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  e adiponectina, com sensibilidade de 100% e especificidade de 91,7% .

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo demonstrou que pacientes portadores de ES apresentam uma exacerbação da resposta anti-inflamatória representada pelo aumento da resposta Th2 e Treg e dos níveis de adiponectina, o que pode justificar a característica fibrótica da doença. Este é o primeiro estudo que demonstra aumento dos níveis de adiponectina em pacientes com ES. A principal limitação foi o delineamento transversal do estudo, que não permite fazer inferência de causalidade. Em adição a isso, nossos pacientes eram compostos principalmente pela forma limitada da doença e tinham um maior tempo de duração de doença, sendo assim, não é possível extrapolar nossos resultados para pacientes com a forma difusa e fases precoces da doença. No entanto, nosso estudo obteve pontos fortes, tais como: a transformação em z score, permitindo a elaboração de perfis de citocinas; a utilização da plataforma Luminex®, uma técnica mais sensível que o ELISA e a análise multivariada, utilizada para controlar as variáveis confundidoras. Sendo assim, os resultados obtidos neste estudo permitem o melhor entendimento da complexa rede de citocinas pró e anti-inflamatórias envolvidas na fisiopatologia da ES. Uma vez que as fases da doença exibem perfis de citocinas diferentes, torna-se fundamental que o tratamento seja específico à cada fase, procurando restabelecer o equilíbrio entre os perfis Th1/Th2 ou Th17/Treg. No futuro, a restauração deste equilíbrio mostra-se como uma estratégia terapêutica mais eficaz. Além disso, este estudo propôs um modelo laboratorial para prever a doença com alta sensibilidade e especificidade, podendo ser empregado para auxiliar e corroborar ao diagnóstico clínico.

**REFERÊNCIAS**

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular Tradução da 8ª edição**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- ANTIGA, E.; QUAGLINO, P.; BELLANDI, S.; VOLPI, W.; DEL BIANCO, E.; COMESSATTI, A.; OSELLA-ABATE, S.; DE SIMONE, C.; MARZANO, A.; BERNENGO, M. G.; FABBRI, P.; CAPRONI, M. Regulatory T cells in the skin lesions and blood of patients with systemic sclerosis and morphea. **British Journal of Dermatology**, [s. l.], v. 162, n. 5, p. 1056–1063, 2010.
- AYANO, M.; TSUKAMOTO, H.; KOHNO, K.; UEDA, N.; TANAKA, A.; MITOMA, H.; AKAHOSHI, M.; ARINOBU, Y.; NIRO, H.; HORIUCHI, T.; AKASHI, K. Increased CD226 Expression on CD8<sup>+</sup> T Cells Is Associated with Upregulated Cytokine Production and Endothelial Cell Injury in Patients with Systemic Sclerosis. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 195, n. 3, p. 892–900, 2015. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1403046>>
- BARAUT, J.; FARGE, D.; JEAN-LOUIS, F.; MASSE, I.; GRIGORE, E. I.; ARRUDA, L. C. M.; LAMARTINE, J.; VERRECCHIA, F.; MICHEL, L. Transforming growth factor- $\beta$  increases interleukin-13 synthesis via GATA-3 transcription factor in T-lymphocytes from patients with systemic sclerosis. **Arthritis Research and Therapy**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 1–15, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13075-015-0708-0>>
- BARAUT, J.; MICHEL, L.; VERRECCHIA, F.; FARGE, D. Relationship between cytokine profiles and clinical outcomes in patients with systemic sclerosis. **Autoimmunity Reviews**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 65–73, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2010.08.003>>
- BINAI, N.; O'REILLY, S.; GRIFFITHS, B.; VAN LAAR, J. M.; HÜGLE, T. Differentiation Potential of CD14<sup>+</sup> Monocytes into Myofibroblasts in Patients with Systemic Sclerosis. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. e33508, 2012. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0033508>>

BONY, C.; GOULABCHAND, R.; MARIA, A. T. J.; LE QUELLEC, A.; RIVIÈRE, S.; JORGENSEN, C.; GUILPAIN, P.; NOËL, DANIÈLEFONTENEAU, G. Serum-Mediated Oxidative Stress from Systemic Sclerosis Patients Affects Mesenchymal Stem Cell Function. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 8, n. September, 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.00988/full>>

BOSSINI-CASTILLO, L.; LOPEZ-ISAC, E.; MAYES, M. D.; MARTIN, J. Genetics of systemic sclerosis. **Seminars in Immunopathology**, [s. l.], p. 443–451, 2015.

BREMBILLA, N. C.; CHIZZOLINI, C. T cell abnormalities in systemic sclerosis with a focus on Th17 cells. **European Cytokine Network**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 128–139, 2012.

CARVALHO, M. A. P.; LANNA DUARTE, C. C.; BERTOLO BARROS, M.; FERREIRA, G. A. **REUMATOLOGIA: DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO**. 4. ed. São Paulo: AC Farmacêutica, 2014.

COELHO, M.; OLIVEIRA, T.; FERNANDES, R. Biochemistry of adipose tissue: An endocrine organ. **Archives of Medical Science**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 191–200, 2013.

CONFER, I. V; HARMONIZA, N. P. P. 2005 - Boas Práticas Clínicas Documento das Américas - Confer, Harmoniza.pdf. [s. l.], 2005.

COSSU, M.; VAN BON, L.; NIERKENS, S.; BELLOCCHI, C.; SANTANIELLO, A.; DOLSTRA, H.; BERETTA, L.; RADSTAKE, T. R. D. J. The magnitude of cytokine production by stimulated CD56<sup>+</sup> cells is associated with early stages of systemic sclerosis. **Clinical Immunology**, [s. l.], v. 173, p. 76–80, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2016.09.004>>

DANTAS, A. T.; ALMEIDA, A. R. De; SAMPAIO, M. C. P. D.; CORDEIRO, M. F.; OLIVEIRA, P. S. S. De; MARIZ, H. de A.; PEREIRA, M. C.; REGO, M. J. B. de M.; PITTA, I. da R.; DUARTE, A. L. B. P.; PITTA, M. G. da R. Different profile of cytokine production in patients with systemic sclerosis and association with clinical manifestations. **Immunology Letters**, [s. l.], v. 198, n. January, p. 12–16, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.03.011>>

DANTAS, A. T.; GONÇALVES, S. M. C.; PEREIRA, M. C.; DE ALMEIDA, A. R.; MARQUES, C. D. L.; DE MELO REGO, M. J. B.; DA ROCHA PITTA, I.; DUARTE, A. L. B. P.; DA ROCHA PITTA, M. G. Interferons and systemic sclerosis: Correlation between interferon gamma and interferon-lambda 1 (IL-29). **Autoimmunity**, [s. l.], v. 48, n. 7, p. 429–433, 2015.

DENTON, C. P.; KHANNA, D. Systemic sclerosis. **The Lancet**, [s. l.], v. 390, n. 10103, p. 1685–1699, 2017. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30933-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30933-9)>

DISTLER, J. H. W.; JÜNGEL, A.; CARETTO, D.; SCHULZE-HORSEL, U.; KOWAL-BIELECKA, O.; GAY, R. E.; MICHEL, B. A.; MÜLLER-LADNER, U.; KALDEN, J. R.; GAY, S.; DISTLER, O. Monocyte chemoattractant protein 1 released from glycosaminoglycans mediates its profibrotic effects in systemic sclerosis via the release of interleukin-4 from T cells. **Arthritis and Rheumatism**, [s. l.], v. 54, n. 1, p. 214–225, 2006.

DZIADZIO, M.; SMITH, R. E.; ABRAHAM, D. J.; BLACK, C. M.; DENTON, C. P. Circulating levels of active transforming growth factor  $\beta$ 1 are reduced in diffuse cutaneous systemic sclerosis and correlate inversely with the modified Rodnan skin score. **Rheumatology**, [s. l.], v. 44, n. 12, p. 1518–1524, 2005.

ELDOMA, M.; POPE, J. The contemporary management of systemic sclerosis. **Expert Review of Clinical Immunology**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 573–582, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/1744666X.2018.1485490>>

ELHAI, M. et al. A gender gap in primary and secondary heart dysfunctions in systemic sclerosis: A EUSTAR prospective study. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 75, n. 1, p. 163–169, 2016.

ELHAI, M.; AVOUAC, J.; KAHAN, A.; ALLANORE, Y. Systemic sclerosis: Recent insights. **Joint Bone Spine**, [s. l.], v. 82, n. 3, p. 148–153, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbspin.2014.10.010>>

FURUE, M.; MITOMA, C.; MITOMA, H.; TSUJI, G.; CHIBA, T.; NAKAHARA, T.; UCHI, H.; KADONO, T. Pathogenesis of systemic sclerosis—current concept and emerging treatments. **Immunologic Research**, [s. l.], v. 65, n. 4, p. 790–797, 2017.

FUSCHIOTTI, P. Role of IL-13 in systemic sclerosis. **Cytokine**, [s. l.], v. 56, n. 3, p. 544–549, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2011.08.030>>

FUSCHIOTTI, P. Current perspectives on the role of CD8<sup>+</sup> T cells in systemic sclerosis. **Immunology letters**, [s. l.], v. 195, n. July 2017, p. 55–60, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.10.002>>

FUSCHIOTTI, P.; LARREGINA, A. T.; HO, J.; FEGHALI-BOSTWICK, C.; MEDSGER, T. A. Interleukin-13-producing CD8<sup>+</sup> T cells mediate dermal fibrosis in patients with systemic sclerosis. **Arthritis and Rheumatism**, [s. l.], v. 65, n. 1, p. 236–246, 2013.

FUSCHIOTTI, P.; MEDSGER, T. A.; MOREL, P. A. Effector CD8<sup>+</sup> T cells in systemic sclerosis patients produce abnormally high levels of interleukin-13 associated with increased skin fibrosis. **Arthritis and Rheumatism**, [s. l.], v. 60, n. 4, p. 1119–1128, 2009.

GABRIELLI, A.; AVVEDIMENTO, E. V.; KRIEG, T. Scleroderma. **The New England Journal of Medicine**, [s. l.], n. 360, p. 1989–2003, 2009.

GUIDUCCI, S.; DISTLER, O.; DISTLER, J. H. W.; MATUCCI-CERINIC, M. Mechanisms of vascular damage in SSc - Implications for vascular treatment strategies. **Rheumatology**, [s. l.], v. 47, n. SUPPL. 5, p. 18–20, 2009.

HOCHEBERG, M. C.; SILMAN, A. J.; SMOLEN, J. S.; WEINBLATT, M. E.; WEISMAN, M. H. **RHEUMATOLOGY**. 6. ed. Philadelphia: Elsevier Ltd, 2015.

HORIMOTO, A. M. C.; MATOS, E. N. N.; COSTA, M. R. Da; TAKAHASHI, F.; REZENDE, M. C.; KANOMATA, L. B.; LOCATELLI, E. P. P.; FINOTTI, L. T.; MAEGAWA, F. K. M.; RONDON, R. M. R.; MACHADO, N. P.; COUTO, F. M. A. A. T. Do; FIGUEIREDO, T. P. A. De; OVIDIO, R. A.; COSTA, I. P. Da. Incidência e prevalência de esclerose sistêmica em Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [s. l.], v. 57, n. 2, p. 107–114, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0482500416300729>>

JAMES, P. A.; OPARIL, S.; CARTER, B. L.; CUSHMAN, W. C.; DENNISON-HIMMELFARB, C.; HANDLER, J.; LACKLAND, D. T.; LEFEVRE, M. L.; MACKENZIE, T. D.; OGEDEGBE, O.; SMITH, S. C.; SVETKEY, L. P.; TALER, S. J.; TOWNSEND, R. R.; WRIGHT, J. T.; NARVA, A. S.; ORTIZ, E. 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). **JAMA**, [s. l.], v. 311, n. 5, p. 507–20, 2014.

JIANG, H.; CHESS, L.; HONG, J.; LEONARD, C. Regulation of immune responses by T cells. **The New England journal of medicine**, [s. l.], v. 354, n. 11, p. 1166–1176, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16540617>>

KAVIAN, N.; BATTEUX, F. Macro- and microvascular disease in systemic sclerosis. **Vascular Pharmacology**, [s. l.], v. 71, p. 16–23, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vph.2015.05.015>>

KEMAL OZBILGIN, M.; INAN, S. The roles of transforming growth factor type  $\beta$ 3(TGF- $\beta$ 3) and mast cells in the pathogenesis of scleroderma. **Clinical Rheumatology**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 189–195, 2003.

KHALTAEV, N.; PFLEGER, B.; WOOLF, A. D.; AKESSON, K.; HAZES, J. M.; Global Arthritis Research Network: 4th World Congress on Arthritis in Montreal. **Arthritis Research {&} Therapy**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 103, 2004. Disponível em: <<http://arthritis-research.com/content/pdf/ar1376.pdf>>

KHANNA, D.; FURST, D. E.; CLEMENTS, P. J.; ALLANORE, Y.; BARON, M.; CZIRJAK, L.; DISTLER, O.; FOELDVARI, I.; KUWANA, M.; MATUCCI-CERINIC, M.; MAYES, M.; MEDSGER, T.; MERKEL, P. A.; POPE, J. E.; SEIBOLD, J. R.; STEEN, V.; STEVENS, W.; DENTON, C. P. Standardization of the modified Rodnan skin score for use in clinical trials of systemic sclerosis. **Journal of Scleroderma and Related Disorders**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 11–18, 2017. Disponível em: <<http://www.sclerodermajournal.com/article/0ec896a0-bf88-4038-abc1-39f872a7dd2d>>

KLEIN, S.; KRETZ, C. C.; RULAND, V.; STUMPF, C.; HAUST, M.; HARTSCHUH, W.; HARTMANN, M.; ENK, A.; SURI-PAYER, E.; OBERLE, N.; KRAMMER, P. H.; KUHN, A. Reduction of regulatory T cells in skin lesions but not in peripheral blood of patients with systemic scleroderma. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 70, n. 8, p. 1475–1481, 2011.

KOWAL-BIELECKA, O. et al. Update of EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 76, n. 8, p. 1327–1339, 2017.

KURASAWA, K.; HIROSE, K.; SANO, H.; ENDO, H.; SHINKAI, H.; NAWATA, Y.; TAKABAYASHI, K.; IWAMOTO, I. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. **Arthritis and rheumatism**, [s. l.], v. 43, n. 11, p. 2455–2463, 2000.

LAPPAS, M.; PERMEZEL, M.; RICE, G. E. Leptin and adiponectin stimulate the release of proinflammatory cytokines and prostaglandins from human placenta and maternal adipose tissue via nuclear factor- $\kappa$ B, peroxisomal proliferator-activated receptor- $\gamma$  and extracellularly regulated kinase 1/2. **Endocrinology**, [s. l.], v. 146, n. 8, p. 3334–3342, 2005.

LEASK, A.; ABRAHAM, D. J. TGF- signaling and the fibrotic response. **The FASEB Journal**, [s. l.], v. 18, n. 7, p. 816–827, 2004. Disponível em: <<http://www.fasebj.org/cgi/doi/10.1096/fj.03-1273rev>>

LEE, K. S.; RO, Y. J.; RYOO, Y. W.; KWON, H. J.; SONG, J. Y. Regulation of interleukin-4 on collagen gene expression by systemic sclerosis fibroblasts in culture. **Journal of Dermatological Science**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 110–117, 1996.

LEE, Y. H.; SONG, G. G. Meta-analysis of circulating adiponectin, leptin, and resistin levels in systemic sclerosis. **Zeitschrift für Rheumatologie**, [s. l.], 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00393-016-0172-5>>

LEROY, E. C.; MEDSGER, T. A. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. **The Journal of rheumatology**, [s. l.], v. 28, n. 7, p. 1573–6, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11469464>>

LI, G.; LARREGINA, A. T.; DOMSIC, R. T.; STOLZ, D. B.; MEDSGER, T. A.; LAFYATIS, R.; FUSCHIOTTI, P. Skin-Resident Effector Memory CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>T Cells Exhibit a Profibrotic Phenotype in Patients with Systemic Sclerosis. **Journal of Investigative Dermatology**, [s. l.], v. 137, n. 5, p. 1042–1050, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2016.11.037>>

LIU, M.; WU, W.; SUN, X.; YANG, J.; XU, J.; FU, W.; LI, M. New insights into CD4<sup>+</sup>T cell abnormalities in systemic sclerosis. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, [s. l.], v. 28, p. 31–36, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.12.002>>

LIU, X.; GAO, N.; LI, M.; XU, D.; HOU, Y.; WANG, Q.; ZHANG, G.; SUN, Q.; ZHANG, H.; ZENG, X. Elevated Levels of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T Cells in Systemic Sclerosis Patients Contribute to the Secretion of IL-17 and Immunosuppression Dysfunction. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 2–9, 2013.

MACDONALD, K. G.; DAWSON, N. A. J.; HUANG, Q.; DUNNE, J. V.; LEVINGS, M. K.; BROADY, R. Regulatory T cells produce profibrotic cytokines in the skin of patients with systemic sclerosis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, [s. l.], v. 135, n. 4, p. 946–955.e9, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2014.12.1932>>

MAES, M.; CARVALHO, A. F. The Compensatory Immune-Regulatory Reflex System (CIRS) in Depression and Bipolar Disorder. **Molecular neurobiology**, [s. l.], p. 1–19, 2018.

MAYES, M. D.; LACEY, J. V.; BEEBE-DIMMER, J.; GILLESPIE, B. W.; COOPER, B.; LAING, T. J.; SCHOTTENFELD, D. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. **Arthritis and Rheumatism**, [s. l.], v. 48, n. 8, p. 2246–2255, 2003.

MEDSGER, T. A. Natural history of systemic sclerosis and the assessment of disease activity, severity, functional status, and psychologic well-being. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 255–273, 2003.

MOTEGI, S. I.; OKADA, E.; UCHIYAMA, A.; YAMADA, K.; OGINO, S.; YOKOYAMA, Y.; TAKEUCHI, Y.; MONMA, F.; SUZUKI, T.; ISHIKAWA, O. Role of endothelin-1/endothelin receptor signaling in fibrosis and calcification in nephrogenic systemic fibrosis. **Experimental Dermatology**, [s. l.], v. 23, n. 9, p. 664–669, 2014.

MURATA, M.; FUJIMOTO, M.; MATSUSHITA, T.; HAMAGUCHI, Y.; HASEGAWA, M.; TAKEHARA, K.; KOMURA, K.; SATO, S. Clinical association of serum interleukin-17 levels in systemic sclerosis: Is systemic sclerosis a Th17 disease? **Journal of Dermatological Science**, [s. l.], v. 50, n. 3, p. 240–242, 2008.

NEUMEIER, M.; WEIGERT, J.; SCHA, A.; WEHRWEIN, G. Different effects of adiponectin isoforms in human monocytic cells. **Journal of Leukocyte Biology**, [s. l.], v. 79, n. April, p. 803–808, 2006.

OLEWICZ-GAWLIK A, DANCZAK-PAZDROWSKA A, KUZNAR-KAMINSKA B, BATURA-GABRYEL H, KATULSKA K, WOJCIECH S, TRZYBULSKA D, H. P. Circulating adipokines and organ involvement in patients with systemic sclerosis. **Acta Reumatol Port**, [s. l.], v. 40, n. 2, p. 156–62., 2015.

PAREL, Y.; AURRAND-LIONS, M.; SCHEJA, A.; DAYER, J. M.; ROOSNEK, E.; CHIZZOLINI, C. Presence of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> double-positive T cells with very high interleukin-4 production potential in lesional skin of patients with systemic sclerosis. **Arthritis and Rheumatism**, [s. l.], v. 56, n. 10, p. 3459–3467, 2007.

PICKERING, T. G.; HALL, J. E.; APPEL, L. J.; FALKNER, B. E.; GRAVES, J.; HILL, M. N.; JONES, D. W.; KURTZ, T.; SHEPS, S. G.; ROCCELLA, E. J. Recommendations for blood pressure measurement in humans and experimental animals: part 1: blood pressure measurement in humans: a statement for professionals from the Subcommittee of Professional and Public Education of the American Heart Association Cou. **Circulation**, [s. l.], v. 111, n. 5, p. 697–716, 2005.

RADSTAKE, T. R. D. J. et al. Genome-wide association study of systemic sclerosis identifies CD247 as a new susceptibility locus. **Nature Genetics**, [s. l.], v. 42, n. 5, p. 426–429, 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/ng.565>>

RADSTAKE, T. R. D. J.; VAN BON, L.; BROEN, J.; HUSSIANI, A.; HESSELSTRAND, R.; WUTTGE, D. M.; DENG, Y.; SIMMS, R.; LUBBERTS, E.; LAFYATIS, R. The pronounced Th17 profile in systemic sclerosis (SSc) together with intracellular expression of TGFβ and IFNγ distinguishes SSc phenotypes. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 4, n. 6, 2009. a.

RADSTAKE, T. R. D. J.; VAN BON, L.; BROEN, J.; WENINK, M.; SANTEGOETS, K.; DENG, Y.; HUSSAINI, A.; SIMMS, R.; CRUIKSHANK, W. W.; LAFYATIS, R. Increased Frequency and Compromised Function of T Regulatory Cells in Systemic Sclerosis (SSc) Is Related to a Diminished CD69 and TGFβ Expression. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 4, n. 6, p. e5981, 2009. b. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0005981>>

RAJA, J.; DENTON, C. P. Cytokines in the immunopathology of systemic sclerosis. **Seminars in Immunopathology**, [s. l.], v. 37, n. 5, p. 543–557, 2015.

ROVIN, B. H.; SONG, H. Chemokine induction by the adipocyte-derived cytokine adiponectin. **Clinical Immunology**, [s. l.], v. 120, n. 1, p. 99–105, 2006.

SADA, K.-E.; YAMASAKI, Y.; MARUYAMA, M.; SUGIYAMA, H.; YAMAMURA, M.; MAESHIMA, Y.; MAKINO, H. Altered levels of adipocytokines in association with insulin resistance in patients with systemic lupus erythematosus. **The Journal of rheumatology**, [s. l.], v. 33, n. 8, p. 1545–52, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16881111>>

SANGES, S.; GUERRIER, T.; LAUNAY, D.; LEFÈVRE, G.; LABALETTE, M.; FORESTIER, A.; SOBANSKI, V.; CORLI, J.; HAUSPIE, C.; JENDOUBI, M.; YAKOUB-AGHA, I.; HATRON, P. Y.; HACHULLA, E.; DUBUCQUOI, S. Role of B cells in the pathogenesis of systemic sclerosis. **Revue de Medecine Interne**, [s. l.], v. 38, n. 2, p. 113–124, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.revmed.2016.02.016>>

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**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 140–146, 2001.

ŠENOLT, L.; PAVELKA, K.; HOUSA, D.; HALUZÍK, M. Increased adiponectin is negatively linked to the local inflammatory process in patients with rheumatoid arthritis. **Cytokine**, [s. l.], v. 35, n. 5–6, p. 247–252, 2006.

SFIKAKIS, P. P.; MCCUNE, B. K.; TSOKOS, M.; ARONI, K.; VAYIOPOULOS, G.; TSOKOS, G. C. **Immunohistological demonstration of transforming growth factor-beta isoforms in the skin of patients with systemic sclerosis.**, 1993.

SHEHZAD, A.; IQBAL, W.; SHEHZAD, O.; LEE, Y. S. Adiponectin: regulation of its production and its role in human diseases. **Hormones (Athens, Greece)**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 8–20, 2012.

SINGH, R. P.; HASAN, S.; SHARMA, S.; NAGRA, S.; YAMAGUCHI, D. T.; WONG, D. T. W.; HAHN, B. H.; HOSSAIN, A. Th17 cells in inflammation and autoimmunity. **Autoimmunity Reviews**, [s. l.], v. 13, n. 12, p. 1174–1181, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2014.08.019>>

SLOBODIN, G.; RIMAR, D. Regulatory T Cells in Systemic Sclerosis: a Comprehensive Review. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, [s. l.], v. 52, n. 2, p. 194–201, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12016-016-8563-6>>

STEEN, V. D.; MEDSGER, T. A. Severe organ involvement in systemic sclerosis. **Arthritis Rheumatism**, [s. l], v. 43, n. 7, p. 2437–2444, 2000. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L41825772%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1016/j.reaurg.2005.09.019%5Cnhttp://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=16240693&id=doi:10.1016/j.reaurg.2005.09.019&atitle=Severe+organ+involvement>>

TABATA, Y.; KHURANA HERSHEY, G. K. IL-13 receptor isoforms: breaking through the complexity. **Current allergy and asthma reports**, [s. l], v. 7, n. 5, p. 338–45, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17697639>>

TANG, J.; LEI, L.; PAN, J.; ZHAO, C.; WEN, J. Higher levels of serum interleukin-35 are associated with the severity of pulmonary fibrosis and Th2 responses in patients with systemic sclerosis. **Rheumatology International**, [s. l], v. 38, n. 8, p. 1511–1519, 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00296-018-4071-8>>

TOUSSIROT, É.; GAUGLER, B.; BOUHADDI, M.; NGUYEN, N. U.; SAAS, P.; DUMOULIN, G. Elevated adiponectin serum levels in women with systemic autoimmune diseases. **Mediators of Inflammation**, [s. l], v. 2010, 2010.

VALMORI, D.; RAFFIN, C.; RAIMBAUD, I.; AYYOUB, M. Human ROR t+ TH17 cells preferentially differentiate from naive FOXP3+Treg in the presence of lineage-specific polarizing factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l], v. 107, n. 45, p. 19402–19407, 2010. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1008247107>>

VAN DEN HOOGEN, F.; KHANNA, D.; FRANSEN, J.; JOHNSON, S. R.; BARON, M.; TYNDALL, A.; MATUCCI-CERINIC, M.; NADEN, R. P.; MEDSGER, T. A.; CARREIRA, P. E.; RIEMEKASTEN, G.; CLEMENTS, P. J.; DENTON, C. P.; DISTLER, O.; ALLANORE, Y.; FURST, D. E.; GABRIELLI, A.; MAYES, M. D.; VAN LAAR, J. M.; SEIBOLD, J. R.; CZIRJAK, L.; STEEN, V. D.; INANC, M.; KOWAL-BIELECKA, O.; MÜLLER-LADNER, U.; VALENTINI, G.; VEALE, D. J.; VONK, M. C.; WALKER, U. A.; CHUNG, L.; COLLIER, D. H.; CSUKA, M. E.; FESSLER, B. J.; GUIDUCCI, S.; HERRICK, A.; HSU, V. M.; JIMENEZ, S.; KAHALEH, B.; MERKEL, P. A.; SIERAKOWSKI, S.; SILVER, R. M.; SIMMS, R. W.; VARGA, J.; POPE, J. E. 2013 Classification Criteria for Systemic Sclerosis: An American College of

Rheumatology/European League Against Rheumatism Collaborative Initiative. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 65, n. 11, p. 2737–2747, 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/art.38098>>

VERSINI, M.; JEANDEL, P. Y.; ROSENTHAL, E.; SHOENFELD, Y. Obesity in autoimmune diseases: Not a passive bystander. **Autoimmunity Reviews**, [s. l.], v. 13, n. 9, p. 981–1000, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2014.07.001>>

WHITFIELD, M. L.; FINLAY, D. R.; MURRAY, J. I.; TROYANSKAYA, O. G.; CHI, J.-T.; PERGAMENSHIKOV, A.; MCCALMONT, T. H.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D.; CONNOLLY, M. K. Systemic and cell type-specific gene expression patterns in scleroderma skin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 100, n. 21, p. 12319–12324, 2003. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1635114100>>

WYNN, T. A. IL-13 EFFECTOR FUNCTIONS. **Annual Review of Immunology**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 425–456, 2003. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141142>>

WYNN, T. A. Fibrotic disease and the TH1/TH2 paradigm. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 4, n. 8, p. 583–594, 2004.

XU, A.; CHAN, K. W.; HOO, R. L. C.; WANG, Y.; TAN, K. C. B.; ZHANG, J.; CHEN, B.; LAM, M. C.; TSE, C.; COOPER, G. J. S.; LAM, K. S. L. Testosterone selectively reduces the high molecular weight form of adiponectin by inhibiting its secretion from adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 280, n. 18, p. 18073–18080, 2005.

YANG, X.; YANG, J.; XING, X.; WAN, L.; LI, M. Increased frequency of Th17 cells in systemic sclerosis is related to disease activity and collagen overproduction. **Arthritis research & therapy**, [s. l.], v. 16, p. R4, 2014.

ZHAO, J. H.; HUANG, X. L.; DUAN, Y.; WANG, Y. J.; CHEN, S. Y.; WANG, J. Serum adipokines levels in patients with systemic sclerosis: A meta-analysis. **Modern Rheumatology**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 298–305, 2017.

**APÊNDICES**

## Apêndice A

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) para participar da pesquisa **“AVALIAÇÃO DOS BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E DE DISFUNÇÃO ENDOTELIAL E SUA CORRELAÇÃO COM AS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS EM PACIENTES COM ESCLERODERMIA”**, a ser realizada no Ambulatório de Reumatologia do Hospital Universitário de Londrina . O objetivo da pesquisa é “estudar os mecanismos moleculares envolvidos na lesão dos vasos sanguíneos e de tecidos em pacientes com esclerodermia”. Sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: realização de uma avaliação clínica pelo médico reumatologista e uma coleta de sangue. Esclarecemos que sua participação é totalmente voluntária, podendo o (a) senhor (a): recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento, sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Esclarecemos, também, que suas informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. Todos os dados coletados, clínicos e laboratoriais, serão descartados após a publicação do estudo.

Esclarecemos ainda, que o(a) senhor(a) não pagará e nem será remunerado(a) por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação.

A sua participação neste estudo contribuirá para o melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento da doença. Quanto aos riscos, informamos que sua participação não acarretará em qualquer risco à sua saúde nem alteração de qualquer um dos seus tratamentos. A coleta de sangue pode ocasionar sinais decorrentes da punção venosa e consiste: dor no local da punção venosa ou pequeno hematoma e, muito raramente, vermelhidão ou infecção local. Mesmo sendo mínimos, caso ocorra algum tipo de desconforto o participante será prontamente atendido e amparado pelos farmacêuticos responsáveis pela coleta de sangue e um dos pesquisadores deste estudo.

Caso o(a) senhor(a) tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos poderá nos contatar (**Andréa Name Colado Simão, Avenida Robert Koch 60, telefone: 3371-2321, 9627-8181**), ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da

Universidade Estadual de Londrina, situado junto ao LABESC – Laboratório Escola, no Campus Universitário, telefone 3371-5455, e-mail: [cep268@uel.br](mailto:cep268@uel.br).

Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas devidamente preenchida, assinada e entregue ao (à) senhor(a).

Londrina, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_.

**Pesquisadores Responsáveis:**

**Profa Dra. Andréa Name Colado Simão**

RG: 6.226.736-4

Tel: 3371-2321 / 9627-8181

|  |
|--|
| <p>_____ (NOME POR EXTENSO DO SUJEITO DE PESQUISA), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar voluntariamente da pesquisa descrita acima.</p> <p>Assinatura : _____</p> <p>Data: _____</p> |
|--|

Obs.: Caso o participante da pesquisa seja menor de idade, o texto deve estar voltado para os pais e deve ser incluído ainda, campo para assinatura do menor e do responsável.



**Subjetivo:** Raynaud ( ) Espessamento cutâneo ( ) Dispnéia ( ) Disfagia ( )

---



---



---



---



---



---



---



---

**Objetivo:** PA \_\_\_\_ / \_\_\_\_ // Peso: \_\_\_\_ Kg Alt: \_\_\_\_ IMC: \_\_\_\_  
 Cintura Abdominal: \_\_\_\_ cm  
 Osteoarticular:

**Úlceras Digitais:**  
 ( ) Sim ( ) Não

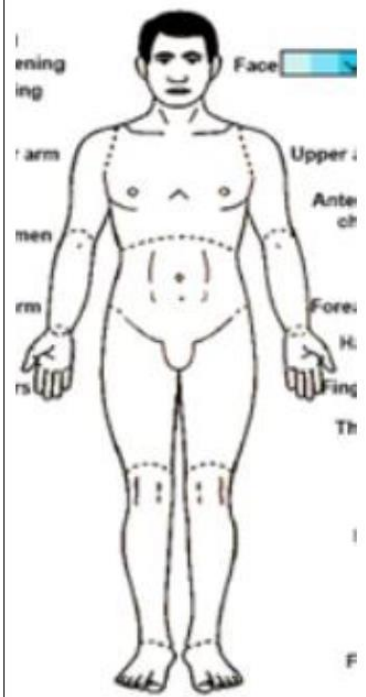
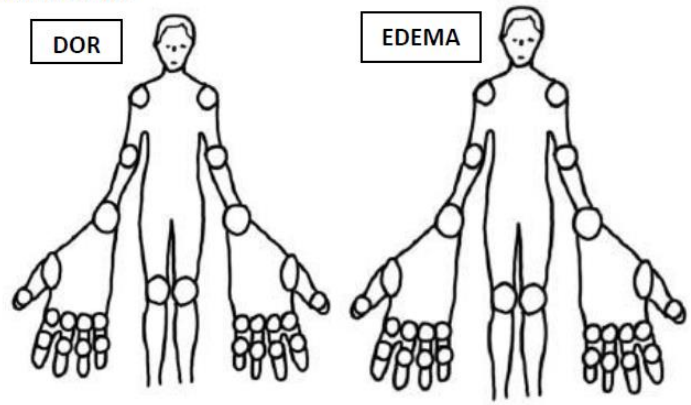
**ACV:**

**AR:**

**ABD:**

**EXT:**

**Outros:**



| DIREITA |   |   |   |            | ESQUERDA |   |   |   |
|---------|---|---|---|------------|----------|---|---|---|
| 0       | 1 | 2 | 3 | DEDOS      | 0        | 1 | 2 | 3 |
| 0       | 1 | 2 | 3 | DORSO MÃOS | 0        | 1 | 2 | 3 |
| 0       | 1 | 2 | 3 | ANTEBRAÇOS | 0        | 1 | 2 | 3 |
| 0       | 1 | 2 | 3 | BRAÇOS     | 0        | 1 | 2 | 3 |
|         |   |   |   | FACE       | 0        | 1 | 2 | 3 |
|         |   |   |   | TÓRAX      | 0        | 1 | 2 | 3 |
|         |   |   |   | ABDOMEN    | 0        | 1 | 2 | 3 |
| 0       | 1 | 2 | 3 | COXAS      | 0        | 1 | 2 | 3 |
| 0       | 1 | 2 | 3 | PERNAS     | 0        | 1 | 2 | 3 |
| 0       | 1 | 2 | 3 | DORSO PÉS  | 0        | 1 | 2 | 3 |

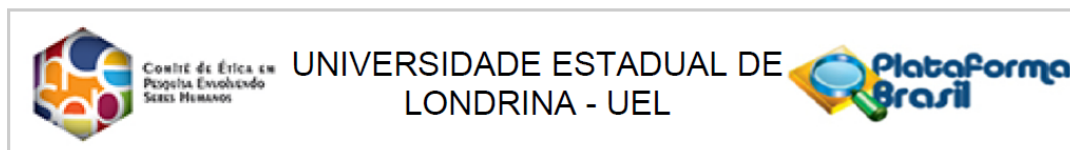
FIGURA 2 – Escore Cutâneo Total – Método de Rodnan Modificado (ECT-RM).

**0** Não envolvido  
**1** Espessamento leve  
**2** Espessamento moderado  
**3** Espessamento grave



**ANEXOS**

## ANEXO A – Documento de Aprovação do Comitê de Ética da UEL



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DOS BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E DE DISFUNÇÃO ENDOTELIAL E SUA CORRELAÇÃO COM AS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS EM PACIENTES COM ESCLERODERMIA

**Pesquisador:** Andréa Name Colado Simão

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 65509817.7.0000.5231

**Instituição Proponente:** CCS - Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicologias

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.183.282

**Apresentação do Projeto:**

O presente projeto, consiste em um estudo observacional (transversal) analítico prospectivo, para o qual serão selecionados 50 pacientes com diagnóstico de esclerose sistêmica, com idade entre 18 e 70 anos de ambos os sexos, atendidos no Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário de Londrina (AEHU). Para o grupo controle serão utilizados os dados de 100 indivíduos saudáveis, pareados pelo sexo, idade, etnia e índice de massa corpórea, previamente selecionados e avaliados em outro projeto de pesquisa aprovado pelo CEP (CAAE: 06405812.1.0000.5231). Serão excluídos os participantes com outras doenças inflamatórias e/ou infecciosas agudas e crônicas, insuficiência renal ou hepática crônica, neoplasias e em uso de suplementos antioxidantes. O diagnóstico da doença em forma sistêmica será realizado utilizando os critérios do American College of Rheumatology e do European League Against Rheumatism (ACR e EULAR) de 2013. Os participantes serão submetidos a avaliação antropométrica, aferição da pressão arterial, análises hematológicas, bioquímicas e imunológicas, dentre eles: níveis séricos de triglicerídeos, colesterol total e frações, glicose, ácido úrico e ferro sérico, níveis séricos de proteína C reativa, dosagem de homocisteína e ferritina, pesquisa de auto anticorpos contra o núcleo, pesquisa de anticorpos anti-centrômero, anti-topoisomerase I (anti-SCL-70) ou anti-RNA polimerase III. A análises de Marcadores de Estresse Oxidativo e de Disfunção Endotelial será

**Endereço:** LABESC - Sala 14

**Bairro:** Campus Universitário

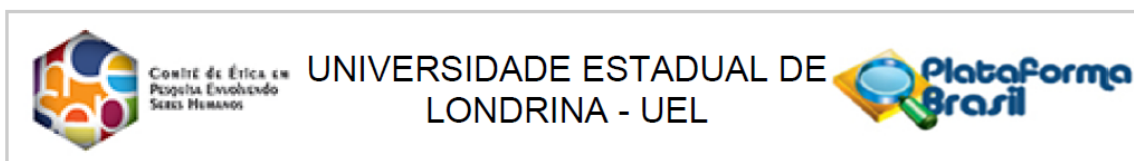
**UF:** PR

**Município:** LONDRINA

**CEP:** 86.057-970

**Telefone:** (43)3371-5455

**E-mail:** cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 2.183.282

realizada por meio da avaliação de lipoperóxidos, determinação de Produtos Avançados da Oxidação Proteica (AOPP), dosagem plasmática de isoprostanos e LDL, níveis de metabólitos de NO, níveis plasmáticos de moléculas de adesão (VCAM, ICAM, ECAM, E-Selectinas, P-selectina) e avaliação dos níveis do inibidor do ativados do plasminogênio (PAI). Exames não laboratoriais: tomografias de tórax de alta resolução (radiologia), as ecocardiografias transesofágicas (cardiologia), as espirometrias e testes de caminhada de 6 minutos (fisioterapia), as manometrias esofágicas (gastroenterologia) e as capilaroscopias de leito ungueal (reumatologia) serão realizadas pelas equipes citadas do Hospital Universitário de Londrina, utilizando-se dos materiais disponíveis nesse serviço ou ainda obtidas no prontuários dos pacientes quando realizadas em até 6 meses da data da coleta de sangue.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Avaliar os biomarcadores de estresse oxidativo e de disfunção endotelial e sua associação com as formas clínicas e acometimento orgânico em pacientes com esclerose sistêmica.

Objetivo Secundário:

- Comparar os marcadores de disfunção endotelial e de estresse oxidativo em indivíduos saudáveis (grupo controle) e em pacientes com esclerodermia sistêmica
- Verificar se há correlação entre os marcadores de estresse oxidativo e de disfunção endotelial em pacientes com ambas as formas clínicas de esclerodermia
- Avaliar a associação entre os marcadores de estresse oxidativo e de disfunção endotelial com as formas clínicas de esclerodermia.
- Determinar se há associação entre o acometimento orgânico e os marcadores de disfunção endotelial e de estresse oxidativo.
- Identificar preditores da doença e de suas formas clínicas.
- Identificar preditores de acometimento orgânico.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Segundo a pesquisadora, este estudo não acarretará qualquer tipo de risco para a saúde dos participantes ou pesquisadores envolvidos neste estudo. No entanto, a coleta de sangue pode ocasionar sinais decorrentes da punção venosa que consiste em dor no local da punção venosa ou pequeno hematoma e, muito raramente, vermelhidão ou infecção local. Mesmo sendo mínimos,

**Endereço:** LABESC - Sala 14

**Bairro:** Campus Universitário

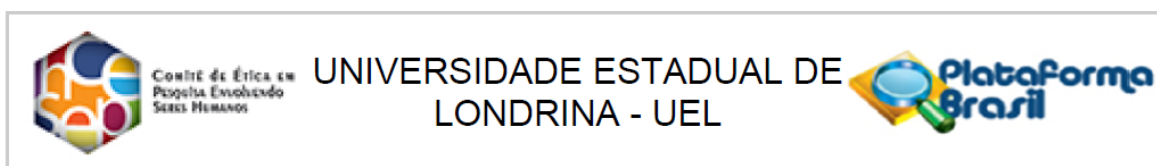
**UF:** PR

**Telefone:** (43)3371-5455

**Município:** LONDRINA

**CEP:** 86.057-970

**E-mail:** cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 2.183.282

caso ocorra algum tipo de desconforto o participante será prontamente atendido e amparado pelos farmacêuticos responsáveis pela coleta de sangue.

**Benefícios:**

Segundo a pesquisadora o estudo não acarretará benefícios diretos ao paciente. No entanto, auxiliará indiretamente aumentando os conhecimentos sobre a fisiopatologia da doença.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A presente pesquisa é relevante para área específica, uma vez a esclerodermia é uma doença reumatológica inflamatória do tecido conectivo, crônica, que resulta em fibrose generalizada de órgãos contendo tecido conjuntivo, comprometendo significativamente a qualidade de vida dos pacientes acometidos. Nesse sentido o estudo realizado poderá fornecer evidências que contribuam na elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na fisiopatologia da esclerose sistêmica e de sua progressão. E também apontar possíveis biomarcadores que possam ser empregados na identificação laboratorial da atividade da doença, na localização das manifestações clínicas assim como na alteração da capacidade funcional dos pacientes. Espera-se que com esses achados, no futuro, os pacientes possam ser diagnosticados e tratados precocemente de forma a melhorar sua qualidade de vida.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

- Folha de Rosto foi assinada pela vice chefe do departamento proponente, uma vez que a pesquisadora responsável pela pesquisa esta ocupando a chefia do departamento.
- Autorização do HU para realização da pesquisa está devidamente assinada pela superintendente.
- Termo de confidencialidade e Sigilo e Termo de responsabilidade para guarda de material biológico e formação de banco de material humano estão adequadamente assinados pela pesquisadora.
- TCLE está na forma de convite e segue as normas da resolução 466/12.
- Orçamento foi apresentado e o financiamento é próprio.
- Cronograma está adequado.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

As pendências foram atendidas. Recomenda-se aprovação.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Prezado (a) Pesquisador (a),

Este é seu parecer final de aprovação, vinculado ao Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres

**Endereço:** LABESC - Sala 14

**Bairro:** Campus Universitário

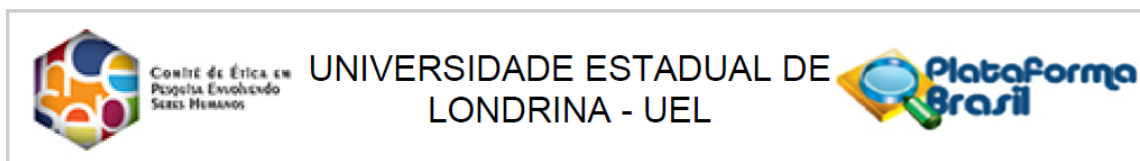
**CEP:** 86.057-970

**UF:** PR

**Município:** LONDRINA

**Telefone:** (43)3371-5455

**E-mail:** cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 2.183.282

Humanos da Universidade Estadual de Londrina. É sua responsabilidade imprimi-lo para apresentação aos órgãos e/ou instituições pertinentes.

Coordenação CEP/UEL.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

| Tipo Documento  | Arquivo   | Postagem               | Autor                    | Situação |
|---|---|------------------------|--------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto  | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_649900.pdf                                  | 08/07/2017<br>14:28:40 |                          | Aceito   |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador                             | ProjetoEsclerose_1.docx   | 08/07/2017<br>14:27:12 | Andréa Name Colado Simão | Aceito   |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência             | TCLE.doc  | 08/07/2017<br>14:26:58 | Andréa Name Colado Simão | Aceito   |
| Outros  | verba_proaf.pdf   | 08/07/2017<br>14:25:12 | Andréa Name Colado Simão | Aceito   |
| Outros  | autorizacaoHU.jpg   | 02/03/2017<br>17:11:23 | Andréa Name Colado Simão | Aceito   |
| Outros  | DeclaracaodeResponsabilidadeparaGuardaUsodeBancodados_Scan.pdf                | 22/02/2017<br>14:15:37 | Andréa Name Colado Simão | Aceito   |
| Folha de Rosto  | folhaderostoScan.pdf  | 22/02/2017<br>14:13:13 | Andréa Name Colado Simão | Aceito   |
| Outros  | TermodeConfidencialidadeeSigilo.JPG   | 21/02/2017<br>21:20:44 | Andréa Name Colado Simão | Aceito   |
| Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco | DeclaracaodeResponsabilidadeparauso deBancodeMaterialBiologicoHumano_scan.JPG | 21/02/2017<br>21:17:03 | Andréa Name Colado Simão | Aceito   |

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** LABESC - Sala 14

**Bairro:** Campus Universitário

**UF:** PR

**Município:** LONDRINA

**CEP:** 86.057-970

**Telefone:** (43)3371-5455

**E-mail:** cep268@uel.br



Centro de Ética em  
Pesquisa Envolvendo  
SIBLI HERMANOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 2.183.282

LONDRINA, 24 de Julho de 2017

---

**Assinado por:**  
**Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** LABESC - Sala 14

**Bairro:** Campus Universitário

**UF:** PR

**Telefone:** (43)3371-5455

**Município:** LONDRINA

**CEP:** 86.057-970

**E-mail:** cep268@uel.br