

MARILDA GUIMARÃES SILVA

**Interleucina-17A como biomarcador da
atividade da dermatomiosite e polimiosite**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético

Orientador: Prof. Dr. Samuel Katsuyuki Shinjo

Coorientadora: Profa. Dra. Sueli Mieko Oba Shinjo

São Paulo

2019

MARILDA GUIMARÃES SILVA

**Interleucina-17A como biomarcador da
atividade da dermatomiosite e polimiosite**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético

Orientador: Prof. Dr. Samuel Katsuyuki Shinjo

Coorientadora: Profa. Dra. Sueli Mieko Oba Shinjo

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Marilda Guimarães
Interleucina-17A como biomarcador da atividade
da dermatomiosite e polimiosite / Marilda Guimarães
Silva. -- São Paulo, 2019.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético.
Orientador: Samuel Katsuyuki Shinjo.
Coorientadora: Sueli Mieko Oba Shinjo.

Descritores: 1.Biomarcadores 2.Citocinas
3.Dermatomiosite 4.Interleucinas 5.Miosite
6.Polimiosite

USP/FM/DBD-421/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Nome: Silva, Marilda Guimarães

Título: Interleucina-17A como biomarcador da atividade da dermatomiosite e polimiosite

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutorado em Ciências

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Aos meus Pais, **Maria** (*in memoriam*) e **Eloi**, por me ensinarem a ter dignidade e responsabilidade acima de tudo, empatia, amor ao próximo e especialmente resiliência, para que jamais desista dos meus sonhos.

Aos meus **irmãos** “*A Grande Família*”, pessoas maravilhosas que Deus me presenteou, que alegam a minha vida, estão presentes nos momentos mais difíceis, me proporcionam indispensável aprendizado e tornam clara a pureza ao qual o termo irmandade se apropria: compaixão, ajuda mútua, a presença.

Ao meu companheiro **Wagner**, pelo amor, compreensão, respeito, parceria e sobretudo paciência.

“A vida é uma linha tênue entre desafiar e desistir...”

Ao longo dela enfrentamos grandes experiências, todas elas importantes, sejam desilusões, perdas, vitórias ou recompensas...

Por isso, quando algo parecer impossível, reinicie, mude a rota, ou a vida perde o sentido”.

Marilda Guimarães Silva

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. **Samuel Katsuyuki Shinjo**, pelos ensinamentos, pela oportunidade de acompanhá-lo por esses 7 anos e por contribuir grandemente com minha formação científica.

À Profa. Dra. **Sueli Mieko Oba-Shinjo** do Laboratório de Biologia Molecular e Celular (LIM 15), Departamento de Neurologia da FMUSP, por todo apoio durante o desenvolvimento do meu trabalho e pelo enriquecimento intelectual.

À Profa. Dra. **Eloisa Silva Dutra de Oliveira Bonfá** e à Profa. Dra. **Rosa Maria Rodrigues Pereira**, por me proporcionarem a oportunidade de realizar mais um desafio, uma etapa de vida.

Ao Dr. **Fernando Henrique Carlos de Souza**, a Dra. **Sandra Gofinet Pasoto**, a Dra. **Ana Paula Pereira Velosa** e Dra. **Walcy Paganelly Rosolia Teodoro**, pelo respeito, pelos conselhos e pelas valiosas contribuições no trabalho antes e após a qualificação.

Ao Prof. Dr. **Carlos Augusto Gonçalves Pasqualucci**, por permitir utilizar o seu laboratório para a realização de alguns ensaios em especial à sua amável secretária **Pérola Cristina Lucas**, pela confiança, compromisso, por todo carinho e auxílio dispensado.

À **Maria de Fátima de Almeida**, pelas preciosas dicas de procedimentos/ensaios laboratoriais, pelos conselhos mais profundos e eficientes que já pude receber, pela confiança, presença contínua em minha vida, pelo afeto verdadeiro e recíproco.

À **Maria Aurora Gomes da Silva** pela amizade sincera, pelas grandes colaborações nos ensaios laboratoriais, pela compaixão, por compartilhar importantes experiências para que pudesse desafiar as barreiras do dia a dia.

Ao **Rafael Giovani Missé**, meu grande amigo, por estar sempre comigo, por ser tão carinhoso e humano. Pelas dicas infalíveis e auxílio na formatação dos trabalhos.

À **Isabela Bruna Pires Borges, Virginia Lúcia Nazário Bonoldi, Alexandre Moura dos Santos, Leonardo Santos Hoff, Diego Sales de Oliveira, Jean Marcos de Souza, Pablo Arturo Olivo Pallo e Juliana de Jesus do Nascimento**, pelas imprescindíveis trocas de experiência, pela amizade e por todo apoio.

Aos meus grandes amigos do Laboratório de Condicionamento Físico e Investigação em Reumatologia (LACRE): **Wagner da Silva Dantas, Saulo dos Santos Gil e Igor Murai**, que contribuíram com o meu trabalho, assim como com a minha formação intelectual e pessoal.

Aos secretários da Reumatologia, **Marta Janete Pereira, Cláudia Reis de Oliveira, Mayra de Carvalho e Adriano Balbino Bezerra** e às secretárias da pós-graduação, **Tânia Borges e Rosana Costa**, pela gentileza, simpatia e apoio prestado sempre que foi preciso.

A toda equipe da **Reumatologia: Laboratórios vizinhos, Biotério e Sala de lavagem e autoclavagem**, pessoas que sempre me receberam com muito respeito e carinho. Agradeço por todos nossos encontros. É imensamente gratificante trabalhar com pessoas de bom humor e companheirismo.

A minha inesquecível amiga **Jurassi Pereira** (*in memoriam*), que com seu bom humor e coragem, mostrou o quanto a vida deve ser aproveitada ao máximo.

À equipe do **HC/FMUSP**, em especial às **enfermeiras e secretárias** da Reumatologia, que me auxiliaram durante o acompanhamento no Laboratório e enfermaria.

Aos meus Professores da graduação, em especial a Profa. **Agda Maria Oliveira** que me lançou aos primeiros passos da carreira científica.

Às minhas queridas **Edite Hatsumi Yamashiro Kanashiro, Juliana Ide Aoki, Mussya Rocha e Marcela Satow** do Instituto de Medicina Tropical da FMUSP, pelo imenso carinho, respeito e aprendizado inicial da carreira científica.

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular e Celular (LIM 15), **Departamento de Neurologia da FMUSP** que contribuiu para o desenvolvimento de determinadas etapas durante a minha formação.

A toda equipe da **Limpeza e Segurança**, que trabalha diariamente para manter a Instituição preparada para nos receber.

Aos **Pacientes** do **HC/FMUSP**, que superam obstáculos diários e nos mostram que não há barreiras quando realmente se quer viver.

Em especial, à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES), pela concessão da bolsa de Doutorado e pelo apoio financeiro para que o desenvolvimento desse trabalho fosse possível.

RESUMO

Silva MG. *Interleucina-17A como biomarcador da atividade da dermatomiosite e polimiosite* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Introdução: Dermatomiosite (DM) e polimiosite (PM) são miopatias autoimunes sistêmicas que apresentam infiltrado de células inflamatórias nos tecidos musculares. Algumas citocinas pró-inflamatórias têm sido destacadas por estarem envolvidas na fisiopatogênese dessas doenças, a exemplo da interleucina (IL)-17A.

Objetivos: Avaliar a concentração sérica de IL-17A em pacientes com DM e PM, e correlacioná-la com os dados demográficos, clínicos, laboratoriais, terapêuticos e *status* dessas doenças.

Métodos: Estudo transversal que incluiu 80 pacientes adultos com DM e 32 com PM, no período de 2012 a 2016. Os pacientes foram pareados por sexo, etnia e idade com 104 indivíduos saudáveis. A análise de IL-17A sérica, assim como das demais citocinas (IL-6, TNF α e INF γ), foi realizada por imunoensaio multiplex. Os parâmetros do *status* da doença foram baseados nos escores estabelecidos por *International Myositis Assessment & Clinical Studies Group* (IMACS).

Resultados: A média de idade dos pacientes com DM e PM foi de $46,0 \pm 13,9$ e $47,7 \pm 14,3$ anos, respectivamente, com predomínio de mulheres e cor branca em ambos os grupos. De modo geral, as características clínicas, laboratoriais, terapêuticas e *status* atual da doença foram semelhantes entre os pacientes com DM e PM. O nível mediano de IL-17A sérica foi maior nos pacientes com PM e DM em relação ao grupo controle [0,73 (0,53-1,14) vs. 0,49 (0,28-0,83) vs. 0,35 (0,09-0,61) pg/mL, respectivamente; $P < 0,050$] e maior em PM quando comparado a DM ($P < 0,001$). Em DM, os níveis de IL-17A sérica foram associados a lesões cutâneas cumulativas, parâmetros de IMACS e níveis de IL-6 e INF γ séricos. Em PM o nível de IL-17A sérica correlacionou com a idade atual dos pacientes, parâmetros de IMACS e níveis de INF γ e TNF α séricos. O nível de IL-17A sérica não correlacionou com o tratamento medicamentoso.

Conclusões: A concentração sérica de IL-17A não está somente aumentada em pacientes com DM e PM, mas também associada a atividade dessas doenças. Os dados sugerem

fortemente a IL-17A como possível biomarcador de atividade destas miopatias autoimunes sistêmicas.

Descritores: Biomarcadores; Citocinas; Dermatomiosite; Interleucinas; Miosite; Polimiosite.

ABSTRACT

Silva MG. *Interleukin-17A as biomarker of disease activity of dermatomyositis and polymyositis* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

Introduction: Dermatomyositis (DM) and polymyositis (PM) are systemic autoimmune myopathies that show inflammatory cell infiltration in muscle tissues. Some pro-inflammatory cytokines have been highlighted for being involved in the pathophysiology of these diseases, such as interleukin (IL)-17A. **Objectives:** To assess serum levels of IL-17A in patients with DM and patients with PM and to correlate IL-17A with demographic, clinical, laboratory and therapeutic data, and disease status. **Methods:** This was a cross-sectional, single-center study that included patients with DM and patients with PM who were age-, gender- and ethnicity-matched to healthy individuals. Serum IL-17A analysis, as well as analysis for other cytokines (IL-6, TNF α and IFN γ), was performed by multiplex immunoassay. The disease status parameters were based on the International Myositis Assessment and Clinical Studies Group (IMACS) set scores. **Results:** Mean age of patients with DM and patients with PM was 46.0 ± 13.9 and 47.7 ± 14.3 years, respectively, with a predominance of female and white ethnicity in both groups. Overall, clinical, laboratory, therapeutic, and current disease status were similar among patients with DM and patients with PM. Median serum levels of IL-17A was higher in patients with PM and patients with DM than the control group [0.73 (0.53-1.14) vs. 0.49 (0.28-0.83) vs. 0.35 (0.09-0.61) pg/mL; $P < 0.050$] and higher in PM when compared to DM ($P < 0.001$). In patients with DM, serum levels of IL-17A were associated with cumulative cutaneous lesions, IMACS parameters, and serum IL-6 and IFN γ levels. In patients with PM, serum IL-17A levels correlated with patients' current age, IMACS parameters and serum TNF α and IFN γ levels. Serum IL-17A level did not correlate with drug treatment. **Conclusions:** Serum levels of IL-17A are not only increased in patients with DM and patients with PM, but also associated with disease activity in patients with DM and patients with PM. The data strongly suggest IL17A as a possible biomarker of disease activity for these systemic autoimmune myopathies.

Descriptors: Biomarkers; Cytokines; Dermatomyositis; Interleukins; Myositis; Polymyositis.

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 - Características gerais de pacientes com dermatomiosite, polimiosite e indivíduos saudáveis.....	30
TABELA 2 - <i>Status</i> da doença e parâmetros laboratoriais dos pacientes com dermatomiosite, polimiosite e indivíduos saudáveis.....	32
TABELA 3 - Relação entre a concentração sérica de IL-17A e diferentes parâmetros analisados no estudo.....	34

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Diferenciação de células TCD4+	18
Figura 2 - Desenho do estudo	24
Figura 3 - Correlação de Spearman entre a concentração sérica de IL-17A e os parâmetros de atividade da doença em pacientes com polimiosite	35
Figura 4 - Correlação de Spearman entre a concentração sérica de IL-17A e os parâmetros de atividade da doença em pacientes com dermatomiosite	36

LISTA DE SIGLAS

ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
DM	Dermatomiosite
EULAR	<i>European League Against Rheumatism</i>
EVA	Escala Visual Analógica
HAQ	<i>Health Assessment Questionnaire</i>
IL	Interleucina
IMACS	<i>International Myositis Assessment & Clinical Studies Group</i>
INF	Interferon
Ly	Linfócitos
MAS	Miopatias autoimunes sistêmicas
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
MMT	<i>Manual Muscle Testing</i>
MYOACT	<i>Myositis Disease Activity Assessment Visual Analogue Scale</i>
PM	Polimiosite
<i>rho</i>	Correlação de Spearman
Th	<i>T helper</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
Tregs	<i>T regulatórias</i>

SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO	16
OBJETIVOS	21
PACIENTES E MÉTODOS	23
RESULTADOS	28
DISCUSSÃO	37
CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS	45
ANEXOS	52
CRITÉRIOS CLASSIFICATÓRIOS	53
QUESTIONÁRIOS	54
PARECER - COMITÊ DE ÉTICA LOCAL.....	58
ARTIGO PUBLICADO	61

Introdução

Dermatomiosite (DM) e polimiosite (PM) pertencem a um grupo de miopatias autoimunes sistêmicas (MAS) que acometem a musculatura estriada esquelética. São caracterizadas clinicamente pela presença de fraqueza muscular simétrica, progressiva e com predomínio na região proximal dos membros (BOHAN; PETER, 1975; DALAKAS, 2015; ORLANDI M *et al.*, 2016; BARSSOTI *et al.*, 2017).

Na DM, ocorrem ainda lesões cutâneas clássicas, tais como heliótopo e pápulas de Gottron (BOHAN; PETER, 1975; DALAKAS, 2015).

Do ponto de vista fisiopatológico, embora a presença de células inflamatórias seja característica em ambas as doenças, são observadas distintas propriedades imunológicas (celular e humoral), assim como em seus aspectos histopatológicos, sugerindo diferentes razões e mecanismos como resposta, o que leva a classificá-las em subgrupos, por exemplo, em DM e PM (ROWE *et al.*, 1983; OLSSON *et al.*, 1985; MIZUNO *et al.*, 2004).

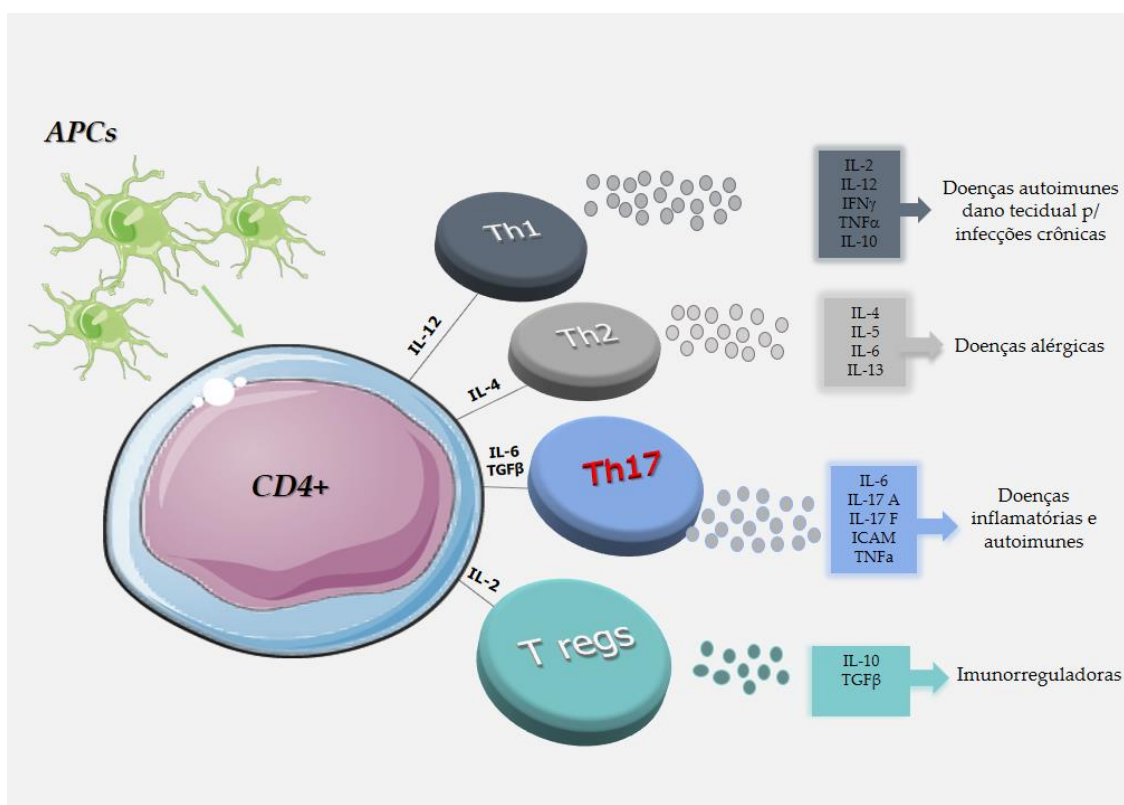
Dentre as peculiares características imunológicas que as diferem, destacam-se os linfócitos. Alguns autores sugerem que na PM ocorra uma citotoxicidade mediada por linfócitos T, com predomínio de células CD8+ (ROWE *et al.*, 1983; OLSSON *et al.*, 1985; MIZUNO *et al.*, 2004). Na DM, há maior infiltrado de células CD4+ que são associadas aos linfócitos B, especialmente na região perivascular (ROWE *et al.*, 1983; OLSSON *et al.*, 1985; MIZUNO *et al.*, 2004).

Essas células T CD4+ são expressas por linfócitos (Ly) T auxiliares e sinalizadas por moléculas presentes nas células apresentadoras de antígenos e tal interação, em conjunto com ação de algumas citocinas específicas, dará origem à novas linhagens, conhecidas como T *helper* (Th): Th1, Th2, Th17 e T-regulatórias (Tregs) (LOCKSLEY; LOUIS, 1992; LUBBERTS, 2010; TIZARD, 2008).

Essas linhagens celulares são denominadas de acordo com tipo de resposta e com a citocina que a estimula. Assim sendo, as Th1 (pró-inflamatórias) são diferenciadas pelo estímulo das IL-12, já as Th2 (anti-inflamatórias) pela presença de IL4, e as Tregs são diferenciadas especialmente por IL-2 e estão envolvidas na tolerância imunológica, e as Th17 são secretadas pela estimulação das IL-6 e TGF β (LOCKSLEY; LOUIS, 1992; LUBBERTS, 2010; TIZARD, 2008; GAFFEN, 2011) -

Figura 1.

Figura 1 - Diferenciação de células TCD4+



Legenda: Diferenciação de células TCD4+ a partir da sinalização de células apresentadoras de antígenos que darão origem às linhagens T helper: Th1, Th2, Th17 e Tregs.

Algumas citocinas têm sido associadas ao contexto imunológico e celular da inflamação tecidual, a exemplo da IL-17A, proveniente da linhagem Th17 (BAETEN, 2013). Em razão da atuação/sinalização de outras citocinas, BAETEN; KUCHROO.

(2013) e; SARKAR; FOX, (2010), a IL-17 pode promover a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, como *tumor necrosis factor* (TNF)- α , interferon (IFN)- γ e IL-6, intensificando a resposta imunológica (SARKAR; FOX, 2010; VAN DEN BERG, 2009).

Diversos estudos têm mostrado a participação da IL-17 na indução e manutenção do processo inflamatório sistêmico de diversas doenças autoimunes, a exemplo da artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, esclerose sistêmica e síndrome de Sjögren (SARKAR; FOX, 2010; VAN DEN BERG; MIOSSEC, 2009; LUBBERTS, 2010; NGUYEN *et al.*, 2008; CHIZZOLINI *et al.*, 2018; YAP; LAI, 2010; DONG, 2008).

Apesar da escassez de estudos disponíveis na literatura, a participação de IL-17 também tem sido descrita nas MAS (NOTARNICOLA *et al.*, 2015; TOURNADRE *et al.*, 2009; SHEN *et al.*, 2011; MORAN; MASTAGLIA, 2014; CHEVREL, 2003; SZODORAY *et al.*, 2010; GIRIS *et al.*, 2017; FUJIYAMA *et al.*, 2014; PAGE *et al.*, 2004; GUPTA *et al.*, 2018). De fato, do ponto de vista histológico, YIN *et al.* (2016) observaram aumento da produção de IL-17 pelas células inflamatórias presentes em tecidos musculares de pacientes com MAS e que essa produção diminuía com a instituição de tratamento medicamentoso. Já PAGE *et al.* (2004) observaram não só aumento de IL-17, mas também de IFN γ em tecidos musculares. FUJIYAMA *et al.* (2014) mostraram aumento de IL-17A em lesões cutâneas de pacientes com DM.

Do ponto de vista sistêmico, NOTARNICOLA *et al.* (2015) mostraram em pequena casuística de pacientes com MAS (10 com DM, 14 com PM e 7 com síndrome antissintetase) não apenas o aumento da concentração de IL-17 sérica, mas também a sua correlação com a duração das doenças, concentração de IL-15 sérica e apenas um dos parâmetros da atividade da doença (força muscular avaliada

pelo *Manual Muscle Testing - 8: MMT-8*). SHEN *et al.* (2011) observaram aumento de IL-17 sérica em DM e PM, porém destacadas somente na fase inicial dessas doenças (duração da doença < 1 ano), sugerindo que essa citocina esteja envolvida particularmente no estabelecimento e desenvolvimento destas doenças. Entretanto, esses últimos autores (SHEN *et al.*, 2011), não correlacionaram o nível de concentração de IL-17 sérica com possíveis parâmetros da atividade (*International Myositis Assessment & Clinical Studies Group - IMACS*) das MAS (RIDER *et al.*, 1997; MILLER *et al.*, 2001; BRUCE; FRIES, 2003; RIDER *et al.*, 2003; HARRIS-LOVE *et al.*, 2009; ISENBERG, 2004).

Sabendo da importância da ação de IL-17A como molécula envolvida nos mecanismos imunológicos de diversas doenças autoimunes, assim como nas MAS e considerando a divergência de achados e a escassez de dados na literatura, nos propomos a investigar o papel dessa IL sérica em pacientes DM e PM.

Objetivos

Primário

Avaliar a concentração de IL-17A sérica em uma amostragem representativa de pacientes com DM e PM, comparando com um grupo controle

Secundário

Correlacionar IL-17A com outras citocinas pró-inflamatórias ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ e IL-6) e aos parâmetros clínicos, laboratoriais e terapêuticos desses pacientes.

Pacientes e Métodos

Trata-se de um estudo transversal, único centro, que incluiu 112 pacientes consecutivos com MAS (80 com DM e 32 com PM definidos), segundo os critérios de Bohan e Peter, (BOHAN; PETER,1975) e mesmo que incluídos antes da atual classificação, preenchiam os novos parâmetros de *European League Against Rheumatism / American College of Rheumatology* (2017 EULAR / ACR classification criteria) (LUNDBERG *et al.*, 2017). Foram avaliados pacientes provenientes da unidade de Miopatias Inflamatórias do nosso serviço terciário, em seguimento ambulatorial, no período de 2012 a 2016.

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética local (CAAE 01445312.3.0000.0068, e todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

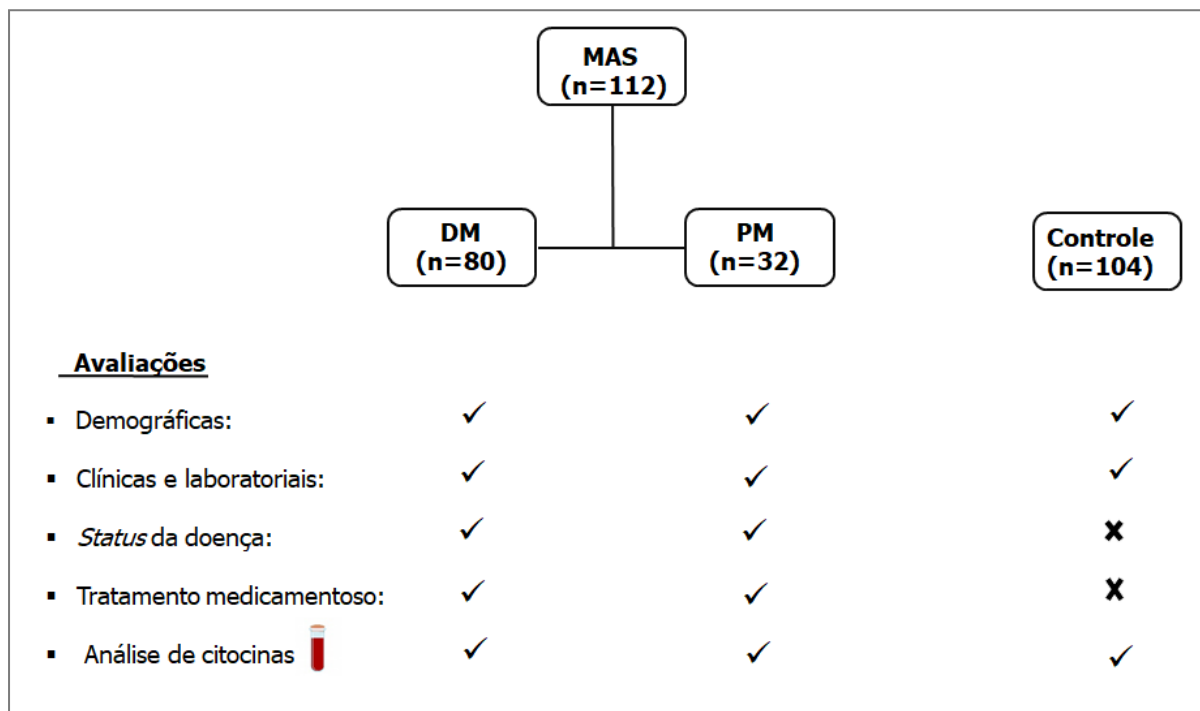


Figura 2 - Desenho do estudo

Legenda: DM: dermatomiosite; PM: polimiosite; MAS: miopatias autoimunes sistêmicas

Foram excluídos pacientes com miopatia necrosante imunomediada (autoanticorpos anti-SRP ou anti-HMGCR positivos), distrofias musculares, síndrome antissintetase (anti-Jo-1, -OJ, -EJ, -PL-7, -PL-12 positivos), DM clinicamente amiopática, miosite por corpos de inclusão, síndrome de sobreposição, miopatias associadas a neoplasias, infecções agudas ou crônicas.

Como grupo controle, 104 voluntários saudáveis, pareados por idade, sexo e etnia foram recrutados durante o mesmo período (acompanhantes dos pacientes ou funcionários do presente complexo hospitalar).

Os participantes foram submetidos a uma avaliação clínica que incluiu uma entrevista padronizada e os seguintes dados foram coletados:

- **Demográficos:** idade atual, sexo e etnia
- **Dados clínicos e laboratoriais:** idade do paciente no início da doença e o tempo de doença, manifestações clínicas cumulativas [articular (artralgia ou artrite - não erosiva e não deformante), pulmonar (achados tomográficos), cutânea (sinal/pápulas de Gottron, heliótopo, úlceras, vasculites, *rash* facial, sinal do “xale”, sinal do “V” do decote, calcinose), concentração sérica de creatinofosfoquinase (valor de referência: 26 - 192 U/L), aldolase (\leq 7,6 U/L), alanina aminotransferase ($<$ 31 U/L), aspartato aminotransferase ($<$ 31 U/L), desidrogenase láctica (135 - 214 U/L) - analisados por método cinético automatizado
- **Avaliação do *status* da doença** dos pacientes através da aplicação de questionários e escores estabelecidos pelo IMACS: Escala Visual Analógica (EVA) realizada pelo paciente e médico, *Health Assessment Questionnaire* (HAQ), MMT-8, *Myositis Disease Activity Assessment Visual Analogue Scale* (MYOACT) e concentração sérica de enzimas musculares (MILLER *et al.*, 2001;

BRUCE; FRIES, 2003; RIDER *et al.*, 2003; HARRIS-LOVE *et al.*, 2009; ISENBERG, 2004; LUNDBERG *et al.*, 2017)

- Tratamento medicamentoso: imunossupressores, imunomoduladores, imunobiológicos e glicocorticoides (doses atuais e cumulativas - nos últimos três meses).

Análise de citocinas. Para a análise da concentração sérica da IL-17, IL-6, TNF α e IFN γ , foram coletados 10 mL de sangue venoso dos participantes, após jejum de 12 horas. As amostras foram colhidas e imediatamente (< 30 minutos) centrifugadas a 3000 rpm, por 10 minutos, a 4 °C. Após processamento, o soro foi armazenado em freezer a - 80 °C.

Foram utilizados 25 μ L de soro de cada participante, onde as concentrações séricas das citocinas foram determinadas a partir de um imunoensaio contendo microesferas para análise de múltiplas proteínas, através do *kit* comercial R&D Magnetic Luminex Screening Assay (R&D Systems, Inc. - Minneapolis, MN, EUA), realizados de acordo com as especificações do fabricante.

A quantificação das citocinas foi realizada através do equipamento (Luminex 200TM, Luminex[®], MiraiBio, Alameda, CA). As concentrações das amostras foram estimadas a partir da curva padrão, utilizando o software MILLIPLEX Analyst e os níveis das citocinas foram expressos como quantidade total por sítio.

Análise estatística. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar a distribuição normal de cada parâmetro contínuo. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão para variáveis contínuas ou como frequência (%) para variáveis categóricas. A mediana (interquartil 25% - 75%) foi calculada para variáveis contínuas com distribuição não normal. Comparações entre os parâmetros dos pacientes e controles foram realizadas através do teste de *t*-Student ou teste de

Mann-Whitney para variáveis contínuas, enquanto o teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher foi utilizado para avaliar variáveis categóricas. A correlação (ρ) entre os parâmetros foi analisada por correlação de Spearman. Foram consideradas correlações fracas: valores entre 0 e $\pm 0,333$; moderadas: entre $\pm 0,333$ e $\pm 0,666$; e fortes: entre $\pm 0,666$ e $\pm 1,000$. Além disto, os valores de $P < 0,050$ foram considerados estatisticamente significantes. Todas as análises foram realizadas com o software de estatística SPSS 15.0 (Chicago, IL, EUA).

Resultados

Foram avaliados 80 pacientes com DM e 32 com PM, os quais foram comparados com 104 indivíduos saudáveis. A média de idade foi de $46,0 \pm 13,9$, $47,7 \pm 14,3$ e $43,7 \pm 11,6$ anos, respectivamente, em DM, PM e grupo controle, com predomínio de sexo feminino e de cor branca em todos os grupos (**Tabela 1**).

A mediana de duração entre o diagnóstico e o início dos sintomas foi de 6 meses para ambos os grupos (DM e PM) e a mediana de duração da doença foi de 3 e 5 anos, respectivamente, para pacientes com DM e PM.

Em relação às características clínicas e laboratoriais cumulativas, foram observadas apenas as alterações cutâneas nos pacientes com DM na seguinte ordem decrescente: sinal/pápulas de Gottron, heliótropo, *rash* facial, “V” do decote, vasculite, sinal de “xale” e úlceras.

A frequência de acometimento articular e pulmonar, assim como a concentração sérica inicial de creatinofosfoquinase foram semelhantes em pacientes com DM e PM ($P > 0,05$).

Em relação ao tratamento medicamentoso, no momento da coleta dos dados clínicos e laboratoriais, cerca da metade dos pacientes estavam utilizando prednisona, com dose mediana atual de 5 mg/dia e com a dose cumulativa nos últimos 3 meses de 450 e 250 mg, respectivamente, em pacientes com DM e PM. Além disto, aproximadamente 60% dos pacientes estavam utilizando imunossupressores.

Tabela 1 - Características gerais dos pacientes com dermatomiosite, polimiosite e indivíduos saudáveis

Parâmetros	DM (n=80)	PM (n=32)	Controle (n=104)	Valor de <i>P</i>		
				DM vs. Controle	PM vs. Controle	DM vs. PM
Idade atual (anos)	46,0±13,9	47,7±14,3	43,7±11,6	0,397	0,475	0,817
Tempo de doença (anos)	3 (0-6)	5 (2-10)	-	-	-	0,019
Tempo: diagnóstico - sintomas (meses)	6 (3-10)	6 (3-12)	-	-	-	0,337
Sexo feminino	57 (71,2)	24 (75,0)	76 (73,1)	0,868	1,000	0,817
Cor branca	55 (60,7)	17 (53,1)	58 (55,8)	0,868	0,475	0,127
Características cumulativas						
Sinal/pápulas de Gottron	76 (95,0)	0	-	-	-	-
Heliótropo	69 (86,3)	0	-	-	-	-
Rash facial	54 (67,5)	0	-	-	-	-
"V" do decote	28 (35,0)	0	-	-	-	-
Vasculite	23 (28,8)	0	-	-	-	-
Sinal de "xale"		0	-	-	-	-
Úlceras	12 (15,0)	0	-	-	-	-
Calcinose	0	0	-	-	-	-
Envolvimento articular	28 (35,0)	11 (34,4)	-	-	-	1,000
Envolvimento pulmonar	26 (32,5)	8 (25,0)	-	-	-	0,501
Creatinofosfoquinase inicial (U/L)	1297 (252-9030)	1966 (967-8966)	-	-	-	0,303
Prednisona						
Em uso atual	47 (58,8)	15 (46,9)	-	-	-	0,296
Dose atual (mg/dia)	5 (0-20)	5 (0-15)	-	-	-	0,383
Dose cumulativa: últimos 3 meses (mg)	450 (0-1800)	250 (0-1350)	-	-	-	0,384
Imunossupressores (atual)	47 (58,8)	19 (59,4)	-	-	-	1,000
Um	32 (40,0)	16 (50,0)	-	-	-	0,400
Dois	15 (16,3)	3 (9,4)	-	-	-	0,551

Dados apresentados em média desvio padrão, mediana (interquartile 25% - 75%) ou frequência (%).

Legenda: DM: dermatomiosite; PM: polimiosite.

A **Tabela 2** apresenta o *status* dos pacientes com DM e PM, com base nos critérios utilizados para avaliar a atividade da doença, no qual os valores medianos de EVA paciente e médico, HAQ, MYOACT e nível de concentração sérica de enzimas musculares foram comparáveis entre os pacientes com DM e PM, exceto pelo menor valor de MMT-8 e maior nível de creatinofosfoquinase sérico em pacientes com PM ($P < 0,050$).

As concentrações séricas da IL-17 estavam aumentadas em pacientes com DM e PM, quando comparadas as do grupo controle ($P < 0,050$), como demonstrado na **Tabela 2**. Além disto, a concentração desta IL era maior em PM do que em DM ($P = 0,001$). Em relação a outras citocinas analisadas, as concentrações séricas de IL-6, IFN γ e TNF α estavam aumentadas em pacientes com DM em relação ao grupo controle, enquanto que em PM, apenas IL-6 e TNF α estavam elevadas. Ainda, as concentrações séricas de IFN γ e TNF α eram maiores em pacientes com DM, quando comparadas de PM ($P < 0,001$).

Como análise adicional, foi realizada a análise de correlação entre a concentração sérica de IL-17A a todos os parâmetros (clínicos, laboratoriais e terapêuticos) apresentados nas **Tabelas 1 e 2**.

Tabela 2 - Status da doença e parâmetros laboratoriais dos pacientes com dermatomiosite, polimiosite e indivíduos saudáveis

Parâmetros	DM (n=80)	PM (n=32)	Controle (n=104)	Valor de P		
				DM vs. Controle	PM vs. Controle	DM vs. PM
EVA paciente (0-10 cm)	2,5 (0,0-6,0)	2,5 (1,0-6,0)	-	-	-	0,400
EVA médico (0-10 cm)	2,0 (0,0-5,0)	2,0 (0,3-5,8)	-	-	-	0,676
HAQ (0,00-3,00)	0,29 (0,00-2,00)	0,79 (0,43-1,83)	-	-	-	0,214
MMT-8 (0-80)	80 (72-80)	74 (64-80)	-	-	-	0,048
MYOACT (0-60)	0,1 (0,0-1,3)	0,2 (0,0-0,5)	-	-	-	0,321
Creatinofosfoquinase (U/L)	134 (79-352)	358 (120-567)	108 (85-144)	0,011	<0,001	0,027
Aldolase (U/L)	4,8 (4,0-6,4)	6,2 (3,6-8,4)	3,6 (2,9-4,4)	<0,001	<0,001	0,131
Desidrogenase láctica (U/L)	417 (368-502)	467 (354-544)	340 (309-389)	<0,001	<0,001	0,475
Aspartato aminotransferase (U/L)	29 (19-41)	25 (16-20)	20 (16-23)	<0,001	<0,001	0,550
Alanina aminotransferase (U/L)	25 (16-39)	25 (20-42)	17 (14-22)	<0,001	<0,001	0,240
IL-17A (pg/mL)	0,49 (0,28-0,83)	0,73 (0,53-1,14)	0,35 (0,09-0,61)	0,003	<0,001	0,001
IL-6 (pg/mL)	1,24 (0,75-2,60)	1,83 (0,91-2,94)	0,71 (0,52-0,97)	<0,001	<0,001	0,438
IFN γ (pg/mL)	0,41 (0,25-0,74)	0,33 (0,33-0,90)	0,36 (0,22-0,73)	0,019	0,064	<0,001
TNF α (pg/mL)	3,60 (2,51-5,96)	6,14 (3,83-8,60)	2,27 (1,57-5,83)	0,003	0,001	<0,001

Dados apresentados em média desvio padrão, mediana (interquartile 25% - 75%) ou frequência (%).

Legenda: DM: dermatomiosite; EVA: escala visual analógica; HAQ: *Health Assessment Questionnaire*; IFN: interferon; IL: interleucina; MMT: *Manual Muscle Testing*; MYOACT: *Myositis Disease Activity Assessment Visual Analogue Scale*; PM: polimiosite; TNF: *tumor necrosis factor*.

Todas as correlações entre IL17-A e os diversos parâmetros analisados são apresentados na **Tabela 3**.

Na **Tabela 3**, estão apresentadas apenas as correlações estatisticamente significativas entre a IL-17A e os diversos parâmetros analisados. Em pacientes com PM, a idade atual dos pacientes, MMT-8 e $TNF\alpha$ correlacionaram inversamente com a concentração sérica de IL-17A. Os demais parâmetros da atividade da doença, ou seja, EVA paciente e médico, HAQ, MYOACT (EVA sintomas constitucionais), creatinofosfoquinase, assim como a $IFN\gamma$ correlacionaram positivamente com a IL-17A sérica (**Figura 3**).

Em pacientes com DM, apenas MMT-8 correlacionou inversamente com a concentração sérica de IL-17. Os demais parâmetros [EVA paciente e médico, HAQ, MYOACT: EVA sintomas constitucionais e cutânea, manifestações clínicas cumulativas (*rash* facial, “V” do decote, sinal do “xale”), enzimas musculares, assim como as citocinas (IL-6 e $IFN\gamma$)] correlacionaram positivamente com a IL-17 sérica (**Figura 4**).

Tabela 3 - Relação entre a concentração sérica de IL-17A e diferentes parâmetros analisados no estudo

	DM		PM	
	Rho	P	Rho	P
Idade atual	-	-	-0,492	0,014
EVA paciente	0,327	0,003	0,606	0,002
EVA médico	0,325	0,003	0,600	0,002
MMT-8	-0,403	<0,001	-0,536	0,007
HAQ	0,229	0,041	0,537	0,007
MYOACT	0,375	0,001	-	-
EVA (sintomas constitucionais)	0,342	0,002	0,444	0,030
EVA (cutânea)	0,342	0,002	-	-
Manifestações clínicas cumulativas				
<i>Rash</i> facial	0,302	0,006	-	-
"V" do decote	0,262	0,019	-	-
Sinal do "xale"	0,310	0,005	-	-
Creatinofosfoquinase	0,428	<0,001	0,440	0,036
Aldolase	0,390	0,001	-	-
Alanina aminotransferase	0,227	0,049	-	-
Aspartato aminotransferase	0,399	<0,001	-	-
Desidrogenase láctica	0,474	<0,001	-	-
IL-6	0,470	<0,001	-	-
IFN γ	0,669	<0,001	0,748	<0,001
TNF α	-	-	-0,433	0,035

Legenda: DM: dermatomiosite; EVA: escala visual analógica; HAQ: *Health Assessment Questionnaire*; IFN: interferon; IL: interleucina; MMT: *Manual Muscle Testing*; MYOACT: *Myositis Disease Activity Assessment Visual Analogue Scales*; PM: polimiosite; TNF: *tumor necrosis factor*.

Apenas as correlações com $P < 0,05$ estão apresentadas na Tabela.

Figura 3 - Correlação de Spearman entre a concentração sérica de IL-17A e os parâmetros de atividade da doença em pacientes com polimiosite

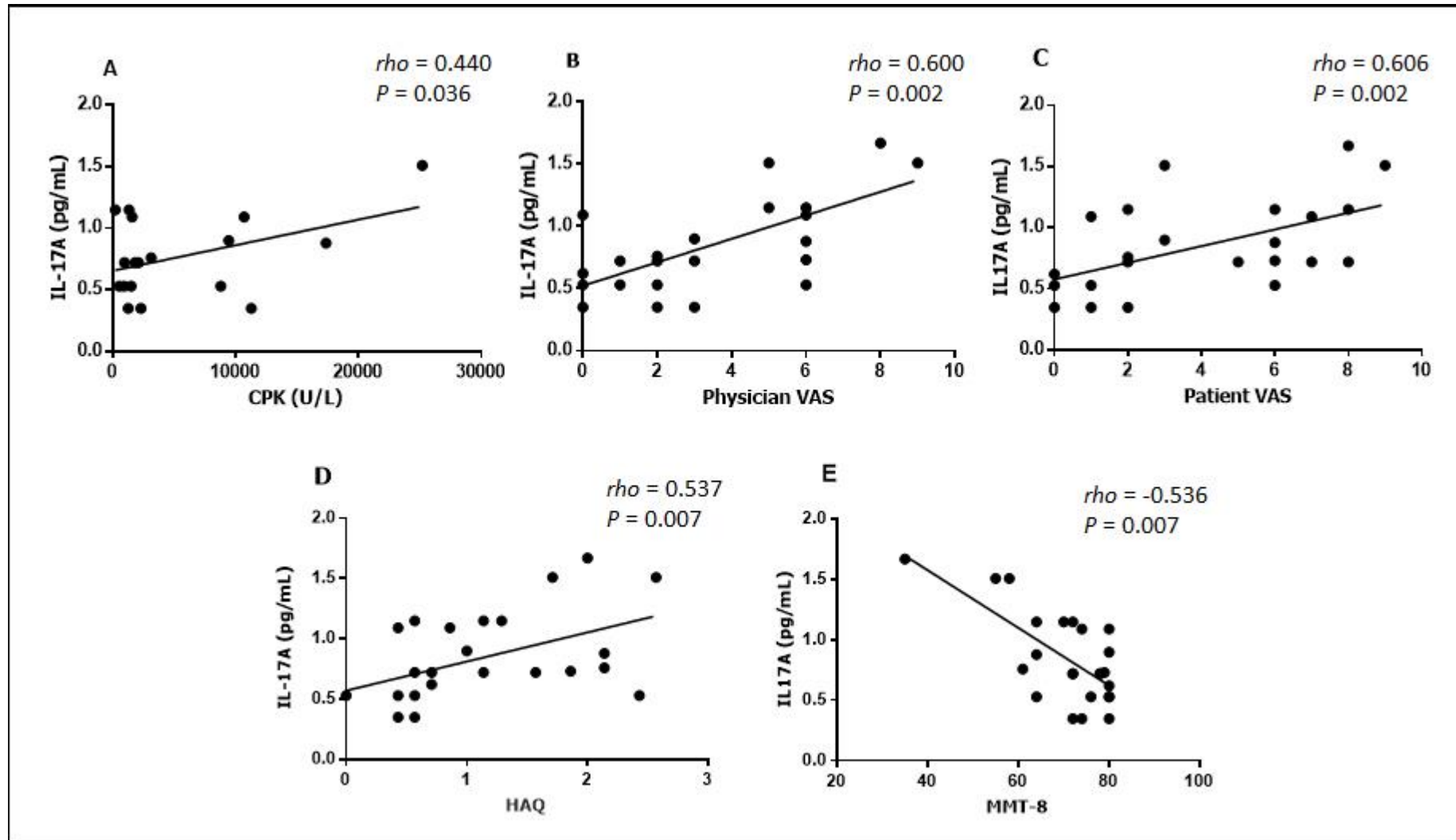
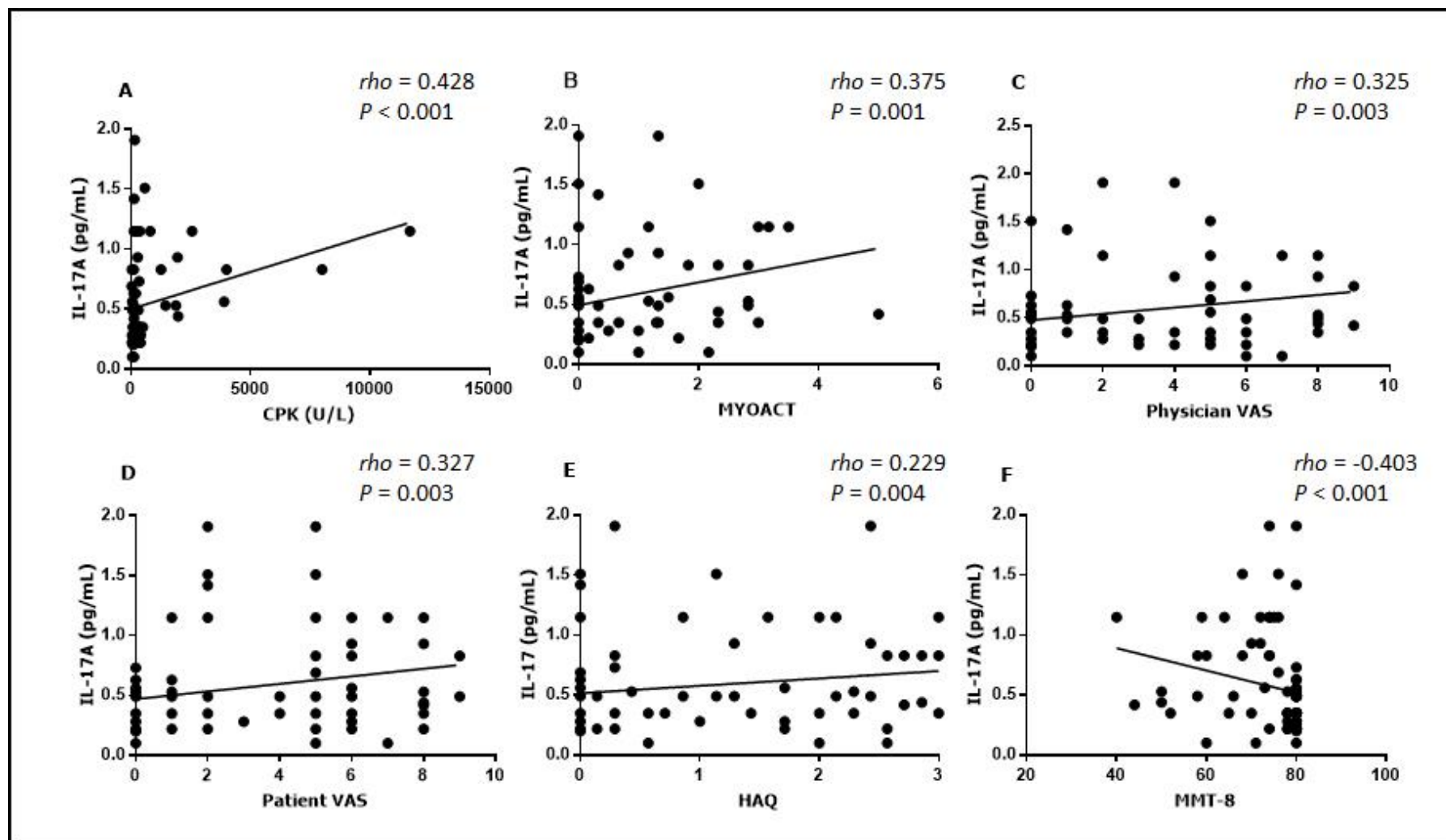


Figura 4 - Correlação de Spearman entre a concentração sérica de IL-17A e os parâmetros de atividade da doença em pacientes com dermatomiosite



Discussão

Esse é o primeiro estudo que avaliou e observou não apenas o aumento significativo da concentração IL-17A sérica, mas também a sua correlação com a atividade da DM e PM.

Embora não tenha sido avaliado nesse estudo, autores têm mostrado o aumento da produção de IL-17 também nas células inflamatórias encontradas em amostras de tecidos musculares (MORAN; MASTAGLIA *et al.*, 2014; PAGE, 2004; YIN, 2016) e cutâneos (FUJIYAMA *et al.*, 2014) de pacientes com MAS, reforçando possível envolvimento de Th17 na patogênese dessas doenças. Em contrapartida, GIRIŞ *et al.* (2017) não identificaram aumento da IL-17 em tecidos musculares de pacientes com DM, porém de IFN γ e IL-4, correlacionando-os inclusive ao quadro sistêmico dos pacientes (intensidade de fraqueza muscular).

Além da escassez, há controvérsias nos estudos apresentados até o momento. SHEN *et al.* (2011) não detectaram alterações nas concentrações de IL-17 em pacientes com DM e PM ao compararem ao grupo controle, e somente ao dividir o estudo em doença precoce e inicial, observaram uma alta concentração de IL-17 em pacientes com MAS, contudo, somente aqueles com até um ano de doença, sugerindo que essa citocina esteja envolvida, portanto, na fisiopatogênese dessas doenças. Entretanto, como limitação, SHEN *et al.*, (2011) não avaliaram especificamente os parâmetros da atividade das doenças, assim como não detalharam sobre o tratamento medicamentoso na ocasião da análise da IL-17A sérica e é importante considerar que o paciente possa estar em reativação e não se tratar de uma doença inicial, mas ainda ativa.

É importante salientar que DM e PM são doenças distintas. Portanto, houve cuidado de analisá-las separadamente. No presente estudo, os pacientes com DM e PM foram comparáveis entre si em relação aos dados demográficos, clínicos,

laboratoriais e terapêuticos. Entretanto, os pacientes com PM apresentaram maior tempo de doença, presença de fraqueza muscular mais significativa, e níveis de concentração das enzimas musculares mais elevados no início da doença. Em contrapartida, como esperado, as lesões cutâneas foram encontradas apenas em pacientes com DM.

Outro ponto importante desse estudo deve-se a inclusão significativa na amostragem de pacientes com DM e PM definidas, considerando a aplicação de critérios rigorosos de exclusão, em doenças consideradas raras. Além disto, levando em conta que os fatores demográficos possam interferir na interpretação dos resultados (GOETZL *et al.*, 2010), os pacientes foram pareados por sexo, etnia e idade a um grupo controle.

Corroborando com os nossos resultados, NOTARNICOLA *et al.*, (2015) também observaram um aumento da concentração de IL-17 sérica. Porém diferentemente dos nossos dados, esses autores analisaram a IL-17 sérica em *pool* de pacientes com MAS (PM, DM e síndrome antissintetase) de uma amostragem relativamente pequena. Os autores observaram também correlação entre o nível de IL-17 e IL-15, entretanto, relacionaram seus dados a apenas um dos parâmetros de IMACS (MMT-8), e associando estas informações ao desfecho clínico destas doenças. Ainda, os resultados apresentaram uma fraca correlação e com dados bem dispersos.

FUJIYAMA *et al.* (2014) têm relatado inclusive alterações das concentrações de IL-17 em tecido cutâneo, mas não no tecido muscular em pacientes com MAS. Entretanto, esse estudo incluiu diferentes subtipos de MAS (DM, PM, DM clinicamente amiopática) e não apresentaram informações quanto ao tratamento terapêutico utilizado na ocasião das análises.

PAGE *et al.* (2004), com o intuito inicial de avaliar o perfil das células dendríticas em MAS, também notaram aumento das concentrações de IL-17 no tecido muscular, porém avaliaram em uma casuística pequena (6 com PM, 6 com DM - comparados a 5 indivíduos saudáveis), com tempo de doença entre apenas um e 8 meses. Além disso não foram avaliados os parâmetros de atividade da doença.

A interação entre a IL-17A e outras citocinas pró-inflamatórias (por exemplo: TNF α , IFN γ e IL-6) tem sido amplamente demonstrada na literatura (SARKAR; FOX, 2010; VAN DEN BERG; MIOSSEC, 2009; LUBBERTS, 2010). De fato, observamos uma correlação forte positiva entre o nível de IL-17A sérica e o de IFN γ em pacientes com DM e PM analisados no presente estudo.

Diversos estudos têm mostrado o envolvimento da IFN γ na fisiopatogênese (sangue periférico, tecidos musculares e cutâneos) de MAS, modulando possivelmente sobre as células Th17 (tipos 1 e 2) (GIRIS *et al.*, 2017; BAECHLER *et al.*, 2011; BILGIC *et al.*, 2009; GONO *et al.*, 2014), as quais levam a produção de IL-17. Conforme mencionado anteriormente, a IL-17A, por sua vez, pode levar a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-6, TNF- α , assim como o próprio IFN γ e, conseqüentemente, perpetuando o mecanismo fisiopatogênico (SARKAR S ; FOX, 2010; LUBBERTS, 2010).

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória pleiotrófica que atua na imunidade humoral e celular (BILGIC *et al.*, 2009). No presente estudo, a IL-6 sérica estava aumentada em pacientes com DM e PM, quando comparado aos indivíduos saudáveis, corroborando com os dados da literatura (GONO *et al.*, 2014). Entretanto, a IL-6 correlacionou-se positivamente com a IL-17 sérica apenas em pacientes com DM.

TNF α , outra citocina pró-inflamatória analisada no presente estudo, estava aumentada em pacientes com DM e PM, conforme também mostrada na literatura (GONO *et al.*, 2014). Entretanto, esta citocina correlacionou inversamente com os níveis de IL-17 sérica de pacientes com PM. A TNF α atua sinergicamente com IL-17, regulando a expressão gênica inflamatória (DONG, 2008; PARK *et al.*, 2005). Essa população da linhagem Th produtora é caracterizada pela coexpressão de IL-17 e TNF α (DONG, 2008) e a ocorrência desta subclasse de citocinas parece depender do estágio e localização da doença (PARK *et al.*, 2005).

A influência do tratamento medicamentoso nas concentrações séricas de IL-17 deve ser considerada, visto que o tratamento medicamentoso de longa data ter algum efeito, diminuindo os níveis das citocinas estudadas. Entretanto, no presente estudo, os níveis de concentração de IL-17A sérica ainda assim permaneceram elevados e não houve significância estatística entre os valores aumentados em pacientes tratados ou não no momento da coleta do exame. Portanto, o estudo proposto trouxe ainda uma visão da resposta de IL-17A em relação ao tratamento medicamentoso nas MAS, sendo relevante por demonstrar que a ação dos fármacos naquele momento (corte transversal), não interferiram no perfil da IL-17A sérica.

Como limitação, devido ao desenho desse estudo, a análise das citocinas foi baseada apenas em uma medição, tornando possível a mudança do perfil ao longo da evolução da doença, sendo necessária a realização de estudos prospectivos.

Em síntese, o estudo abordou a atuação de uma importante citocina que se destaca pela atuação no processo fisiopatológico de diversas doenças autoimunes, inclusive as MAS (BAETEN; KUCHRO, 2013; SARKAR; FOX, 2010; VAN DEN BERG; MIOSSEC, 2009; LUBBERTS, 2010; NGUYEN *et al.*, 2008; CHIZZOLINI *et al.*, 2018; YAP; LAI, 2010; DONG, 2008, NOTARNICOLA *et al.*, 2015; TOURNADRE

et al., 2009; SHEN *et al.*, 2011; MORAN; MASTAGLIA *et al.*, 2014; CHEVREL *et al.*, 2003; SZODORAY *et al.*, 2010; GIRIŞ *et al.*, 2017; FUJIYAMA *et al.*, 2014; PAGE *et al.*, 2004; GUPTA *et al.*, 2018). Além disto, o estudo foi realizado em uma amostragem expressiva de pacientes com DM e PM. Os nossos dados reforçam o papel da IL-17A como possível biomarcador das MAS e, portanto, como possível alvo terapêutico.

Conclusões

A IL-17A sérica não somente está aumentada em pacientes com DM e PM, mas também correlaciona com os parâmetros de atividade dessas doenças. Nossos dados sugerem fortemente a IL-17A como biomarcador de atividade dessas MAS e, portanto, possível alvo terapêutico.

Referências

- ARSHANAPALLI, A., SHAH, M., VEERULA, V., SOMANI, A-K. The role of type I interferons and other cytokines in dermatomyositis. **Cytokine**, v. 73, n. 2, p. 319-25, 2015.
- BAECHLER, E. C., BAUER, J. W., SLATTERY, C. A., ORTMANN, W. A., ESPE, K. J., NOVITZKE, J., et al. An interferon signature in the peripheral blood of dermatomyositis patients is associated with disease activity. **Mol Med**, v. 13, n. 1-2, p. 59-68, 2007.
- BAECHLER, E. C., BILIG, H., REED, A. M. Type I interferon pathway in adult and juvenile dermatomyositis. **Arthritis Res Ther**, v. 13, n. 6, p. 249, 2011.
- BAETEN, D. L., KUCHROO, V. K. How cytokine networks fuel inflammation: Interleukin-17 and a tale of two autoimmune diseases. **Nat Med**, v. 19, p. 824-25, 2013.
- BARSSOTI, S., BRUNI, C., COMETI, L., VALENTINI, V., CIOFFI, E., NERI, R., CAVAGNA, L. One year in review 2017: idiopathic inflammatory myopathies. **Clin Exp Rheumatol**, v. 35, n. 6, p. 875-84, 2017.
- BILGIC, H., YTTERBERG, S. R., AMIN, S., MCNALLAN, K. T., WILSON, J. C., KOEUTH, T., et al. Interleukin-6 and type I interferon-regulated genes and chemokines mark disease activity in dermatomyositis. **Arthritis Rheum**, v. 60, n. 11, p. 3436-46, 2009.
- BOHAN, A., PETER, J.B. Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts). **N Engl J Med**, v. 20, n. 8, p. 403-7, 1975.
- BRUCE, B., FRIES, J. F. The Stanford Health Assessment Questionnaire: dimensions and practical applications. **Health Qual Life Outcome**, p. 1-20, 2003.
- CHEVREL, G., PAGE, G., GRANET, C., STREICHENBERGER, N., VARENNES, A., MIOSSEC, P. Interleukin-17 increases the effects of IL-1 beta on muscle cells: arguments for the role of T cells in the pathogenesis of myositis. **J Neuroimmunol**, 2003, v. 137, n. 1-2, p. 125-33, 2003.

- CHIZZOLINI, C., DUFOUR, A. M., BREMBILLA, N. C. Is there a role for IL-17 in the pathogenesis of systemic sclerosis? *Immunol Lett*, v. 195, p. 61-67, 2018.
- DALAKAS, M. C. Inflammatory muscle diseases. *N Engl J Med*, v. 373, n. 4, p. 393-4, 2015.
- DONG, C. Regulation and pro-inflammatory function of interleukin-17 family cytokines. *Immunol Rev*, v. 226, p. 80-6, 2008.
- FUJIYAMA, T., ITO, T., OGAWA, N., SUDA, T., TOKURA, Y., HASHIZUME, H. Preferential infiltration of interleukin-4-producing CXCR4+ T cells in the lesional muscle but not skin of patients with dermatomyositis. *Clin Exp Immunol*, v. 177, n. 1, p. 110-20, 2014.
- GAFFEN, S. L. Recent advances in the IL-17 cytokine family. *Curr Opin Immunol*, v. 23, p. 613-19, 2011.
- GIRIS, M., DURMUS, H., YETIMLER, B., TAŞLI, H., PARMAN, Y., TÜZÜN, E. Elevated IL-4 and IFN- γ levels in muscle tissue of patients with dermatomyositis. *In Vivo*, v. 31, n. 4, p. 657-60, 2017.
- GOETZL, E. J., HUANG, M. C., KON, J., PATEL, K., SCHWARTZ, J. B., FAST, K., FERRUCCI, L., MADARA, K., TAUB, D. D., LONGO, D. L. Gender specificity of altered human immune cytokine profiles in aging. *FASEB J*, v. 24, n. 9, p. 3580-9, 2010.
- GONO, T., KANEKO, H., KAWAGUCHI, Y., HANAOKA, M., KATAOKA, S., KUMANA, M., et al. Cytokine profiles in polymyositis and dermatomyositis complicated by rapidly progressive or chronic interstitial lung disease. *Rheumatology*, v. 53, n. 12, p. 2196-203, 2014.
- GUPTA, L., CHAURASIA, S., SRIVASTAVA, P., DWIVEDI, S., LAWRENCE, A., MISRA, R. Serum BAFF in Indian patients with IIM: a retrospective study reveals novel clinic-phenotypic associations in children and adults. *Clin Rheumatol*, v. 37, n.5, p. 1265-71, 2018.
- HARRIS-LOVE, M. O., SHRADER, J. A., KOZIOL, D., PAHLAJANI, N., JAIN, M., SMITH, M. Distribution and severity of weakness among patients with

- polymyositis, dermatomyositis, and juvenile dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford)*, v. 48, n. 2, p. 134-9, 2009.
- ISENBERG, D. A., ALLEN, E., FAREWELL, V., EHRENSTEIN, M.R., HANNA, MG., LUNDBERG, I.E., et al; International Myositis and Clinical Studies Group (IMACS). International consensus outcome measures for patients with idiopathic inflammatory myopathies. Development and initial validation of myositis activity and damage indices in patients with adult onset disease. *Rheumatology (Oxford)*, v. 43, n. 1, p. 49-54, 2004.
- LOCKSLY, R.M., LOUIS, J.A. Immunology of leishmaniasis. *Curr Opin Immunol*, v. 4, n.4, p. 413-8, 1992.
- LUBBERTS, E. Th17 cytokines and arthritis. *Semin Immunopathol*. v. 32, n. 1, p. 43-53, 2010.
- LUNDBERG, I. E., TJÄRNLUND, A., BOTTAI, M., WERTH, V. P., PILKINGTON, C., DE VISSER, M., et al; International Myositis Classification Criteria Project Consortium, the Euromyositis Register, and the Juvenile Dermatomyositis Cohort Biomarker Study and Repository (UK and Ireland). 2017 European League Against Rheumatism / American College of Rheumatology Classification Criteria for adult and juvenile idiopathic inflammatory myopathies and their major subgroups. *Arthritis Rheumatol*, v. 69, n. 12, p. 2271-82, 2017.
- MILLER, F. W., RIDER, G. L., CHUNG, Y. L., COOPER, R., DANKO, K., FAREWELL, V., et al, for the International Myositis Outcome Assessment Collaborative Study Group: Proposed preliminary core set measures for disease outcome assessment in adult and juvenile idiopathic inflammatory myopathies. *Rheumatology (Oxford)*, v. 40, n. 11, p. 1262-73, 2001.
- MIZUNO, K., YACHIE, A., NAGAOKI, S., WADA, H., OKADA, K., KAWACHI, M., et al. Oligoclonal expansion of circulating and tissue-infiltrating CD8+ T cells with killer effector phenotypes in juvenile dermatomyositis syndrome. *Clin Exp Immunol*, v.137, p. 187-94, 2004.

- MORAN, E. M., MASTAGLIA, F. L. The role of interleukin-17 in immune-mediated inflammatory myopathies and possible therapeutic implications. *Neuromuscul Disord*, v. 24, n. 11, p. 943-52, 2014.
- NGUYEN, C.Q., HU, M.H., LI, Y., STEWART, C., PECK, A.B. Salivary gland tissue expression of interleukin-23 and interleukin-17 in Sjögren's syndrome: findings in humans and mice. *Arthritis Rheum*, 58, n. 3, p. 734-43, 2008.
- NOTARNICOLA, A., LAPADULA, G., NATUZZI, D., LUNDBERG, I.E., IANNONE, F. Correlation between serum levels of IL-15 and IL-17 in patients with idiopathic inflammatory myopathies. *Scand J Rheumatol*, v.44. n.3, p. 224-8, 2015.
- OLSSON, T., HENRIKSSON, K.G., KLARESKOG, L., FORSUM, U. HLA-DR expression, T lymphocyte phenotypes, OKM1 and OKT9 reactive cells in inflammatory myopathy. *Muscle Nerve*, v. 8, n. 5, p. 419-25, 1985.
- ORLANDI, M., BARSOTTI, S., CIOFFI, E., TENTI, S., TOSCANO, C., BALDINI, C. One year in review 2016: idiopathic inflammatory myopathies. *Clin Exp Rheumatol*, v. 34, n. 6, p. 966-74, 2016.
- PAGE, G., CHEVREL, G., MIOSSEC, P. Anatomic localization of immature and mature dendritic cell subsets in dermatomyositis and polymyositis: Interaction with chemokines and Th1 cytokine-producing cells. *Arthritis Rheum*, v. 50, n. 1, p. 199-208, 2004.
- PARK, H., LI, Z., YANG, X.O., CHANG, S.H., NURIEVA, R., WANG, Y.H., et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*, v. 6, n. 11, p. 1133-41, 2005.
- RIDER, L. G., FELDMAN, B. M., PEREZ, M. D., RENNEBOHM, R.M., LINDSLEY, C. B., ZEMEL, L.S., et al., in cooperation with the Juvenile Dermatomyositis Disease Activity Collaborative Study Group: Development of validated disease activity and damage indices for the juvenile idiopathic inflammatory myopathies. I. Physician, parent, and patient global assessments. *Arthritis Rheum*, v. 40, n. 11, p. 1976-83, 1997.
- RIDER, L. G., GIANNINI, E. H., HARRIS-LOVE, M., JOE, G., ISENBERG, D., PILKINGTON, C., et al, for the International Myositis Assessment and Clinical

- Studies Group: Defining clinical improvement in adult and juvenile myositis. **J Rheumatol**, v. 30: 603-17, 2003.
- ROWE, D., ISENBERG, D. A., BEVERLEY, P. C. L. Monoclonal antibodies to immune leukocyte antigens in polymyositis and muscular dystrophy. **Clin Exp Immunol**, v. 54, p. 327-61, 1983.
- SARKAR, S., FOX, D. A. Targeting IL-17 and Th17 cells in rheumatoid arthritis. **Rheum Dis Clin North Am**, v. 36, n. 2, p. 345-66, 2010
- SHEN, H., XIA, L., LU, J., XIAO, W. Interleukin-17 and interleukin-23 in patients with polymyositis and dermatomyositis. **Scand J Rheumatol**, v.40, n. 3, p. 217-20, 2011.
- SZODORAY, P., ALEX, P., KNOWLTON, N., CENTOLA, M., DOZMOROV, I., CSIPO, I. NAGY, A. T., CONSTANTIN, T., PONYI, A., NAKKEN, B., DANKO, K., Idiopathic inflammatory myopathies, signified by distinctive peripheral cytokines, chemokines and the TNF family members B-cell activating factor and a proliferation inducing ligand. **Rheumatology (Oxford)**, v. 49, n. 10, p. 1867-77, 2010.
- TIZARD, I. R. Linfócitos T auxiliares e sua resposta aos antígenos. TIZARD, I.R. In: Imunologia veterinária – Uma introdução. Rio de Janeiro: **Ed. Elsevier**, p.143-55, 2008.
- TOURNADRE, A., PORCHEROT, M., CHÉRIN, P., MARIE, I., HACHULLA, E., MIOSSEC P. Th1 and Th17 balance in inflammatory myopathies: interaction with dendritic cells and possible link with response to high-dose immunoglobulins. **Cytokine**, v. 46, n. 3, p. 297-301, 2009.
- VAN DEN BERG, W. B., MIOSSEC, P. IL-17 as a future therapeutic target for rheumatoid arthritis. **Nat Rev Rheumatol**, v. 5, n. 10, p. 549-53, 2009.
- YAP, D. Y., LAI, K.N. Cytokines and their roles in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus: from basics to recent advances. **J Biomed Biotechnol**, 2010.
- YIN, Y., LI, F., SHI, J., LI S., CAI, J., JIANG, Y. MiR-146a Regulates inflammatory infiltration by macrophages in polymyositis/dermatomyositis by targeting TRAF6

and affecting IL-17/ICAM-1 pathway. ***Cell Physiol Biochem***, v. 40, n. 3-4, p. 486-98, 2016.

Anexos

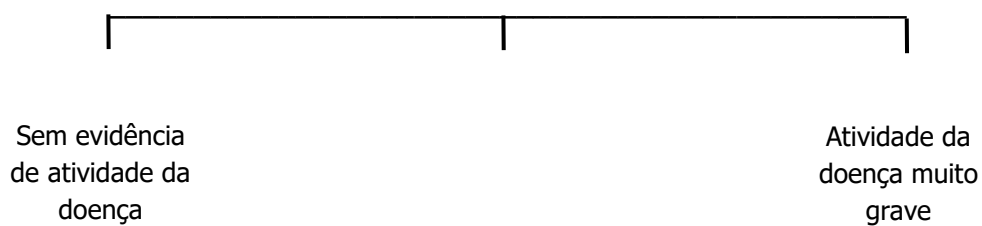
Cr terios classificat rios de miopatias autoimunes sistêmicas - *European League Against Rheumatism / American College of Rheumatology (EULAR/ACR) 2017*

VARIÁVEL	PONTUA�O	
	Sem biópsia	Com biópsia
Idade		
In�cio dos sintomas relacionados à doença 18 e < 40 anos	1,3	1,5
In�cio dos sintomas relacionados à doença > 40 anos	2,1	2,2
Fraqueza muscular		
Objetiva, simétrica, progressiva proximal MMSS	0,7	0,7
Objetiva, simétrica, progressiva proximal MMII	0,8	0,5
Manifesta�es cutâneas		
Heliótropo	3,1	3,2
Pápulas de Gottron	2,1	2,7
Sinal de Gottron	3,3	3,7
Outras manifesta�es		
Disfagia ou dismotilidade esofágica	0,7	0,6
Exames laboratoriais		
Autoanticorpo anti-Jo-1 (anti-histidil-tRNA sintetase)	0,7	0,6
Eleva�o do nível sérico de CPK, DHL, AST ou ALT	1,3	1,4
Características das biopsias musculares. Presença de:		
Infiltrado de células mononucleadas na região endomisial, circundando, entretanto, sem invasão as miofibras	-	1,7
Infiltrado de células mononucleadas na região perimisial e/ou perivascular	-	1,2
Atrofia perifascicular	-	1,9
Vacúolos subsarcolemais marginados	-	3,1

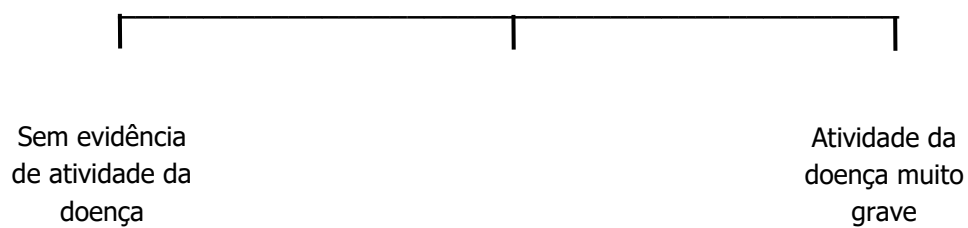
Legenda: ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; CPK: creatinofosfoquinase; DHL: desidrogenase láctica; MMII: membros inferiores; MMSS: membros superiores.

Questionários de atividade da doença
IMACS - International Myositis Assessment and Clinical Studies Group

Escala visual analógica (EVA) do paciente



Escala visual analógica (EVA) do médico



MMT (Muscle Manual Testing)-8

- Lado direito, pontuação de 0 (ausência de força muscular) à 10 (força muscular normal)

- **Valor total de 0 a 80**

Flexão cervical _____

Deltoide _____

Biceps braquial _____

Glúteo máximo _____

Glúteo médio _____

Quadríceps _____

Extensor do punho _____

Dorsiflexão plantar _____

MYOACT (Myositis Disease Activity Assessment Visual Analogue Scale)

- Nas últimas 4 semanas.

Características atribuídas a miopatia inflamatória

ATIVIDADE DA DOENÇA:

CONSTITUCIONAL	0 _____ 10
ESQUELÉTICA	0 _____ 10
GASTRINTESTINAL	0 _____ 10
PULMONAR	0 _____ 10
CARDIOVASCULAR	0 _____ 10
CUTÂNEA	0 _____ 10

HAQ (Health Assessment Questionnaire)

- Pontuação 0,00 a 3,00

Capacidade habitual **DURANTE A SEMANA PASSADA**

	Sem QUALQUER dificuldade	Com ALGUMA dificuldade	Com MUITA dificuldade	INCAPAZ
1) VESTIR-SE E ARRUMAR-SE				
- Vestir-se, inclusive amarrar os cordões dos sapatos e abotoar suas roupas?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2) LEVANTAR-SE				
3) COMER				
- Cortar um pedaço de carne?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Levar a boca um copo ou uma xícara cheia de café, leite ou água?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Abrir um saco de leite comum?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4) ANDAR				
- Caminhar em lugares planos?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Subir cinco degraus?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5) HIGIENE PESSOAL				
- Lavar e secar seu corpo após o banho?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Tomar banho de chuveiro?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Sentar-se e levantar-se de um vaso sanitário?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6) ALCANÇAR COISAS				
- Levantar os braços e pegar um objeto de aproximadamente 2,5kg que está posicionado pouco acima da cabeça?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Curvar-se para pegar suas roupas no chão?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7) AGARRAR				
- Segurar-se em pé no ônibus ou metro?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Abrir potes ou vidros de conservas que tenham sido previamente abertos?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Abrir e fechar torneiras?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8) ATIVIDADES				
- Fazer compras nas redondezas onde mora?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Entrar em e sair de um ônibus?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Realizar tarefas tais como usar a vassoura para varrer e rodo para água?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Parecer – Comitê de ética local



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Citocinas séricas e sua expressão gênica: correlação com as características clinicolaboratoriais e alterações metabólicas da dermatomiosite/polimiosite

Pesquisador: Samuel Katsuyuki Shinjo

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 5

CAAE: 01445312.3.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO
Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP
Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.425.579

Apresentação do Projeto:

Trata-se de apresentação de emenda à versão original do projeto "Citocinas séricas e sua expressão gênica: correlação com as características clínico laboratoriais e alterações metabólicas da dermatomiosite/polimiosite", com a justificativa de oficializar e informar que uma parte do presente projeto de pesquisa será apresentada na Pós-Graduação da Instituição, como tema de Doutorado da aluna: MARILDA GUIMARÃES SILVA, com título "Interleucina-17 e sua expressão gênica: correlação com as características clínico-laboratoriais da polimiosite". A aluna em questão já era uma das pesquisadoras do projeto original.

Objetivo da Pesquisa:

1. Quantificação da interleucina-17 sérica em pacientes PM
2. Avaliar os níveis de expressão gênica destas citocinas no sangue periférico e no tecido muscular
3. Correlacionar esta citocina com as características clínico-laboratoriais, alterações metabólicas e atividade da doença

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 2.425.579

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Inalterados

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo original foi previamente aprovado, tratando-se de tema relevante e de interesse clínico. A emenda atual refere-se à oficialização de projeto de doutorado da aluna MARILDA GUIMARÃES SILVA, com subprojeto cujo título é "Interleucina-17 e sua expressão gênica: correlação com as características clínico-laboratoriais da polimiosite".

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1030107_E3.pdf	27/11/2017 12:11:51		Aceito
Outros	Carta.pdf	27/11/2017 12:10:23	Samuel Katsuyuki Shinjo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.doc	27/11/2017 12:08:00	Samuel Katsuyuki Shinjo	Aceito
Brochura Pesquisa	Emenda.pdf	27/11/2017 12:07:39	Samuel Katsuyuki Shinjo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	09/02/2014 14:32:23		Aceito
Folha de Rosto	Folha de Rosto.pdf	05/04/2012 12:09:48		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Rua Ovidio Pires de Campos, 225 5º andar
 Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 2.425.579

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 08 de Dezembro de 2017

Assinado por:

ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010

UF: SP **Município:** SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Artigo Publicado

Impact Factor
3.238

Clinical and Experimental
RHEUMATOLOGY
On line

In Press Recent Issue Recent Supplement Archives Free to view
Q Search

Serum interleukin-17A level is associated with disease activity of adult patients with dermatomyositis and polymyositis

M. Silva¹, S. Oba-Shinjo², S. Marie³, S. Shinjo⁴

[Author Information](#)



CER11580

2019 Vol.37, N°4 - P1_0656, P1_0662

[Full Papers](#)

[Free to view](#) (click on article PDF icon to read the article)

Abstract

OBJECTIVES:

To assess serum interleukin (IL)-17A levels in patients with dermatomyositis (DM) and polymyositis (PM) and correlate them with the demographic, clinical, laboratory and therapeutic data of these diseases.

METHODS:

This was a cross-sectional, single-centre study that included defined DM and PM patients who were age-, gender- and ethnicity-matched to healthy individuals. Serum IL-17A analysis, as well as analysis for other cytokines (IL-6, TNF α and IFN γ), was performed by multiplex immunoassay. The disease status parameters were based on the International Myositis Assessment and Clinical Studies Group (IMACS) set scores.

RESULTS:

Eighty DM, 32 PM patients and 104 healthy individuals were enrolled. Mean age of patients with DM and PM was 46.0 and 47.7, respectively, with a predominance of women and white ethnicity in both groups. Overall, clinical, laboratory, therapeutic, and current disease status were similar among patients with DM and PM. Median serum IL-17A level was higher in patients with PM and DM than the control group (0.73 vs. 0.49 vs. 0.35 pg/mL, respectively; $p < 0.050$) and higher in PM when compared to DM ($p < 0.001$). In DM, serum IL-17A levels were associated with cumulative cutaneous lesions, IMACS parameters, and serum IL-6 and IFN γ levels. In PM, serum IL-17A levels correlated with patients' current age, IMACS parameters and serum TNF α and IFN γ levels.

CONCLUSIONS:

Serum IL-17A levels are not only increased, but also associated with disease activity in patients with DM and PM. Our data strongly suggest that IL-17A may be a biomarker of disease activity for these systemic autoimmune myopathies.

PMID: 30620283 [PubMed]

Received: 02/08/2018 - Accepted: 26/10/2018 - In Press: 20/12/2018 - Published: 27/06/2019