



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION SALVADOR
ZUBIRAN**

DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGIA Y REUMATOLOGIA

*LAS CÉLULAS CD4⁺ TH17 Y TH1 SE ENCUENTRAN ELEVADAS
EN PACIENTES CON ESCLERODERMA GENERALIZADA*

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE :
ESPECIALISTA EN REUMATOLOGÍA**

PRESENTA:

DR. LUIS DANIEL FAJARDO HERMOSILLO

ASESOR

DRA. TATIANA SOFÍA RODRÍGUEZ REYNA

MÉXICO, D.F.

AGOSTO, 2008





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. Luis Federico Uscanga Domínguez

Director de Enseñanza.

Dr. Jorge Alcocer Varela

Investigador y Profesor Titular del Curso de la Especialización en Reumatología

Dra. Tatiana Sofía Rodríguez Reyna

Investigadora y Adscrita al Departamento de Inmunología y Reumatología

Agradecimientos.

A mi tutora, la Dra. Tatiana Rodríguez, por haberme dado la oportunidad de adentrarme en el estudio de la escleroderma.

Agradezco también,

- Dra. Janette Furuzawa-Carballeda
- Dr. Javier Cabiedes-Contreras
- Dra. Mariana Díaz-Zamudio

Departamento de Inmunología y Reumatología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

- Dra. María I. Vargas-Rojas.

Departamento de Inmunobiología, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	6
II. JUSTIFICACIÓN	8
III. OBJETIVOS	8
IV. DISEÑO	8
V. PACIENTES Y MÉTODOS	9
VI. ANALISIS ESTADISTICO	11
VII. FACTORES ÉTICOS	11
VIII. RESULTADOS	12
IX. DISCUSIÓN	14
X. CONCLUSIONES	18
XI. ANEXOS	19
A. Figuras	19
B. Cuadros de resultados	25
C. Hoja de recolección de datos	29
D. Escala de severidad de Medsger	40
XII. REFERENCIAS.....	41

RESUMEN.

Objetivo. Cuantificar los subtipos de células T cooperadoras (Th) y T reguladoras (Treg) en sangre periférica de pacientes con EG.

Métodos. Se obtuvieron muestras de sangre de 97 pacientes con EG (n=8 hombres). Se realizaron evaluaciones clínicas y de involucro de órganos internos utilizando la escala de severidad de Medsger. Se tomaron muestras de controles sanos pareados por edad y sexo (n=16, 3 hombres, edad promedio=36.7±12.2 años). Se analizaron células mononucleares por citometría de flujo para determinar los subtipos Th1 (CD4⁺/IFN-γ⁺), Th2 (CD4⁺/IL-4⁺), Th17 (CD4⁺/IL-17⁺) y Treg (CD4⁺/CD25⁺/FOXP3⁺). Se clasificó a los pacientes en dos grupos (a) EG difusa (n=39; edad=43.6±13.2 años; evolución de la enfermedad=8.6±6.1 años) y (b) EG limitada (n=58; edad=48.5±14.3 años; evolución de enfermedad=10.7±9.5 años). Para el análisis estadístico se utilizaron pruebas de suma de rangos de Mann Whitney, prueba t de student y Chi cuadrada.

Resultados. El subtipo Th17 se encontró elevado 4 a 5 veces en los pacientes con EG comparado con los controles (Difusa=2.9±0.3; Limitada=3.0±0.3; vs. Controles=0.6±0.03; p=0.001). Th1 se encontró elevado de 1.5 a 1.8 veces en pacientes con EG comparado contra controles (p≤0.05). La subpoblación de Treg fue escasa pero la disminución no alcanzó significancia estadística al comparar pacientes y controles. No hubo diferencias estadísticas en cuanto a edad, tiempo de evolución o tratamiento entre grupos de pacientes con EG.

I. INTRODUCCIÓN.

La escleroderma generalizada (EG) es una enfermedad autoinmune devastadora caracterizada por vasculopatía progresiva, inflamación crónica y varios grados de fibrosis tisular (**Figura 1**).

Hay evidencia importante de la participación de las células T en la patogenia de esta enfermedad. Por ejemplo, hay infiltrados de células T en tejidos afectados de pacientes con EG. Además, las células T de pacientes con EG muestran incremento en su capacidad de adhesión a fibroblastos e incremento en expresión de LFA-1 y hay reportes de incremento de moléculas de superficie y de valores séricos de citocinas derivadas de células T en pacientes con esta enfermedad.¹⁻³ A pesar de esta evidencia, el papel de las células T en la patogenia de la EG no se entiende completamente. El paradigma tradicional de Th1/Th2 no era muy útil para explicar varios aspectos de esta enfermedad y la descripción de las células T cooperadoras 17 (Th17) y sus funciones abrió nuevas posibilidades en el estudio de la patogenia de la EG y de otras enfermedades autoinmunes (**Figura 2**).⁴

Las células Th17 son un linaje efector distinto. Su diferenciación a partir de células T precursoras es inducido por factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), interleucina-6 (IL-6), interleucina 1 (IL-1), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) e interleucina-17 (IL-17 A/F) independientemente de la participación de los transductores de señal y activadores de transcripción 1 (STAT1), STAT4,

STAT6 y T-bet. Los reguladores maestros de su programa de diferenciación son los receptores nucleares huérfanos ROR γ t y ROR α y su perfil de citocinas es IL-17 A/F, TNF- α , IL-1, IL-6 y factor estimulador de colonias de granulocitos-monocitos (**Figura 3**).⁵⁻⁷ Este perfil de citocinas es marcadamente proinflamatorio y los efectos globales de estas citocinas podrían llevar a la inflamación y extensa fibrosis que son características de la EG.

Varios autores han demostrado de manera independiente producción elevada de IL-17, TNF- α , IL-1 e IL-6 por células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con EG. Por ejemplo Kurasawa et al demostraron un incremento en la producción de IL-17 en células T de sangre periférica , en lesiones fibróticas en piel y en pulmones de pacientes con EG (**Figura 4**).⁸ Scala et al mostraron incremento de concentraciones séricas de varias sustancias incluyendo TNF- α , IL-6 y proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1) así como incremento de la producción de esas citocinas por CMSP estimuladas con fitohemaglutinina (PHA) de pacientes con EG.⁹ Otros estudios han mostrado que el bloqueo de la señalización de IL-1 en fibroblastos de pacientes con EG y en un modelo murino de fibrosis pulmonar , disminuye su producción de IL-6, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y colágena.^{10,11} Además se sabe que IL-6 induce la síntesis de colágena, glucosaminoglicanos y del inhibidor tisular de metaloproteinasa-1 (TIMP-1) *in vitro* e *in vivo*^{12,13} y que CMSP y fibroblastos tisulares de pacientes con EG sintetizan y secretan grandes cantidades de IL-6 comparadas con células de controles sanos.^{14,15} Toda esta evidencia sugiere que la escleroderma generalizada puede ser una enfermedad mediada por células Th17.¹⁶

II. JUSTIFICACIÓN.

Ante el panorama previamente expuesto en la introducción, hay datos que sugieren participación de las células TH17 en la EG. Este es el primer reporte del análisis de subpoblaciones de células T CD4⁺ en pacientes con EG y su correlación con subtipos clínicos y daño de órganos blanco.

III. OBJETIVOS.

A. General.

- Cuantificar los subtipos de células T cooperadoras (Th) y T reguladoras (Treg) en sangre periférica de pacientes con EG.

B. Particular.

- Correlacionar las subpoblaciones de células T CD4⁺ con subtipos clínicos y de daño a órganos blanco en EG.

IV. DISEÑO DE ESTUDIO.

Se trata de un estudio transversal, observacional de casos y controles.

V. PACIENTES Y MÉTODOS.

Pacientes.

Se reclutaron 97 pacientes consecutivos de la clínica de escleroderma de nuestro Instituto. Todos los pacientes tienen diagnóstico clínico de escleroderma generalizada¹⁷ y fueron evaluados por 2 reumatólogos, 1 de ellos, encargado de la clínica de escleroderma.

Se realizó evaluación clínica al entrar al estudio, se les clasificó en subtipos clínicos de escleroderma: escleroderma difusa (EGd) si había afección arriba de los codos o rodillas o que incluyera tórax y/o abdomen y escleroderma limitada (EGI) si había sólo afección distal a codos y rodillas y sin afección de tórax o abdomen. La afección a órganos internos se realizó según la escala de severidad de Medsger que incluye parámetros clínicos, estudios de laboratorio y paraclínicos (**Anexo D**).¹⁸

Procedimientos.

Se tomaron muestras de 20 ml de sangre venosa periférica para determinar anticuerpos antinucleares (AAN), anticuerpos específicos de escleroderma (anticentrómero, anti topoisomerasa I y anti U1-RNP) y subpoblaciones de células T CD4⁺ (Th1, Th2, Th17, Treg). También evaluamos las subpoblaciones de células T en 16 controles pareados por edad y sexo.

Anticuerpos antinucleares. Se detectaron anticuerpos antinucleares del isotipo IgG por inmunofluorescencia indirecta (IFI) usando como sustrato la línea celular HEp-2 de acuerdo a las recomendaciones del fabricante [The Binding site (UK)]. Las muestras de suero se diluyeron 1:40. Todas las muestras fueron leídas por tres expertos y los resultados se discutieron y registraron.

Autoanticuerpos específicos. Se detectaron los anticuerpos Anti-Topoisomerasa-I, anti-centómero y anti-RNP de isotipo IgG por ensayo inmunoenzimático (EIA) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante [The Binding Site (UK)]. Las muestras de suero se diluyeron 1:100. Los valores séricos de corte para cada anticuerpo se fijaron arriba de la percentila 90 de un grupo control separado de 100 individuos sanos.

Aislamiento de CMSP. Se obtuvieron 10 ml de sangre venosa periférica de cada sujeto. Las CMSP se obtuvieron por centrifugación por gradientes con Lymphoprep (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Noruega).

Subtipos de células T CD4⁺. Se marcaron CMSP (1×10^6) con anticuerpo monoclonal FITC: CD4-FITC (BD Biosciences, Le Pont de Claix, Francia) para células T, en tubos separados, a temperatura ambiente, en la oscuridad por 20 min. Después de dos lavados, las CMSP se permeabilizaron con 200 μ l de solución cytofix/cytoperm (BD Biosciences) a 4°C por 30 min. Después de dos

lavados con solución permwash (BD Biosciences), las CMSP se tiñeron con anti-IFN- γ marcado con PE (para Th1), anti-IL-4 marcado con PE (para Th2), anti-IL17 marcado con PE (para Th17) or anti-FOXP3 marcado con PE (para Treg) por 20 min a 4°C en la oscuridad. Finalmente, después de lavar con solución permwash, se analizaron los subtipos de CMSP por citometría de flujo en un citómetro FACSCan (BD Biosciences). Se utilizó el programa CellQuest Pro™ (BD Biosciences). Se registraron en total 10^4 eventos para cada muestra (**Figura 5**).

VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se realizó con t de student para variables continuas, Chi cuadrada para comparar frecuencias y prueba de suma de rangos de Mann-Whitney para comparar subtipos de células T.

VII. FACTORES ÉTICOS.

Todos dieron consentimiento informado para participar en este estudio el cual ha sido aprobado por el Comité Institucional de Investigación Biomédica en Humanos.

VIII. RESULTADOS.

Las características demográficas, clínicas y serológicas se resumen en el **cuadro 1**. Todos los pacientes y sus ancestros de 2 o más generaciones atrás son Mexicanos. La edad promedio de nuestros pacientes en el momento de su evaluación fue 46.5 años, la edad media al inicio de la enfermedad fue 36.4 años, la media de tiempo de evolución de la EG fue 10 años, 92% son mujeres, 60% tienen escleroderma limitada y 40% difusa. Respecto al involucro a órganos, 97% de los pacientes tienen fenómeno de Raynaud, 67% tienen involucro articular, 21% afección muscular, 65% han tenido alteraciones gastrointestinales, 35% fibrosis pulmonar, 17% hipertensión arterial pulmonar; el daño cardíaco se evidenció en 7% pero sólo había resultado de ecocardiograma disponible para 45 pacientes, finalmente, 2% de los pacientes habían tenido crisis renales. La afección muscular fue más común en pacientes con EGI ($p=0.04$) y la afección gastrointestinal y la fibrosis pulmonar fueron más comunes en pacientes con EGd ($p=0.01$ y $p=0.01$, respectivamente).

Respecto a los autoanticuerpos, 97% de los pacientes tienen AAN positivos, los anti U1-RNP y anticentrómero fueron más comunes en pacientes con EGI ($p=0.01$ y $p=0.04$, respectivamente) mientras que anti-topoisomerasa I fue más común en EGd ($p=0.002$).

Caracterización fenotípica de subtipos de células TCD4⁺ Th y Treg. Los porcentajes de subtipos de células T CD4⁺ se detallan en el **cuadro 2** y la **Figura 6**. Los resultados muestran que el subtipo Th17 se encuentra elevado 4 a 5 veces en pacientes con EGd y EGI comparado con los controles, diferencia que es estadísticamente significativa (EGd = 2.9 ± 0.3 ; EGI = 3.0 ± 0.3 ; vs. controles = 0.6 ± 0.03 ; p = 0.001). Mientras tanto, el subtipo Th1 se encuentra elevado 1.5 a 1.8 veces en todos los pacientes con EG comparado con los controles (EGd = 1.8 ± 0.2 ; EGI = 1.5 ± 0.2 ; vs. controles = 0.9 ± 0.06 ; p = 0.009 y p = 0.049, respectivamente). La subpoblación de Treg fue escasa en los pacientes con EG aunque la disminución no alcanzó diferencia estadística al compararla con los controles (EGd = 2.7 ± 0.2 ; EGI = 2.7 ± 0.2 ; vs. controles = 3.4 ± 0.08). El subtipo Th2 se encontró disminuido en pacientes con EGI comparado con los pacientes con EGd y controles (EGI = 1.4 ± 0.1 vs. EGd = 1.8 ± 0.2 o controles = 1.7 ± 0.1 ; p = 0.047).

No hubieron diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de subtipos de células T CD4⁺ por sexo, edad al inicio de la enfermedad, edad en el momento de la evaluación, tiempo de evolución de la enfermedad, subtipo de enfermedad, afección a órganos o tratamiento recibido en el momento de la evaluación ó toma de muestra.

IX. DISCUSIÓN.

En este estudio se muestra que las células Th17 están aumentadas en CMSP de pacientes con EG comparada con controles, sin importar el subtipo de la enfermedad, el tiempo de evolución de la misma, el daño a órganos y el tratamiento recibido en el momento de la evaluación. Estos resultados sugieren que las células Th17 tienen un papel patogénico en esta enfermedad y que su participación no se limita a fases iniciales o a ciertos subtipos de la enfermedad.

La presencia de proporciones elevadas de células Th17 en CMSP de estos pacientes puede llevar al incremento en la producción de IL-17, TNF- α , IL-1 e IL-6. Los efectos biológicos de estas citocinas podrían explicar muchos de los cambios proinflamatorios y profibróticos que ocurren en pacientes con EG. Se sabe que en pacientes con EG la IL-17 facilita la proliferación de fibroblastos e induce la expresión de moléculas de adhesión y la producción de IL-1 en células endoteliales de manera dosis-dependiente *in vitro*.⁸ Además, IL-1 es una potente citocina proinflamatoria que induce la producción de IL-6 y de PDGF en fibroblastos sanos y de pacientes con EG.¹⁹ Se sabe que los fibroblastos de lesiones de EG producen constitutivamente IL-1 y hay evidencia de niveles elevados de receptores para IL-1 en pacientes con EG²⁰ y de cantidades elevadas de IL-1 en CMSP de estos pacientes.²¹ Por otro lado, IL-6 induce síntesis de colágena, glucosaminoglicanos y TIMP-1 en fibroblastos normales.^{12,13} Además, se han encontrado niveles elevados de esta citocina en

pacientes con EG y se han correlacionado con la severidad del daño cutáneo^{22,23} y otros estudios muestran que las CMSP y los fibroblastos de tejidos de pacientes con EG muestran incremento en la síntesis y de la secreción *in vitro* de IL-6 comparadas con células de sujetos normales.^{14,15} Por otro lado, TNF- α es una potente citocina proinflamatoria que se ha encontrado elevada en suero y en sobrenadantes de CMSP estimuladas con PHA de pacientes con EG⁹ y en muestras liofilizadas de lavado bronquioalveolar de pacientes con EG.²⁴ Algunos autores han encontrado niveles particularmente altos de esta citocina en pacientes con EG y fibrosis pulmonar.²⁵ Adicionalmente, estas citocinas inducen la diferenciación de células Th17 desde precursores indiferenciados con un mecanismo de retroalimentación positiva.⁵

También encontramos que la subpoblación de células Treg está ligeramente disminuida en estos pacientes. Las células T reguladoras tienen propiedades inmunoregulatoras importantes, particularmente en el mantenimiento de la tolerancia, y se han encontrado disminuidas o disfuncionales en varias enfermedades autoinmunes incluyendo lupus eritematoso generalizado, modelos murinos de artritis y artritis reumatoide, entre otras. También tienen un papel patogénico en la respuesta inmune contra infecciones, neoplasias y órganos trasplantados.⁴ Este es el primer reporte que muestra una tendencia a la disminución del porcentaje de estas células en pacientes con EG. Pensamos que esta anomalía puede participar en los fenómenos autoinmunes que ocurren en esta enfermedad. Hay dos estudios

previos que habían mostrado incremento en el número de células CD4⁺CD25⁺ en pacientes con EG, particularmente en fases tempranas de la enfermedad,^{26,27} sin embargo, no se había analizado el daño a órganos internos ni se había determinado FOXP3. Nosotros analizamos el porcentaje de células T reguladoras y su correlación con diferentes subtipos de la enfermedad, tiempo de evolución y daño a órganos internos y no encontramos diferencias. De hecho, es posible que tanto el número como la función de las células T reguladoras se encuentren alterados en EG y en otras enfermedades autoinmunes. Sin embargo se necesitan estudios adicionales para definir esto.

También encontramos incremento leve de las células Th1 en ambos subgrupos de pacientes con EG comparado con los controles y ligero incremento de células Th2 en pacientes con EGd comparado con los controles. Las células Th1 podrían ser responsables por el estado de inflamación crónica presente en EG, podría ser particularmente relevante en fases tempranas de la enfermedad y también podría reflejar activación constante y policlonal de células T en un ambiente de inflamación crónica.

Una de las fortalezas de este estudio es la posibilidad de analizar los subgrupos de células T CD4⁺ en un número razonable de pacientes con diferentes subtipos clínicos y serológicos de EG y comparar nuestros resultados entre dichos grupos. Esto nos permite afirmar que estas alteraciones están presentes en todos los subtipos de EG y que, aunque hay ligeras diferencias

entre los grupos de EGd y EGI, las anomalías de los porcentajes de células T CD4⁺ son características de esta enfermedad y no sólo de cierto subgrupo de pacientes. Esto es relevante porque la EG es más bien un grupo de enfermedades con participación de mecanismos patogénicos distintos de acuerdo a la extensión del daño cutáneo y el tiempo de evolución. El análisis de subgrupos de células T CD4⁺ de acuerdo a daño a órganos no reveló diferencias pero es necesario realizar estudios adicionales para determinar la participación de estas células en tejidos específicos; además, algunas de las complicaciones como las cardíacas y renales sólo se encontraron en un número pequeño de pacientes, lo cual nos impide sacar conclusiones adicionales al respecto.

X. CONCLUSIONES.

En conclusión los pacientes con escleroderma generalizada tienen incremento en el porcentaje de células Th17 y Th1 y ligera disminución en el porcentaje de células T reguladoras. Estas alteraciones pueden verse como un desequilibrio de la respuesta inmune que lleva a inflamación crónica, fibrosis y que favorecen la autoinmunidad, todos ellos, aspectos importantes en esta enfermedad .

Estudios adicionales sobre la patogenia de la EG deben enfocarse en el análisis funcional de los subgrupos de células TCD4⁺, y sus efectos en células y tejidos afectados tales como fibroblastos de piel y pulmón y células endoteliales. También debe estudiarse el papel de citocinas clave tales como IL-23 que participa en el mantenimiento de las células Th17, y TGF- β que influye el desarrollo y mantenimiento de las células T reguladoras y el compromiso de células T indiferenciadas para diferenciarse a células Th17.

XI. ANEXOS .

A. FIGURAS.

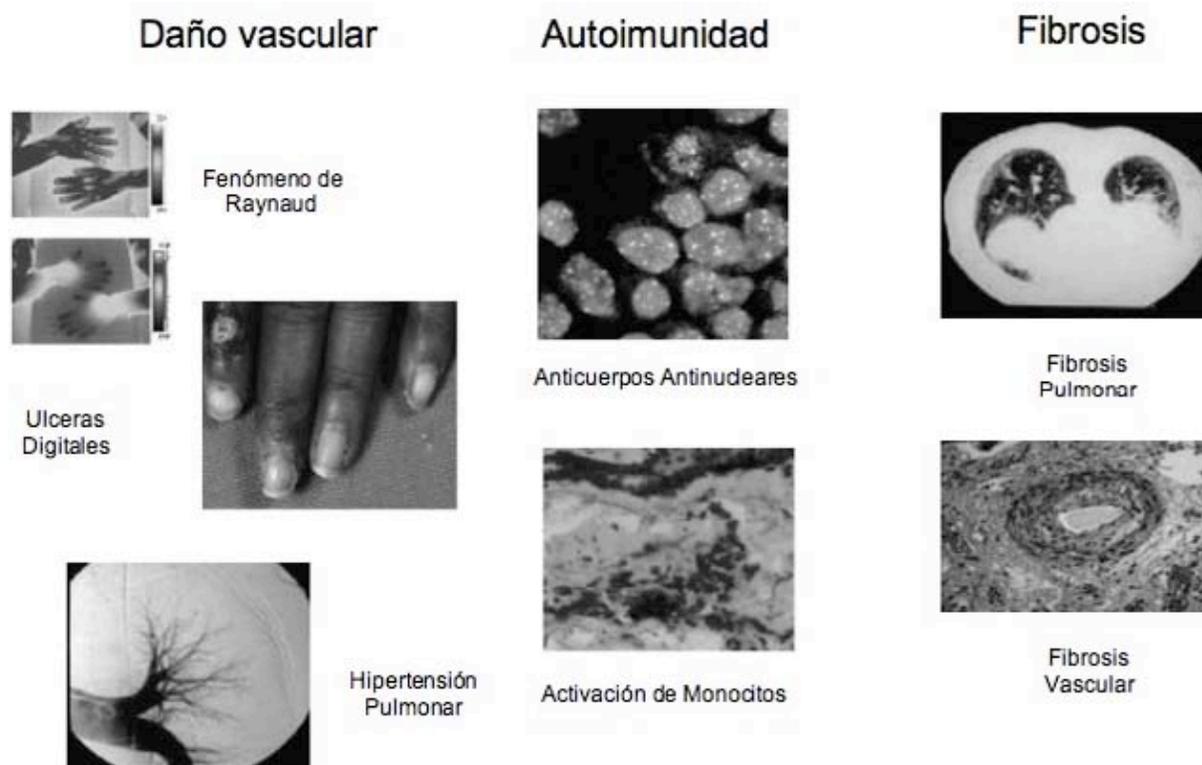


Figura 1. La escleroderma es una enfermedad caracterizada por daño vascular, autoinmunidad y fibrosis.

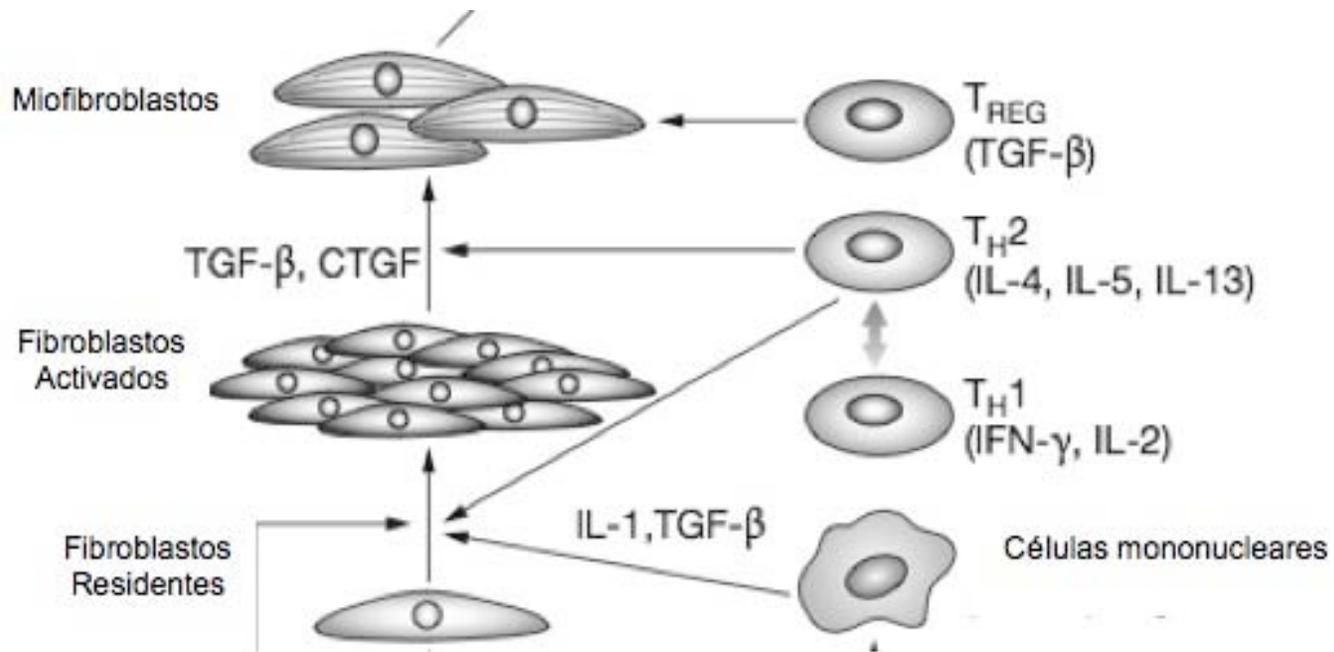


Figura 2. El paradigma tradicional de Th1/Th2 no era muy útil para explicar varios aspectos de esta enfermedad.

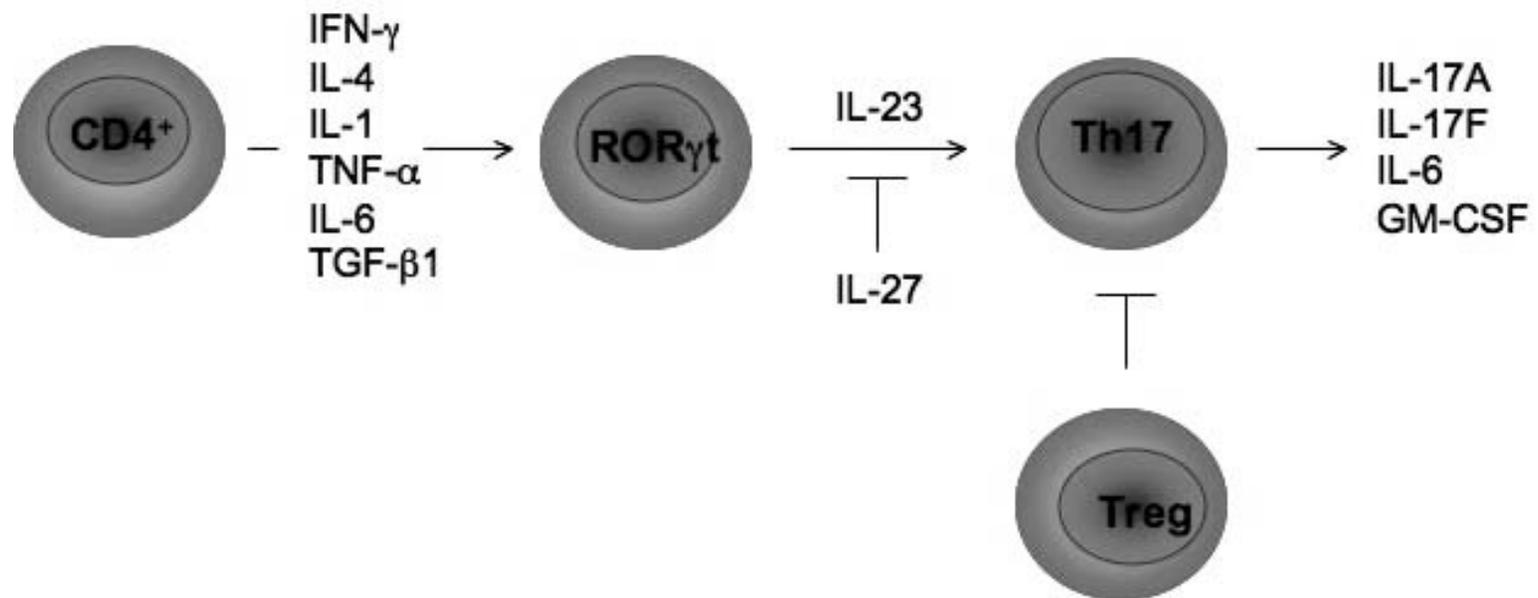


Figura 3. Las células Th17. Precusores, diferenciación, expansión y perfil de citocinas producidas.

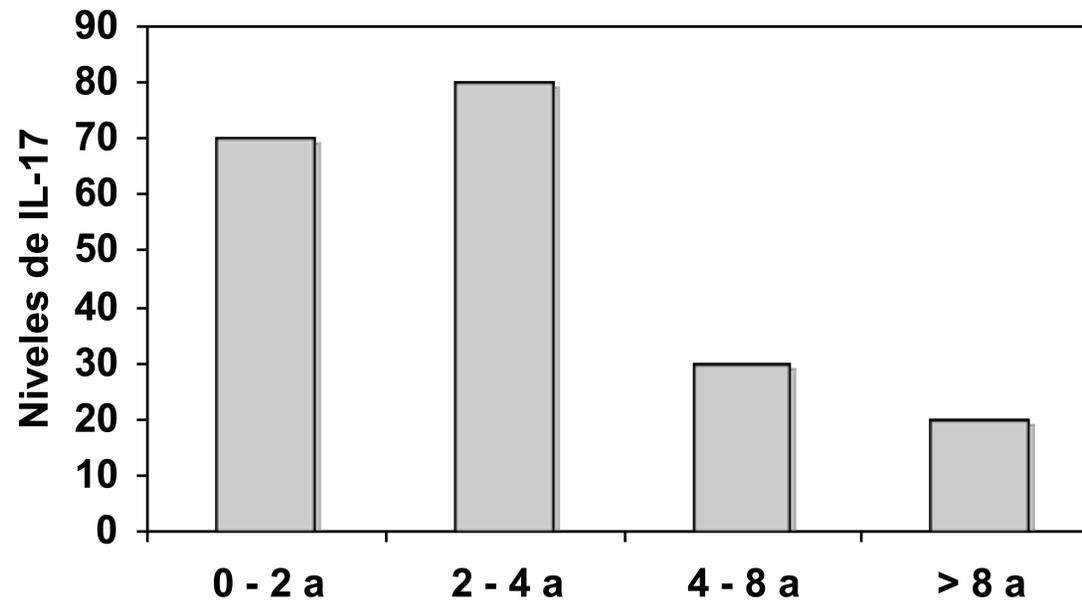


Figura 4. Kurasawa et al , demostraron un incremento en la producción de IL-17 en células T de sangre periférica ,en lesiones fibróticas en piel y en pulmones de pacientes con EG, siendo mayor en etapas tempranas de la enfermedad.

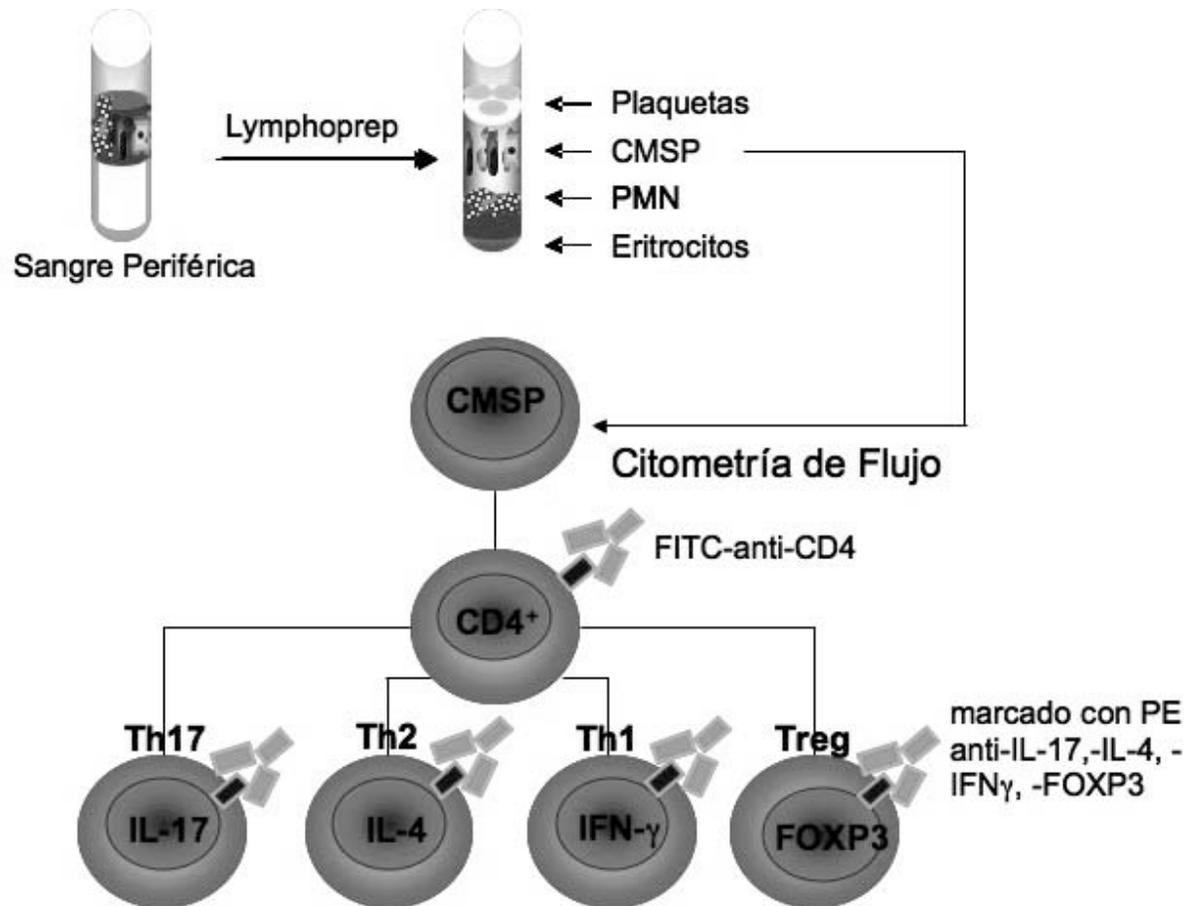


Figura 5. Aislamiento de CMSP y Subtipos de células T CD4⁺.

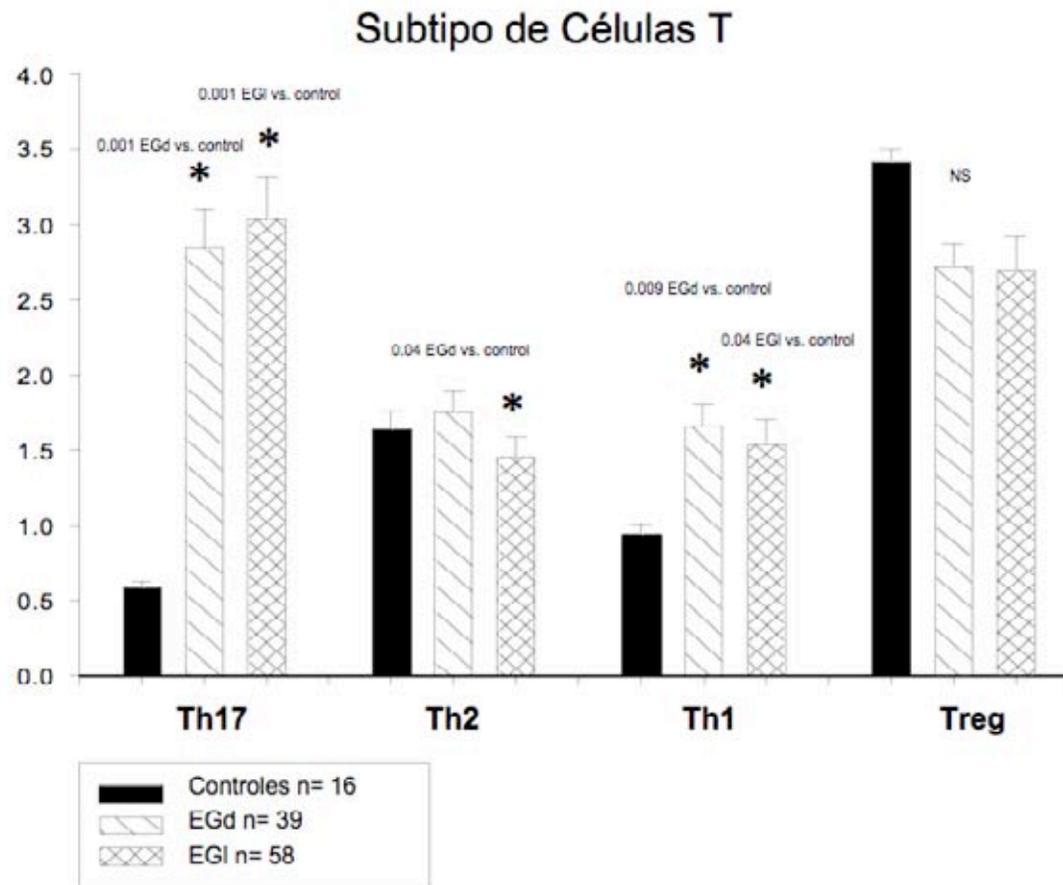


Figura 6. Promedios de porcentajes de células Th1, Th2, Th17 y Treg en pacientes con escleroderma generalizada y controles. *Los valores de p son las diferencias entre los pacientes y los controles.

XI. ANEXOS .

B. Cuadros de resultados

Cuadro 1. Características demográficas de los pacientes con EG.

	Todos los pacientes (%)	EG difusa (%)	EG limitada (%)	Valor p
Datos demográficos				
Número	97	39 (40)	58 (60)	-
Mujeres	89 (92)	34 (85)	55 (95)	NS
Edad promedio de inicio (años)	36	35	37	NS
Promedio de evolución (años)	10	8.6	11	NS

Cuadro 1. Características clínicas de los pacientes con EG (Continuación).

	Todos los pacientes (%)	EG difusa (%)	EG limitada (%)	Valor p
Daño a órganos				
Vascular	94 (97)	38 (97)	56 (97)	NS
Articulaciones	65 (67)	26 (67)	39 (67)	NS
Músculo	20 (21)	4 (10)	16 (28)	0.04
Gastrointestinal	63 (65)	31 (80)	32 (55)	0.01
Fibrosis pulmonar	34 (35)	18 (46)	16 (28)	0.01
Hipertensión arterial pulmonar	16 (16)	4 (10)	12 (21)	NS
Corazón	7/45* (7)	5/13* (13)	2/32* (3)	NS
Riñones	2 (2)	0	2 (3)	NS

*El denominador indica el número de pacientes con ecocardiograma disponible en los 6 meses previos a su evaluación.

Cuadro 1. Características serológicas de los pacientes con EG (Continuación).

	Todos los pacientes (%)	EG difusa (%)	EG limitada (%)	Valor p
Anticuerpos				
Anticentrómero	29 (30)	6 (15)	23 (40)	0.01
Anti-topoisomerasa	16 (16)	12 (31)	4 (7)	0.002
Anti U1-RNP	11 (11)	1 (3)	10 (17)	0.04
Sólo AAN positivos	35 (36)	16 (41)	19 (33)	NS
AAN negativos	2 (2)	1 (3)	1 (2)	NS
Valor perdido	4 (4)	3 (8)	1 (2)	NS

Cuadro 2. Promedio de porcentajes de células Th1, Th2, Th17 y Treg en pacientes con escleroderma generalizada y controles.

Subtipo de células T CD4 ⁺	Promedio de porcentaje de células T CD4 ⁺ (%)				Valor p
	Todos los pacientes	EGd*	EGI*	Controles	
Th1	1.57	1.66	1.50	0.94	0.009 EGd vs. control 0.04 EGI vs. control
Th2	1.55	1.74	1.42	1.63	0.04 EGd vs. control
Th17	2.91	2.84	2.95	0.59	0.001 EGd vs. control 0.001 EGI vs. control
Treg	2.66	2.71	2.63	3.41	NS

*EGd= Escleroderma generalizada difusa; EGI= Escleroderma generalizada limitada.

**C. HOJA DE RECOLECCION DE DATOS.
FORMA DE HISTORIA CLINICA. PRIMERA VEZ. PACIENTES CON ESCLERODERMA**

Registro _____ # Protocolo _____ Fecha _____ Lugar: Hospital
 Clasificación TS _____ Consulta

Apellidos _____ Nombres _____
 Dirección _____ Col _____
 Municipio _____ Ciudad _____ Estado _____ CP _____
 Tel _____

Sexo (M/F) _____ Fecha de nacimiento (dd/mm/aaaa) _____ Lugar nacimiento _____

1º síntoma _____ Fecha 1º síntoma (mm/aaaa) _____
 Fecha diagnóstico (mm/aaaa) _____

1º diagnóstico INCMYNSZ _____ Fecha (dd/mm/aaaa) _____

Encerrar en un círculo:

- Escleroderma generalizada: 5.1-definitiva, 5.0-probable.
- Subtipo de escleroderma: (0)-sin clasificar, (1) cutánea difusa, (3) cutánea limitada o sine escleroderma
- Sobreposición: LEG, AR, DM/PM, EMTC, SS
- Raynaud: primario, secundario a enfermedad autoinmune
- Miopatía inflamatoria idiopática: polimiositis definitiva, polimiositis probable, dermatomiositis definitiva, dermatomiositis probable, PM asociada con neoplasia, DM asociada con neoplasia, miositis de cuerpos de inclusión, miopatía no clasificada.
- Síndrome de Sjögren: Definitivo, probable
- Enfermedad indiferenciada del tejido conectivo
- Desconocido -Otro _____

Fecha de inicio de involucro por órganos y sistemas

Órgano	Mes	Año	Observaciones
Vascular periférico (Raynaud)	_____	_____	
Piel	_____	_____	
Articulaciones	_____	_____	
Músculo	_____	_____	
Tracto GI	_____	_____	
Pulmón			
a) Fibrosis	_____	_____	
b) HAP 1ª	_____	_____	
c) HAP 2ª	_____	_____	
Corazón			
a) Insuficiencia cardíaca izq/der	_____	_____	
b) Pericarditis	_____	_____	
c) Miocarditis	_____	_____	
d) Arritmias que requieran tratamiento	_____	_____	
Riñón			
a) Crisis renal	_____	_____	
b) Otro	_____	_____	
Serología	_____	_____	
Cáncer	_____	_____	

CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS

Estado civil: (1) Soltero, (2) Casado (nombre cónyuge _____), (3) Divorciado, (5) Viudo

Grupo étnico: (1) Mestizo, (2) Indígena, (3) Caucásico, (4) Negro, (5) Asiático, (6) Otro _____

Escolaridad: _____ Ocupación: _____

Familiar contacto: _____ Relación: _____ Tel _____

Dirección: _____

Médico que refiere _____ Tel _____

HISTORIA

	Presente (hoy o ≤1mes)	Previa (hace >1mes)	Observaciones
+ Respuesta positiva			
0 Respuesta negativa			
Blanco si se desconoce o no se realizó			
* Requiere un número			

General

Fatiga 1= leve 3= limita actividades _____

Fiebre 1= 2= 3= _____

Disfonía (por debilidad muscular) _____

Ojos secos _____

Boca seca _____

Síndrome sicca (a juicio del médico) _____

Vascular periférico

Fenómeno de Raynaud _____

Amputación de extremidad superior _____

Amputación de extremidad inferior _____

Trombosis 1. Arterial (localización) _____

2. Venosa (localización) _____

Síndrome antifosfolípido _____

Piel

Fotosensibilidad _____

Músculos/articulaciones

Rigidez matutina (especificar horas) _____

Artralgias inflamatorias _____

Inflamación articular (localización) _____

Síndrome de túnel del carpo _____

Mialgias _____

Debilidad muscular proximal _____

1. Leve, 2. Limita actividades, 3. Incapacitante

Debilidad muscular distal _____

Tracto gastrointestinal

Disfagia proximal (disfunción de músculos faríngeos) _____

Disfagia distal _____

Reflujo _____

Distensión abdominal postprandial _____

Dolor abdominal. 1. Leve, 2. Limita alimentación _____

Pseudoobstrucción (juicio clínico de historia) _____

Estómago de sandía _____
 Estenosis esofágica _____
 Síndrome de absorción intestinal deficiente (juicio
 Clínico de historia) _____
 Hipomotilidad rectal _____
 1. Constipación, 2. Incontinencia, 3. Prolapso
 Ictericia _____

Pulmón

Dolor pleurítico _____
 Disnea 1. Con esfuerzos moderados _____
 2. Con esfuerzos leves _____
 3. En reposo _____
 Hipertensión arterial pulmonar _____
 1. Primaria (diagnóstico clínico y/o ecocardiograma)
 2. Primaria (cateterismo)
 3. Secundaria a fibrosis pulmonar o cardiopatía (clínico, ecocardiograma y/o cateterismo)
 Uso de oxígeno suplementario _____

Corazón

Dolor pericárdico _____
 Insuficiencia cardíaca congestiva _____
 1. Izquierda o global
 2. Derecha
 Arritmia que requiera tratamiento (especifique) _____

Sistema nervioso

Accidente vascular cerebral _____
 1. Isquemia cerebral transitoria
 2. AVC
 Neuropatía del trigémino _____
 Disfunción eréctil _____

TRATAMIENTO

Nombre del medicamento	Dosis prescrita En esta visita	Pasado Dosis máxima	Fechas de inicio-suspensión
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____

EFFECTOS ADVERSOS DE LOS MEDICAMENTOS

Nombre del medicamento	Efecto adverso	Gravedad 1. leve (interrupción) 2. Suspendido	Fecha de suspensión	Dosis al suspenderlo
_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____

ANTECEDENTES PERSONALES

Enfermedades	Presente	Pasado (fecha dx)	Observaciones
Enfermedad tiroidea 1. Hipo 2. Hiper 3. Bocio eutiroideo 4. Graves 5. Hashimoto 6. Otro _____	_____	_____	
Neoplasia maligna (localización, estirpe) _____	_____	_____	
Diálisis (tipo) _____	_____	_____	
Otras enfermedades			
_____	_____	_____	
_____	_____	_____	
_____	_____	_____	
_____	_____	_____	

Antecedentes gineco-obstétricos

Número de embarazos	_____
1. Partos	
a) Término, peso ≥ 2.5 kg	_____
b) Término, peso < 2.5 kg	_____
c) Prematuro < 28 SDG	_____
2. Abortos espontáneos	_____
3. Abortos terapéuticos	_____
4. Óbitos	_____
Menarquia (edad) _____	
Menopausia (edad) _____	_____
1. Natural	
2. Quirúrgica (especifique procedimiento, razón) _____	

Antecedentes sociales

	Presente	Pasado
Empleo		
Estado actual	_____	_____
1. Trabaja, 2. Retirado, 3. Hogar, 4. Estudiante		
5. Incapacidad, 6. Desempleado, 7. Otro_____		
Ocupación principal (incluye pasado)_____		
Exposición a tóxicos	_____	_____
0. Ninguno, 1. Solventes, 3. Polvo/silicón,		
4. Otro_____		
Tabaquismo (1=si, 0=no)	_____	_____
Índice tabáquico	_____	_____

ANTECEDENTES FAMILIARES

Número de familiares afectados _____

Especificar miembro de la familia y enfermedades

Enfermedades de tejido conectivo

Escleroderma _____

LEG _____

EMTC _____

Miositis _____

Vasculitis _____

AR _____

Sjögren _____

Raynaud primario _____

Otras enfermedades autoinmunes

Esclerosis múltiple _____

Miastenia gravis _____

Anemia perniciosa _____

Anemia hemolítica/PTI _____

Enfermedad tiroidea _____

Diabetes mellitus tipo 1 _____

Espondiloartropatía _____

Enfermedad inflamatoria intestinal _____

Otras _____

EXPLORACIÓN FÍSICA

	Presente	Pasado	Observaciones
Signos vitales			
Peso (kg)	_____	_____	Talla_____
Presión arterial sistólica	_____	_____	
Diastólica	_____	_____	
Pulso	_____	_____	

Cabeza y cuello

Prueba de Shirmer (+ si <10 mm/5min bilateral)	_____	_____
Crecimiento de glándulas salivares	_____	_____
Glositis o xerostomía	_____	_____
Crecimiento tiroideo	_____	_____

Cardiopulmonar

Estertores bibasales tipo velcro	_____	_____
Frote pleural	_____	_____
P2 aumentado en intensidad	_____	_____
Frote pericárdico	_____	_____
Arritmia	_____	_____

Músculos/articulaciones

Debilidad muscular proximal	_____	_____
1. Leve, 2. Moderada, 3. Grave		
Atrofia músculos proximales (localización)_____	_____	_____
Artritis (localización)_____	_____	_____
Contracturas (localización)_____	_____	_____

Fuerza muscular

Registrar el número correspondiente en cada grupo muscular (0. Sin contracción ni movimiento, 1. Contracción, 2. Movimiento al eliminar gravedad, 3. Movimiento en contra de la gravedad, 4. Movimiento contra resistencia moderada, 5. Fuerza normal)

Derecho	Grupo muscular	Izquierdo	Observaciones
_____	Cuello: extensor/flexor	_____	
_____	Deltoides	_____	
_____	Bíceps	_____	
_____	Extensor de carpo	_____	
_____	Flexor de pierna	_____	
_____	Psoas	_____	
_____	Cuadriceps	_____	
_____	Tibial anterior (dorsiflexión)	_____	

Distancia dedo-palma (cm) (Distancia en flexión desde punta de 3º dedo hasta pliegue palmar medio)

	Derecha	Izquierda
Flexión	_____	_____
Extensión	_____	_____

Apertura oral máxima, interlabial (cm) _____

Frotes tendinosos

E=extensor, F=flexor, A=anterior, P=posterior

Derecho			Izquierdo		
0	1	Hombro	0	1	
0	1	Codo	0	1	
0	E F	Carpo	0	E F	
0	E F	Dedos	0	E F	
0	1	Rodilla	0	1	
0	A P	Tobillo	0	A P	

Piel

	Presente	Pasado	Observaciones
Dedos en salchicha	_____	_____	
Manos de mecánico	_____	_____	
Edema periorbital por DM	_____	_____	
Eritema en heliotropo	_____	_____	
Eritema de Gottron	_____	_____	
Pápulas de Gottron	_____	_____	
Eritema en V de cuello o tronco	_____	_____	
Exantema vasculítico	_____	_____	
1. Leucocitoclástico/púrpura palpable			
2. Urticarial			
Livedo reticularis	_____	_____	
Paniculitis	_____	_____	

Cambios cutáneos por escleroderma. Puntaje de Rodnan modificado.

0. Normal, 1. Engrosamiento leve, 2. Engrosamiento marcado pero se puede hacer pliegue con dificultad, 3. Engrosamiento impide hacer pliegue.

Encerrar en un círculo el número que corresponda al área más afectada de cada zona evaluada.

Derecho		Izquierdo	
Dedos	0 1 2 3	Dedos	0 1 2 3
Mano	0 1 2 3	Mano	0 1 2 3
Antebrazo	0 1 2 3	Antebrazo	0 1 2 3
Brazo	0 1 2 3	Brazo	0 1 2 3
	Cara 0 1 2 3		
	Tórax anterior 0 1 2 3		
	Abdomen 0 1 2 3		
Muslo	0 1 2 3	Muslo	0 1 2 3
Pierna	0 1 2 3	Pierna	0 1 2 3
Pie	0 1 2 3	Pie	0 1 2 3

Total. _____

Vascular periférico

	Presente	Pasado	Observaciones
Capilaroscopia anormal	_____	_____	
Cicatrices en pulpejos	_____	_____	
Úlceras en la punta de los dedos	_____	_____	
Gangrena en la punta de los dedos	_____	_____	
Úlceras no isquémicas en dedos (IFP, MCF, codo)	_____	_____	
Úlceras en extremidades inferiores	_____	_____	
Amputaciones de dedos	_____	_____	
(1. Isquemia, 2. Infección, 3. Ambas)			
Calcinosis. Localización _____	_____	_____	
Telangiectasias. Localización _____	_____	_____	

Evaluación de actividad de la enfermedad. (0.Inactiva, 1.Activa, 2.Indeterminado) _____

LABORATORIO

	Resultado más anormal		Observaciones
	Presente	Pasado	
Hemoglobina (mg/dl)	_____	_____	
Hematocrito (%)	_____	_____	
Leucocitos (x1000/ml)	_____	_____	
Plaquetas (x1000/ml)	_____	_____	
VSG (mm/hr)	_____	_____	
Creatinina sérica (mg/dl)	_____	_____	
CPK total. Normal _____	_____	_____	
AST. Normal _____	_____	_____	
ALT. Normal _____	_____	_____	
DHL. Normal _____	_____	_____	
Aldolasa. Normal _____	_____	_____	
Fosfatasa alcalina. Normal _____	_____	_____	
Albúmina (mg/dl)	_____	_____	
Globulinas (mg/dl)	_____	_____	
TSH. Normal _____	_____	_____	
C3. Normal _____	_____	_____	
C4. Normal _____	_____	_____	
ANA (título)	_____	_____	
ANA (patrón)	_____	_____	
FR	_____	_____	
Anticuerpos			
Anti-U1 RNP	_____	_____	
Anti-Sm	_____	_____	
Anti-SSA	_____	_____	
Anti-SSB	_____	_____	
Anti-centrómero	_____	_____	
Anti-topoisomerasa I	_____	_____	
Anti-PM-Scl	_____	_____	
Anti-cardiolipinas IgG	_____	_____	
Anti-cardiolipinas IgM	_____	_____	
Anti-β2 glicoproteína IgG	_____	_____	
Anti-β2 glicoproteína IgM	_____	_____	
Anticoagulante lúpico	_____	_____	
Anti-tiroideos (especificar. _____)	_____	_____	
Anti-mitocondria	_____	_____	
Anti-DNA. Método _____	_____	_____	
Anti-músculo liso	_____	_____	
Riñón			
Eritrocituria (#/campo de alta resolución)	_____	_____	
Proteinuria (0-4+)	_____	_____	
Orina de 24 hrs:			
Proteínas totales (gm)	_____	_____	
Depuración de creatinina (ml/min)	_____	_____	

ESTUDIOS DE GABINETE

	Presente	Pasado	Observaciones			
Electromiografía	_____	_____				
0. Normal, 1. Miopatía no inflamatoria, 2. Miopatía inflamatoria						
Radiografías de articulaciones						
Resorción distal de falanges	_____	_____				
Calcificaciones subcutáneas	_____	_____				
1. Circunscritas, puntuales						
2. Depósitos difusos grandes (universal)						
Localización _____						
Anormalidades de articulaciones de dedos	_____	_____				
1. Disminución de espacio articular						
2. Erosiones óseas						
Necrosis avascular. Localización. _____	_____	_____				
Tracto gastrointestinal						
<u>Serie esófago-gastro-duodenal.</u> 0. Normal, 1. Hipomotilidad, 2. Aperistalsis						
Esófago proximal	_____	_____				
Esófago distal	_____	_____				
Motilidad duodenal	_____	_____				
Dilatación duodenal	_____	_____				
Motilidad de intestino delgado	_____	_____				
Floculaciones u otras anomalías (0.No,1.Sí) _____	_____	_____	Especificar _____			
Endoscopia. 0. Normal. 1. Hipomotilidad	_____	_____				
Divertículos de boca ancha en colon (0. No, 1. Sí)	_____	_____				
Estómago en sandía (0. No, 1. Sí)	_____	_____				
<u>Manometría esofágica</u>	_____	_____				
(0.Normal, 1.Hipomotilidad, 2.Aperistalsis)						
Esófago proximal	_____	_____				
Esófago distal	_____	_____				
Pulmón						
<u>Espirometría</u>	Fecha					
Altura	_____	_____	_____	_____	_____	_____
FVC (ml)	_____	_____	_____	_____	_____	_____
% predicho de FVC	_____	_____	_____	_____	_____	_____
FEV-1 (ml/1seg)	_____	_____	_____	_____	_____	_____
FEV-1 (%)	_____	_____	_____	_____	_____	_____
FEV-1/FVC (%)	_____	_____	_____	_____	_____	_____
FEF 25-75 (ml/seg)	_____	_____	_____	_____	_____	_____
% predicho de FEF	_____	_____	_____	_____	_____	_____
FRC (ml/seg)	_____	_____	_____	_____	_____	_____
% predicho de FRC	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Capacidad de difusión CO	_____	_____	_____	_____	_____	_____
% predicho de DLCO	_____	_____	_____	_____	_____	_____
pO2 en ambiente	_____	_____	_____	_____	_____	_____
<u>Radiografía/TAC tórax alta resolución</u>						
Engrosamiento pleural	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Derrame pleural	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Fibrosis pulmonar bibasal	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Fibrosis pulmonar difusa	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Alveolitis	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Derrame pericárdico	_____	_____	_____	_____	_____	_____

	Presente	Pasado	Observaciones
Corazón			
<u>Electrocardiograma</u>			
Defecto en conducción	_____	_____	
1. Bloqueo de rama derecha, 2. Bloqueo de rama izquierda, 3. Bloqueo de hemifascículo anterior			
4. Otros (bloqueo interventricular, bloqueo AV 1º, 2º ó 3º grado), 5. 4 con 1, 2 ó 3.			
Arritmia atrial (especificar _____)	_____	_____	
Arritmia ventricular (especificar _____)	_____	_____	
<u>Ecocardiograma</u>			
Derrame pericárdico	_____	_____	_____
Incremento de PAP (>40mmHg reposo)	_____	_____	_____
Presión sistólica de arteria pulmonar o VD	_____	_____	_____
Fracción de expulsión VI	_____	_____	_____
<u>Cateterismo cardíaco</u>			
1. Enfermedad coronaria (Especificar _____)	_____	_____	
2. Anormalidad valvular (Especificar _____)	_____	_____	
3. Hipertensión arterial pulmonar (PAP media _____)	_____	_____	
4. Otra	_____	_____	

Estudios adicionales

IMPRESIÓN

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____

PLAN

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____

D. Escala de severidad de la Enfermedad.

Medsgger et al. Clin Exp Rheumatol 2003;21(3):S-51.

Órgano o sistema	0 (Normal)	1 (Leve)	2 (Moderado)	3 (Severa)	4 (Etapa final)
General	PP < 5%; Hto > 37%; Hb >12.3 g/dl	PP < 5-9-9%; Hto 33-36.9%; Hb 11- 12.2 g/dl	PP < 10-14.9%; Hto 29-32.9%; Hb 9.7- 10.9 g/dl	PP < 15-19-9%; Hto 25-28.9%; Hb 8.3- 9.6 g/dl	PP > 20%; Hto < 25%; Hb < 8.3 g/dl
Vascular periférico	No Raynaud; Raynaud con vasodilatadores	Raynaud que requiere vasodilatadores	Infartos digitales	Úlceras digitales	Gangrena digital
Piel (PMR)	0	1-14	15-29	30-39	40
Tendón/articulación DFDP	0-0.9 cm	1-1.9 cm	2-3.9 cm	4-4.9 cm	> 5 cm
Músculo	Fuerza proximal normal	Debilidad proximal leve	Debilidad proximal moderada	Debilidad proximal severa	Ayuda para la deambulaci3n
GI	Esófagograma y serie de intestino delgado normales	Hipoperistalsis esofágica distal; serie de intestino delgado abnormal	Antibióticos requeridos para el sobrecrecimiento bacteriano	Síndrome de malabsorci3n; episodios de pseudobstrucci3n	Hiperalimentaci3n requerida
Pulm3n	DLCO >80%; CVF >80%; Rx sin fibrosis; PSaP < 35 mmHg	DLCO 70-79%; CVF 70-79%; Estertores bibasales; Rx con fibrosis; PSaP 35-49 mmHg	DLCO 50-69%; CVF 50-69%; PSaP 50- 64 mmHg	DLCO < 50%; CVF < 50%; PSaP > 65 mmHg	Oxígeno requerido
Coraz3n	EKG normal; FEVI > 50%	Defecto de conducci3n EKG; FEVI 45-49%	Arritmia en EKG; FEVI 40-44%	Arritmia que requiere tratamiento; FEVI 30-39%	ICC; FEVI < 30%
Riñ3n	No historia CRE con crea < 1.3 mg/dl	Historia CRE con crea < 1.5 mg/dl	Historia CRE con crea 1.5 a 2.4 mg/dl	Historia CRE con crea 2.5 a 5 mg/dl	Historia CRE con crea > 5.0 mg/dl ó diálisis requerida

PP = Pérdida de peso; PMR = Puntaje modificado de Rodnan; DFDP = Distancia en flexi3n dedo a palma;
DLCO = Capacidad de difusi3n para mon3xido de carbono; CVF = Capacidad vital forzada; PSaP = Presi3n sist3lica de arteria pulmonar
EKG = Electrocardiograma; FEVI = Fracci3n de eyecci3n ventrículo izquierdo; CRE = Crisis renal en escleroderma.

XII. REFERENCIAS.

1. Piela TH, Korn JH. Lymphocyte-fibroblast adhesion induced by interferon- γ . *Cell Immunol* 1988;**114**:149-60.
2. Abraham D, Lupoli S, Mc Whirter A, Plater-Zyberk C, Piela TH, Korn JH, Olsen I, Black C. Expression and function of surface antigens on scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum* 1991;**34**:1164-72.
3. Yurovsky VV, Wigley FM, Wise RA, White B. Skewing of the CD8⁺ T-cell repertoire in the lungs of patients with systemic sclerosis. *Hum Immunol* 1996;**48**:84-97.
4. Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* 2007;**148**:32-46.
5. Furuzawa-Carballeda J, Vargas-Rojas MI, Cabral AR. Autoimmune inflammation from the Th17 perspective. *Autoimm Rev* 2007;**6**:169-75.
6. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: An effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 2006;**24**:677-88.
7. Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Kimzhanov A, Kang HS, Chung Y, Ma L, Shah B, Panopoulos AD, Schluns KS, Watowich SS, Tian Q, Jetten AM, Dong C. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity* 2008;**28**:29-39.

8. 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 Rheum* 2000;**43**:2455-63.
9. Scala E, Pallota S, Frezzolini A, Abeni D, Barbieri C, Sampogna F, De Pitá O, Puddu P, Paganelli R, Russo G. Cytokine and chemokine levels in systemic sclerosis: relationship with cutaneous and internal organ involvement. *Clin Exp Immunol* 2004;**138**:540-6.
10. Duncan MR, Berman B. Differential regulation of collagen, glycosaminoglycan, fibronectin, and collagenase activity production in cultured human adult dermal fibroblasts by interleukin 1-alpha and beta and tumor necrosis factor-alpha and beta 1. *J Invest Dermatol* 1989;**92**:699-706.
11. Piguet PF, Vesin C, Grau GE, Thompson RC. Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1ra) prevents or cures pulmonary fibrosis elicited in mice by bleomycin or silica. *Cytokine* 1993;**5**:57-61.
12. Duncan MR, Berman B. Stimulation of collagen and glycosaminoglycan production in cultured human adult dermal fibroblasts by recombinant interleukin 6. *J Invest Dermatol* 1991;**97**:686-92.
13. Bamber B, Reife RA, Haugen HS, Clegg CH. Oncostatin M stimulates excessive extracellular matrix accumulation in a transgenic mouse model of connective tissue disease. *J Mol Med* 1998;**76**:61-9.
14. Feghali CA, Bost KL, Boulware DW, Levy LS. Control of IL-6 expression and response in fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Autoimmunity* 1994;**17**:309-18.

15. Hasegawa M, Sato S, Ihn H, Takehara K. Enhanced production of interleukin-6 (IL-6), oncostatin M and soluble IL-6 receptor by cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic sclerosis. *Rheumatology* 1999;**38**:612-7.
16. Deleuran B, Abraham DJ. Possible implication of the effector CD4⁺ T-cell subpopulation Th17 in the pathogenesis of systemic scleroderma. *Nature Clin Practice Rheumatol* 2007;**3**:682-3.
17. Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee: Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980;**23**:581-90.
18. Medsger TA Jr, Bombardieri S, Czirjak L, Scorza R, Della Rossa A, Bencivelli W. Assessment of disease severity and prognosis. *Clin Exp Rheumatol* 2003;**21(3 Suppl 29)**:S42-S46.
19. Kawaguchi Y, Hara M, Wright TM. Endogenous IL-1 α from systemic sclerosis fibroblasts induces IL-6 and PDGF-A. *J Clin Invest* 1999;**103**:1253-60
20. Kawaguchi Y. IL-1 alpha gene expression and protein production by fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 1994;**97**:445-50.
21. Umehara H, Kumagai S, Murakami M, Suginoshita T, Tanaka K, Hashida S, Ishikawa E, Imura H. Enhanced production of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha by cultured peripheral blood monocytes from patients with scleroderma. *Arthritis Rheum* 1990;**33**:893-7.

22. 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. *J Dermatol Sci* 2001;**27**:140-6.
23. Feghali CA, Bost KL, Boulware DW, Levy LS. Mechanisms of pathogenesis in scleroderma. I. Overproduction of interleukin 6 by fibroblasts cultured from affected skin sites of patients with scleroderma. *J Rheumatol* 1992;**19**:1207-11.
24. Bolster MB, Ludwicka A, Sutherland SE, Strange C, Silver RM. Cytokine concentrations in bronchoalveolar lavage fluid of patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1997; **40**:743-51.
25. Hasegawa M, Fujimoto M, Kikuchi K, Takehara K. Elevated serum tumor necrosis factor-alpha levels in patients with systemic sclerosis: association with pulmonary fibrosis. *J Rheumatol* 1997; **24**:663-5.
26. Minami R, Sakai K, Mivamura T, Yamamoto M, Suematsu E. The role of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with Rheumatoid Arthritis. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 2006;**1**:37-42.
27. Fiocco U, Rosada M, Cozi L, Ortolani C, De Silvestro G, Ruffatti A, Cozzi E, Gallo C, Todesco S. Early phenotypic activation of circulating helper memory T cells in scleroderma: correlation with disease activity. *Ann rheum Dis* 1993;**52**:272-7.