



ARTIGO ORIGINAL

Efeito do *crosstalk* entre células Th17 e Th9 na ativação de células musculares lisas vasculares dérmicas na esclerodermia sistêmica e regulação da tansinona IIA ☆,☆☆

Mengguo Liu *

Departamento de Dermatologia, Huashan Hospital, Fudan University, the 12th Urumqi Road, Xangai, China

Recebido em 18 de julho de 2021; aceito em 5 de novembro de 2021

PALAVRAS-CHAVE

Angiopatia;
Células musculares lisas vasculares;
Células T-helper 9;
Células T-helper 17;
Esclerodermia sistêmica;
Tansinona IIA

Resumo

Fundamentos: Avaliar o efeito das células T-helper 17 (Th17) e Th9 na ativação das células do músculo liso vascular dérmico (CMLVD) na esclerodermia sistêmica (ES) e na regulação da tansinona IIA.

Métodos: A expressão do receptor de interleucina 17 (IL-17R) e do receptor de interleucina 9 (IL-9R) na pele de pacientes com ES foi avaliada por imunofluorescência. A expressão do mRNA de IL-9 e IL-9R em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes com ES foi detectada por reação em cadeia da polimerase em tempo real ou quantitativa (qRT-PCR). A proporção de células Th9 em CMSP de pacientes com ES foi determinada por citometria de fluxo. O efeito da IL-9 na diferenciação de Th17 e IL-17 na diferenciação de Th9 foi detectado por citometria de fluxo. A proporção de células Th9 e Th17 em pacientes com ES foi detectada por citometria de fluxo. Os níveis de colágeno I, III, α -SMA, IL-9R, IL-17R, JNK, P38 e ERK foram analisados utilizando *Western blotting* (WB).

Resultados: As células Th9 foram altamente expressas em ES. A IL-9 estimulou a diferenciação de células T imaturas em células Th17. A IL-17 induziu a diferenciação de células T imaturas em células Th9. A tansinona IIA inibiu a diferenciação de linfócitos T imaturos em Th17 e Th9. O método WB mostrou que a ação combinada de IL-17 e IL-9 aumentou a inflamação e proliferação de CMLVD. Anti-IL17, anti-IL9 e tansinona IIA inibiram a ativação funcional de CMLVD.

DOI referente ao artigo:

<https://doi.org/10.1016/j.abd.2021.11.008>

☆ Como citar este artigo: Liu M. Effect of *crosstalk* between Th17 and Th9 cells on the activation of dermal vascular smooth muscle cells in systemic scleroderma and regulation of tanshinone IIA. *An Bras Dermatol.* 2022;97:716–28.

☆☆ Trabalho realizado no Departamento de Dermatologia e Laboratório Central, Huashan Hospital Affiliated to Fudan University, Xangai, China.

* Autor para correspondência.

E-mail: liumengguo@126.com

Limitações do estudo: Para Th17, Th9 e células musculares lisas vasculares, o estudo sobre a via de sinalização de sua interação não é suficientemente completo. Estudos mais detalhados são necessários para explorar o mecanismo de interação célula-célula.

Conclusões: Os resultados atuais sugerem que células Th17 e Th9 induziram a ativação de CMLVD na ES por meio de *crosstalk in vitro*, e a tansinona IIA inibiu o processo.

© 2022 Sociedade Brasileira de Dermatologia. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introdução

A esclerodermia sistêmica (ES) é doença autoimune.^{1,2} Anormalidade autoimune, vasculopatia e alteração fibroproliferativa são três processos patológicos característicos na ES, responsáveis pelas manifestações clínicas mais graves da doença. Essas modificações também determinam o desfecho clínico da doença e a mortalidade.³ A vasculopatia e fibrose ocorrem nos estágios iniciais, existem durante todo o curso da doença e são reguladas pela autoimunidade. A vasculopatia é caracterizada por inflamação das células endoteliais vasculares e proliferação das células do músculo liso, o que eventualmente leva à fibrose e estenose vascular.^{4–6} Entretanto, a patogênese da vasculopatia relacionada à ES ainda não é compreendida.

Estudos recentes mostraram aumento de células Th17 e IL-17 na pele e no sangue periférico de pacientes com ES.⁷ A IL-17A induz inflamação das células endoteliais vasculares.⁸ Também foram observadas a proliferação e a migração de células do músculo liso vascular dérmico (CMLVD) da camada média para a íntima induzidas por células Th17, bem como a transformação do fenótipo do tipo contração para o tipo sintético, que resulta em superprodução de colágeno e pode desempenhar papel-chave na patogênese da ES.^{9–11} Entretanto, ainda não foi elucidado se as células Th17 e outros linfócitos atuam sinergicamente na indução da função de CMLVD. Recentemente, IL-9 e células T CD4+ produtoras de IL-9 (células Th9) foram encontradas na ES, sugerindo que o eixo da IL-9 possa estar envolvido na patogênese da ES.^{12,13} Outros estudos mostraram que a IL-9 induz a diferenciação de células Th17.^{14,15} No entanto, nenhum dos estudos abordou especificamente se as células Th17 e Th9 interagem entre si para promover a ativação funcional de CMLVD na patogênese da ES.

Assim, o presente estudo avaliou o efeito das células Th17 e Th9 em CMLVD derivadas de pacientes com ES. Também foi estudado o efeito regulador da tansinona IIA nesse processo. Curiosamente, foi observado que células Th17 e Th9 podem induzir a ativação de CMLVD *in vitro* na ES por meio de “diálogo”, e a tansinona IIA inibe esse efeito. A tansinona IIA é um componente farmacologicamente ativo solúvel em gordura da erva chinesa *Salvia miltiorrhiza*, conhecido medicamento fitoterápico tradicional chinês utilizado para tratar doenças cardiovasculares e doenças do tecido conjuntivo, como lúpus eritematoso sistêmico, esclerodermia e artrite reumatoide. Várias pesquisas demonstraram que a tansinona IIA inibe a proliferação e migração de células musculares lisas da artéria, reduz a pressão da artéria pulmonar e melhora a remodelação da artéria pulmonar induzida por hipóxia. Enquanto isso,

resultados anteriores do mesmo autor fornecem evidências preliminares de que a tansinona IIA exerce efeito inibitório na proliferação induzida por IL-17A, na síntese de colágeno e na migração de CMLVD derivadas de pacientes com ES. Esses achados potencialmente explicam por que *S. miltiorrhiza* claramente alivia os sintomas clínicos em pacientes com ES.

Métodos

Pacientes com ES e controles saudáveis

Um total de 10 pacientes com ES (quatro homens e seis mulheres) foram incluídos no presente estudo após fornecerem seu consentimento informado. Todos os pacientes foram diagnosticados de acordo com os critérios de classificação de 2013 para ES e apresentaram diferentes graus de manifestações clínicas de microangiopatia (por exemplo, fenômeno de Raynaud, úlceras nos dedos das mãos, telangiectasia, hipertensão pulmonar e crise renal). Além disso, dez indivíduos saudáveis pareados por idade e sexo (cinco homens e cinco mulheres), submetidos à cirurgia para correção de doença não cutânea, foram incluídos no presente estudo. Amostras de sangue foram obtidas de pacientes com ES e dos indivíduos saudáveis. As amostras da pele de pacientes com ES foram obtidas para isolar CMLVD.

Isolamento de CMLVD derivadas de pacientes com ES

A pele foi desinfetada com álcool a 75% e as amostras excisadas cirurgicamente em condições estéreis, e em seguida submetidas de seis a oito lavagens em solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril e depois embebidas em álcool a 75% por 5 a 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram lavadas com PBS contendo dois tipos de antibióticos (penicilina e estreptomicina). O tecido vascular dérmico foi isolado sob microscópio de dissecação, picado e tripsinizado. O tecido não digerido foi removido usando filtro de 200 *mesh* e centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm. Por fim, as células obtidas foram ressuspensas e adicionadas ao meio basal de células de músculo liso (Promocell Heidelberg, Alemanha).

Imunofluorescência tecidual

O tecido cutâneo dos pacientes com ES foi aparado, desidratado, embebido, fatiado, assado, submetido a desparafinização e reidratado. Os cortes histológicos de pele

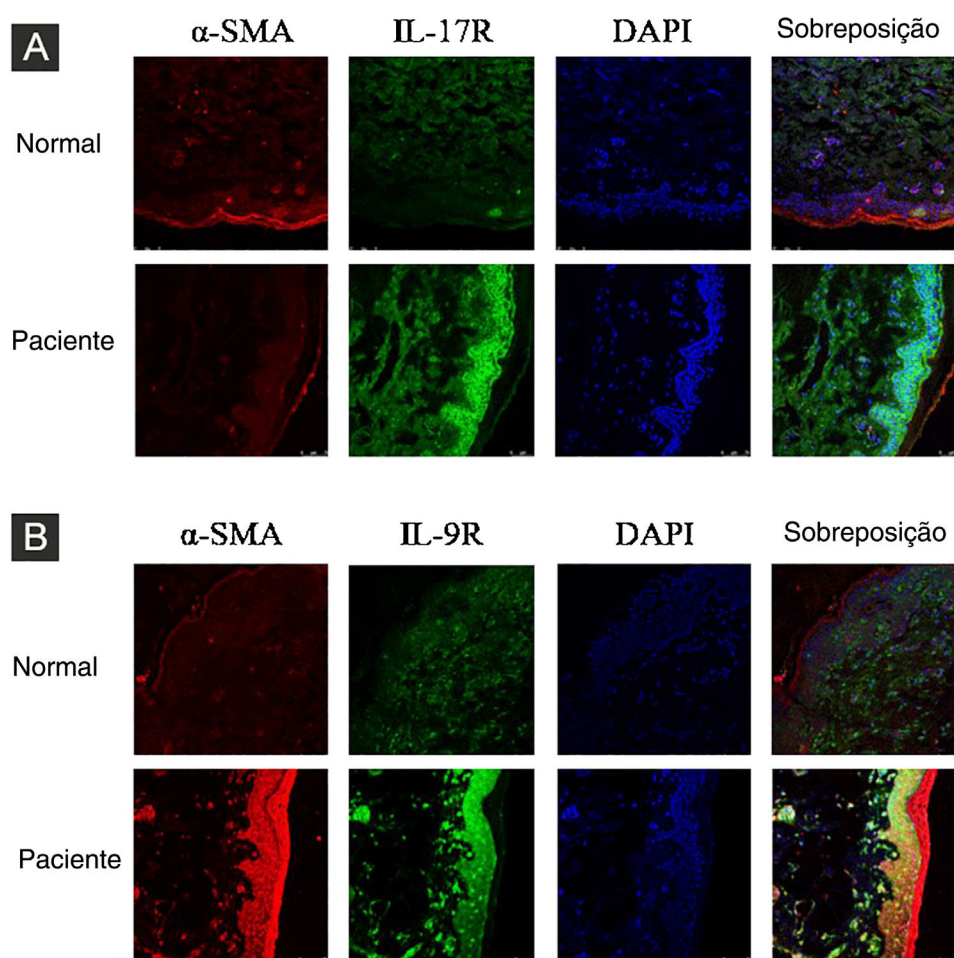


Figura 1 IL-17R e IL-9R mostraram alta expressão na pele de pacientes com ES. (A) Comparado ao controle saudável, IL-17R foi altamente expressa na pele de pacientes com ES. α -SMA, fluorescência vermelha, 1:200. IL-17R, fluorescência verde, 1:200. (B) Comparado ao controle saudável, IL-9R foi altamente expressa na pele de pacientes com ES. α -SMA, fluorescência vermelha, 1:200. IL-9R, fluorescência verde, 1:200.

foram bloqueados com 1% de albumina de soro bovino (BSA) por 30 minutos e incubados com anticorpo primário durante a noite a 4°C. Após incubação com o anticorpo secundário à temperatura ambiente por 1 hora, os núcleos celulares foram corados com 49,6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI). As imagens foram digitalizadas utilizando um microscópio de fluorescência (Olympus, Tóquio, Japão).

Imunofluorescência celular

As CMLVD foram colocadas em placas de 24 poços com lamínulas. À confluência de 90%–100%, as células foram estimuladas por 24 horas, seguida de fixação com paraformaldeído 4% por 15 minutos e permeabilização com Triton X-100 a 0,5% por 15 minutos. Em seguida, as células foram bloqueadas com BSA a 1% por 30 minutos e incubadas com anticorpo primário durante a noite a 4°C. Após a incubação com anticorpo secundário à temperatura ambiente por 1 hora, DAPI foi usado para corar os núcleos das células. As imagens foram digitalizadas usando microscópio de fluorescência.

Ensaio de imunoabsorção ligado a enzima (ELISA)

A concentração de IL-9 foi detectada utilizando o kit ELISA (MultiSciences, Hangzhou, China) de acordo com as instruções do fabricante. Um equivalente de 100 μ L de amostras de proteína padrão e sobrenadantes de cultura de células foram adicionados e incubados por 2 horas à temperatura ambiente. Após quatro a seis lavagens, cada poço foi incubado por 1 hora com 50 μ L de anticorpo primário IL-9 e, em seguida, com 100 μ L de anticorpo marcado com enzima por 1 hora em temperatura ambiente. Após o término da reação, a densidade óptica (DO) foi medida em absorção máxima de 450 nm e comprimento de onda de 630 nm. O valor calibrado de DO foi obtido subtraindo-se o valor de 630 nm daquele de 450 nm. Os dados de concentração de IL-9 foram apresentados como valores de média \pm DP.

RT-PCR em tempo real

O RNA total de CMLVD foi extraído utilizando o reagente TRIzol. Amostras de DNA complementar (cDNA) foram

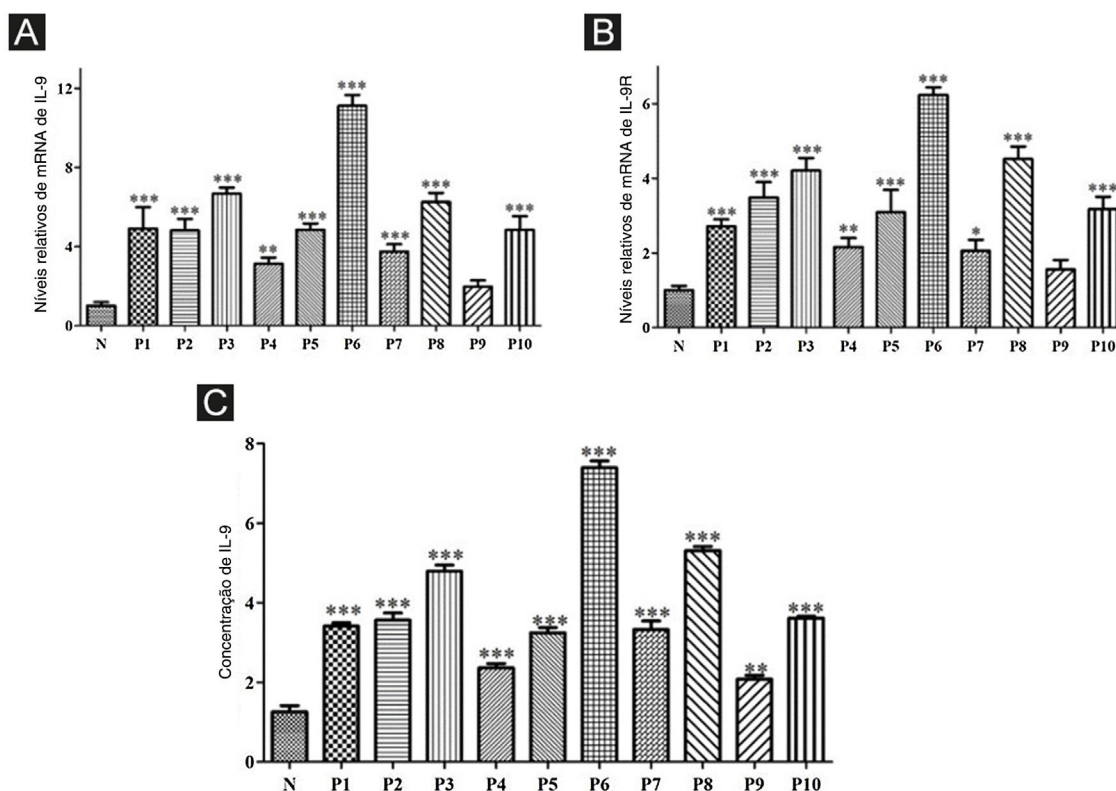


Figura 2 Alta expressão de IL-9 e IL-9R em pacientes com ES. (A) Alta expressão de mRNA de IL-9 em CMSP de pacientes com ES. (B) Alta expressão de mRNA de IL-9R em CMSP de pacientes com ES. (C) Alta expressão de IL-9 no soro de pacientes com ES. N, Normal; P, Paciente. * vs. N, $p < 0,05$. ** vs. N, $p < 0,01$. *** vs. N, $p < 0,001$.

sintetizadas usando o *First Strand cDNA Synthesis Kit* (Yeasten, Xangai, China) e *primers* oligo (dT). Os níveis de mRNA dos genes-alvo foram examinados utilizando *SYBR Green PCR Master Mix*. Os seguintes pares de primers foram usados:

IL-9

Forward: TCA AGATGCTTCTGGCCATG

Reverse: AGGGAATGCCAAACAGAGA

IL-9R

Forward: CCAGCACAGGGATCACATTG

Reverse: GCCTGTATAACGCTCCTCCT

β -actina

Forward: AACCATGAGGGAAATCGTGC

Reverse: CAGGATGGCACGAGGAACAT

O método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foi usado para normalizar a transcrição ao nível de β -actina e para calcular a modulação em relação aos controles.

Triagem de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) e células TCD4+ e detecção por citometria de fluxo

As CMSP foram obtidas por centrifugação em gradiente de densidade usando Ficoll-Hypaque e cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de FCS e antibióticos, após serem obtidas de pacientes com ES e controles saudáveis. O subconjunto de células T CD4+ foi categorizado usando *magnetic-activated cell sorting* (MACS). As células induzidas foram incubadas com anticorpo anti-CD4 humano marcado com FITC a 4°C durante 30 minutos. A fim de analisar mais detalhadamente a produção de IL-9 ou IL-17, as células foram permeadas com tampão permeável e imunomarcadas com IL-9 anti-humano ou IL-17 anti-humano conjugado com

PE à temperatura ambiente durante 30 minutos. Ao final da incubação, todas as células marcadas foram analisadas por citometria de fluxo.

Western blotting

As proteínas de CMLVD foram extraídas usando tampão de lise RIPA (Beyotime, Xangai, China) suplementado com o inibidor de protease fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF). As proteínas foram separadas por SDS-PAGE a 8% e transferidas para membranas de PVDF. Posteriormente, as membranas foram bloqueadas com leite a 5% por 2 horas em temperatura ambiente, sondadas com anticorpos primários, incluindo colágeno I (1:2000, Abcam), colágeno III (1:5000, Abcam), α -SMA (1:1000, CST), p38 (1:1000, CST), phospho-p38 (1:1000, CST), ERK (1:2000, CST), phospho-ERK (1:1000, CST), e GAPDH (1:5000, Proteintech) durante a noite a 4°C e, então, incubadas com anticorpos secundários adequados conjugados com peroxidase de rábano (HRP) por 1,5 hora à temperatura ambiente. As proteínas foram detectadas usando reagentes de detecção ECL.

Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente com o *software* SPSS, versão 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Os dados quantitativos são expressos como média \pm desvio padrão (DP). Os dados entre o grupo de pacientes e o de indivíduos

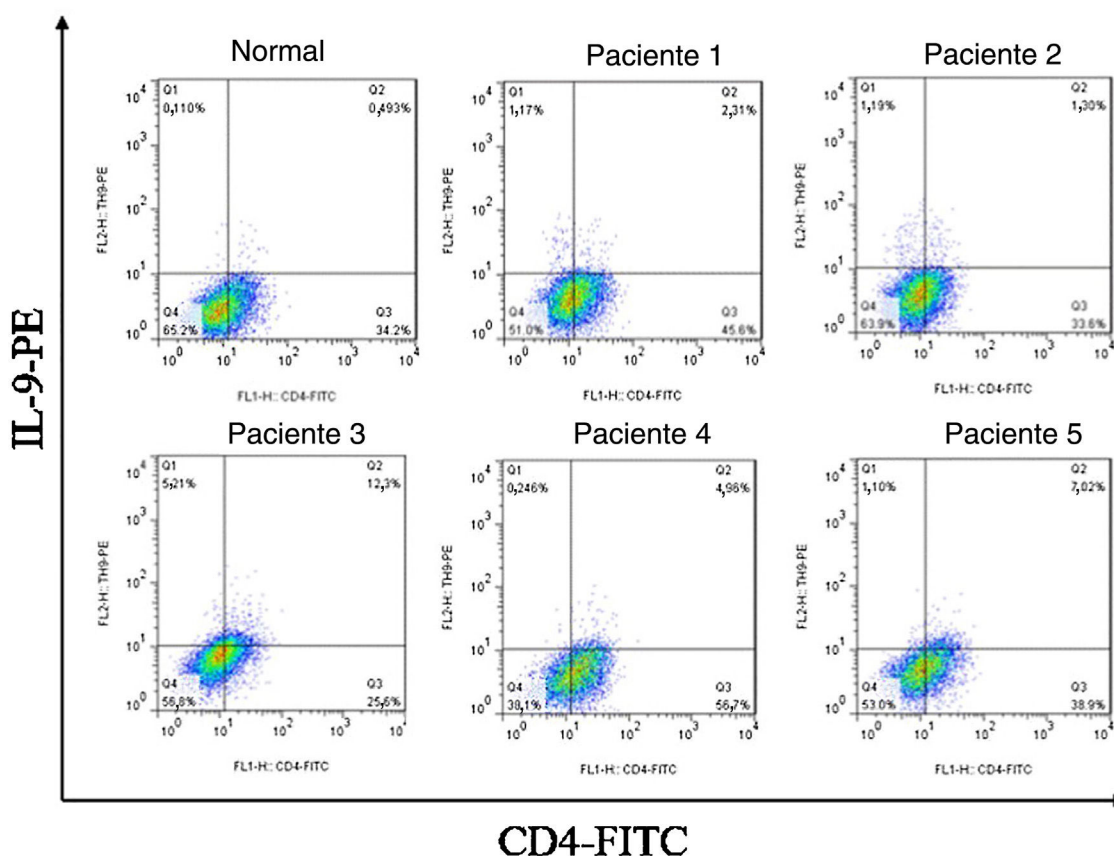


Figura 3 A proporção de células T CD4⁺IL-9⁺ em CMSP de pacientes com ES foi significativamente maior do que a dos controles saudáveis.

saudáveis foram analisados usando o teste *t* de Student. Os dados entre múltiplos grupos foram analisados usando análise de variância (ANOVA) unidirecional combinada com correção de Bonferroni; o valor de $p < 0,05$ foi estatisticamente significativo.

Resultados

Correlação entre Th9 e ES

Em comparação com indivíduos normais, IL-9R e IL-17R foram altamente expressos nas lesões de pele de pacientes com ES (fig. 1). Os níveis de mRNA de IL-9 e IL-9R de CMSP e os níveis de IL-9 no soro de pacientes com ES estavam aumentados (fig. 2). A citometria de fluxo mostrou que a proporção de células T CD4⁺IL-9⁺ em CMSP de pacientes com ES foi significativamente maior (fig. 3). A proporção de Th9 foi associada à ES.

Cross-talk entre células Th17 e Th9 *in vitro* e regulação da tansinona IIA

A IL-9 e o soro de ES promovem a diferenciação de Th17 e a reversão do efeito da tansinona IIA

Os resultados mostraram que a proporção de células Th17 nos grupos de IL-9 e soro de ES foi significativamente maior do que no grupo controle; no entanto, a proporção de células

Th17 no grupo do anticorpo neutralizante de IL-9 foi significativamente menor do que no grupo controle, e o anticorpo neutralizante de IL-9 diminuiu o efeito promotor do soro nas células Th17 (fig. 4A). Esses achados indicaram que a IL-9 estimula a diferenciação de linfócitos T imaturos em células Th17 *in vitro*, bem como a diferenciação de linfócitos T imaturos em células Th17. Os dados mostraram que a tansinona IIA diminui a proporção de Th17 e inibe o efeito do soro de ES nas células Th17 em comparação com o controle (fig. 4B). Além disso, o conteúdo de IL-17 no sobrenadante da cultura de cada grupo foi detectado por ELISA. Esses resultados mostraram que a IL-9 e o soro de ES promovem significativamente a secreção de IL-17 por linfócitos T imaturos, enquanto o anticorpo neutralizante de IL-9 e a tansinona IIA inibem significativamente a secreção de IL-17 por linfócitos T imaturos e reverte o efeito desencadeante da IL-9 e do soro de ES (fig. 4C).

IL-17 e soro de ES promovem a diferenciação de Th9 e o efeito reverso da tansinona IIA

Os resultados mostraram que a proporção de células Th9 nos grupos de IL-17 e soro de ES foi significativamente maior do que no grupo controle; no entanto, a proporção de células Th9 no grupo de anticorpos neutralizantes de IL-17 foi significativamente menor do que no grupo controle, e o anticorpo neutralizante da IL-17 diminuiu o efeito promotor do soro nas células Th9 (fig. 5A). Esses achados indicaram que a IL-17 estimula a diferenciação de linfócitos T imaturos em

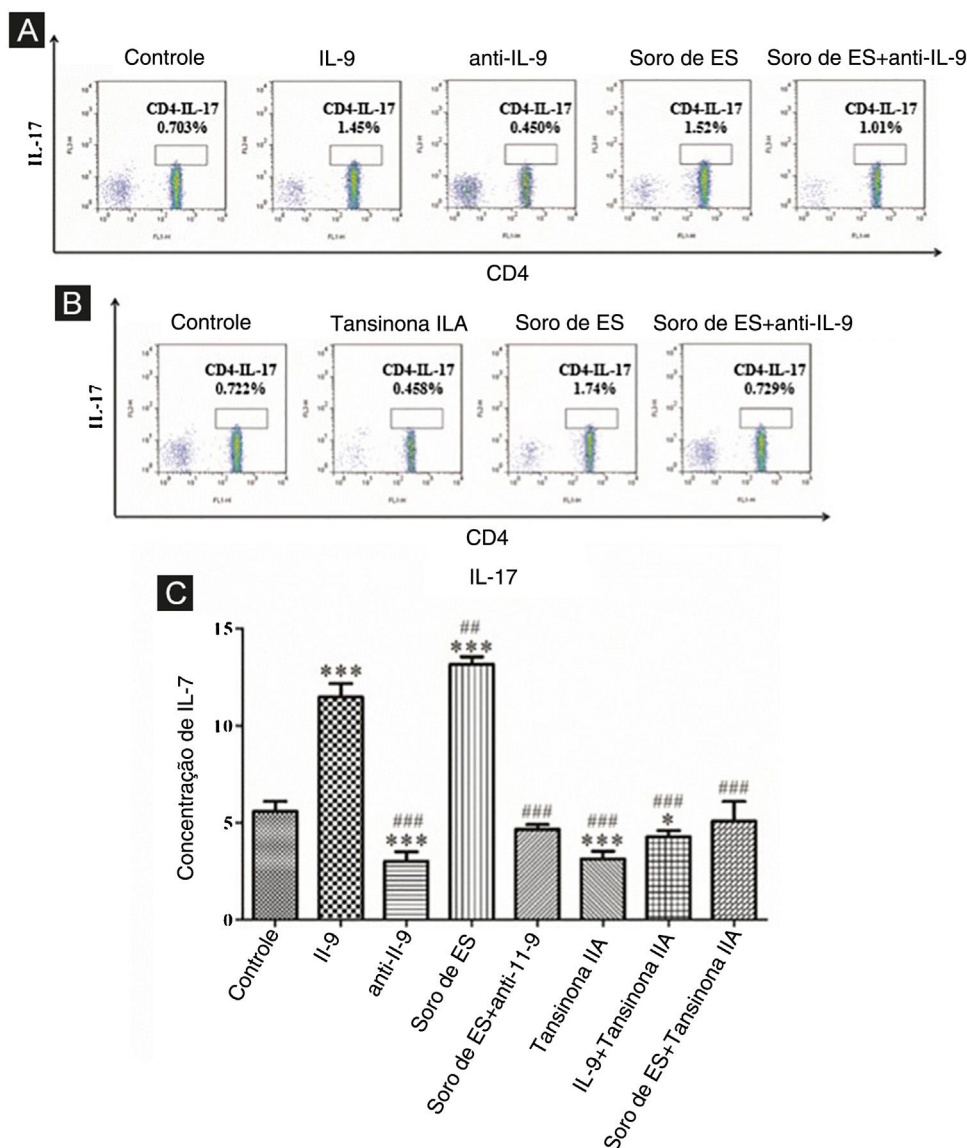


Figura 4 O anticorpo neutralizador de IL-9 e a tansinona IIA inibem a diferenciação de linfócitos T imaturos em Th17. (A e B) A proporção de linfócitos T imaturos diferenciados em Th17 em cada grupo foi detectada utilizando citometria de fluxo. (C) O conteúdo de IL-17 secretado por linfócitos T imaturos em cada grupo foi detectado por ELISA. Concentração de IL-9, 20 ng/mL; concentração de anti-IL-9, 5 µg/mL; concentração de tansinona IIA, 50 µM. * vs. grupo controle, $p < 0,05$, *** vs. grupo controle, $p < 0,001$, ## vs. grupo IL-9, $p < 0,01$, ### vs. grupo IL-9, $p < 0,001$.

células Th9 *in vitro*, e a IL-17 no soro de pacientes com ES estimula a diferenciação de linfócitos T imaturos em células Th9. Além disso, a tansinona IIA diminui a proporção de Th9 e inibe o efeito promotor do soro de ES nas células Th9 em comparação com o controle (fig. 5B). Adicionalmente, o conteúdo de IL-9 no sobrenadante de cultura de cada grupo foi detectado por ELISA. Os resultados mostraram que IL-17 e o soro de ES promoveram significativamente a secreção de IL-9 por linfócitos T imaturos, enquanto o anticorpo neutralizante de IL-17 e a tansinona IIA inibiram significativamente a secreção de IL-9 por linfócitos T imaturos e reverteram o efeito promotor da IL-17 e do soro de ES (fig. 5C).

Efeitos da IL-17 e IL-9 na ativação funcional de CMLVD e regulação da tansinona IIA

IL-9 e soro da ES promovem a expressão de IL-17R em CMLVD, e tansinona IIA reverte esse efeito

As CMLVD de pacientes com ES foram isoladas e incubadas com IL-9, anticorpo neutralizante de IL-9, soro de ES, soro de ES e anticorpo neutralizante de IL-9, tansinona IIA, IL-9 e tansinona IIA, e soro de ES e tansinona IIA por três dias. A expressão de IL-17R foi detectada por imunofluorescência. Os resultados mostraram que a IL-9 e o soro de ES promovem significativamente a expressão de IL-17R, e o anticorpo

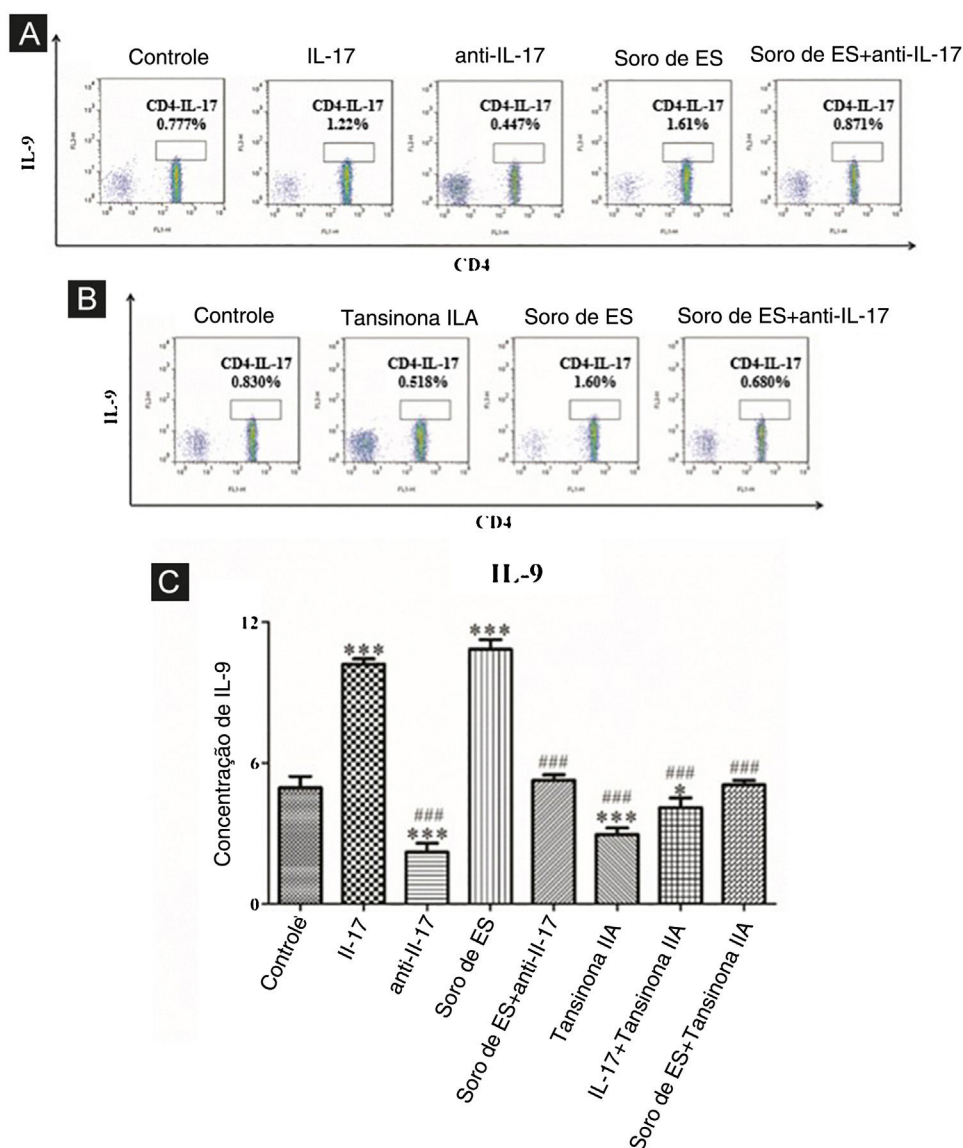


Figura 5 O anticorpo neutralizador de IL-17 e a tansinona IIA inibem a diferenciação de linfócitos T imaturos em Th9. (A e B) A proporção de linfócitos T imaturos diferenciados em Th9 em cada grupo foi detectada utilizando citometria de fluxo. (C) O conteúdo de IL-9 secretado por linfócitos T imaturos em cada grupo foi detectado por ELISA. Concentração de IL-17, 100 ng/mL; concentração de anti-IL-17, 8 µg/mL; concentração de tansinona IIA, 50 µM. * vs. grupo controle, $p < 0,05$, *** vs. grupo controle, $p < 0,001$, ### vs. grupo IL-9, $p < 0,001$.

neutralizante de IL-9 e a tansinona IIA revertem o efeito promotor da IL-9 e do soro de ES (fig. 6).

IL-17 e soro de ES promovem a expressão de IL-9R em CMLVD, e tansinona IIA reverte esse efeito

As CMLVD foram incubadas com IL-17, anticorpo neutralizante de IL-17, soro de ES, soro de ES e anticorpo neutralizante de IL-17, tansinona IIA, IL-17 e tansinona IIA, e soro de ES e tansinona IIA por três dias. A expressão de IL-9R foi detectada por imunofluorescência. Os resultados mostraram que a IL-17 e o soro de ES promovem significativamente a expressão de IL-9R, e o anticorpo neutralizante de IL-17

e tansinona IIA revertem o efeito promotor de IL-17 e do soro de ES (fig. 7).

IL-9 e soro de ES promovem a ativação funcional de CMLVD, e tansinona IIA reverte esse efeito

As CMLVD foram incubadas com IL-9, IL-9 e anticorpos neutralizantes de IL-9, IL-9 e tansinona IIA, soro de ES, soro de ES e anticorpos neutralizantes de IL-9 e soro de ES e tansinona IIA por três dias. Colágeno I, colágeno III, α -SMA, P-P38, P38, P-ERK e ERK foram detectados por WB. Os resultados mostraram que a IL-9 e o soro de ES promovem significativamente a expressão de colágeno I, colágeno III, α -SMA, P-P38

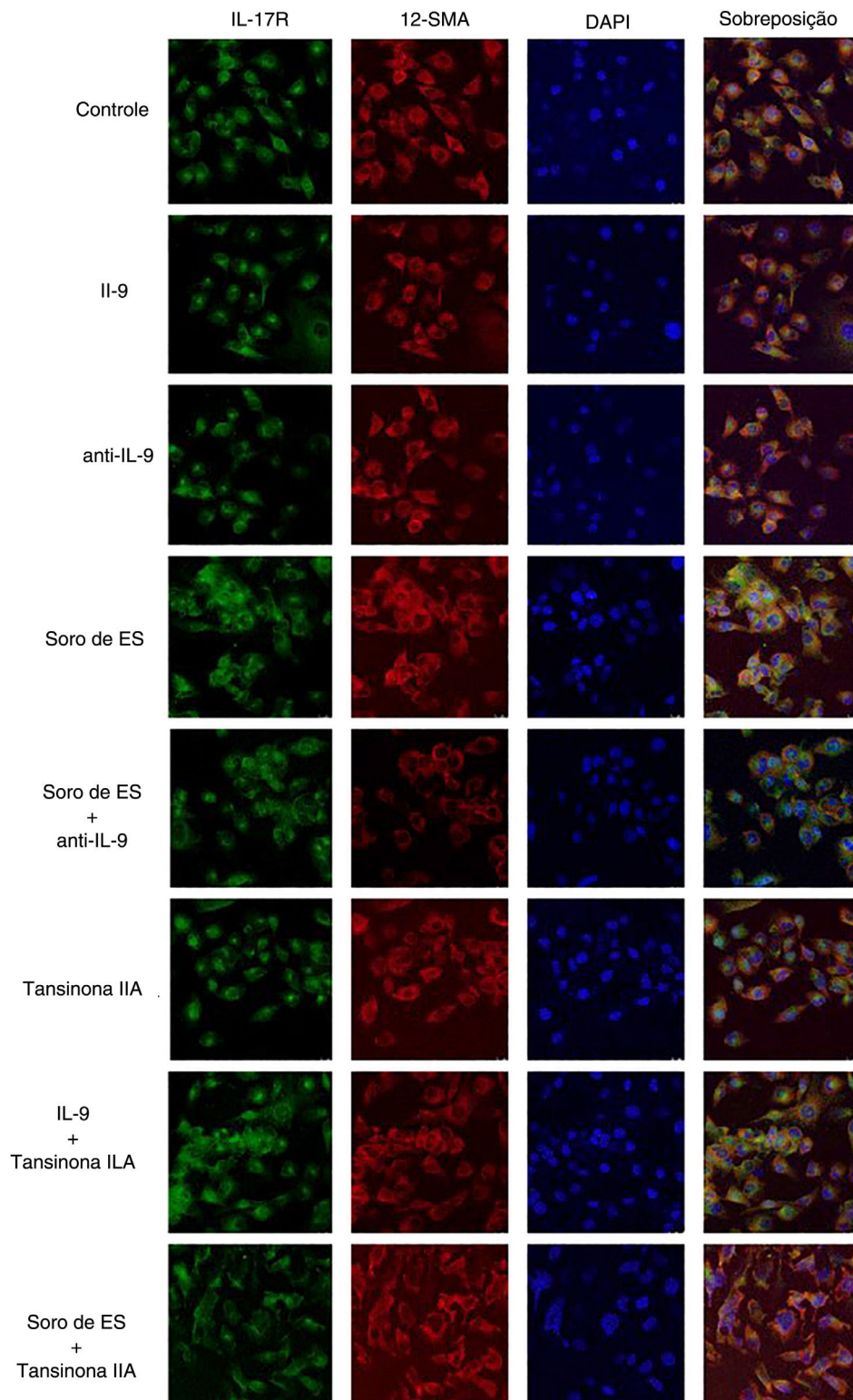


Figura 6 O anticorpo neutralizador de IL-9 e a tansinona IIA inibem a expressão de IL-17R em CMLVD. α -SMA, fluorescência vermelha; IL-17R, fluorescência verde.

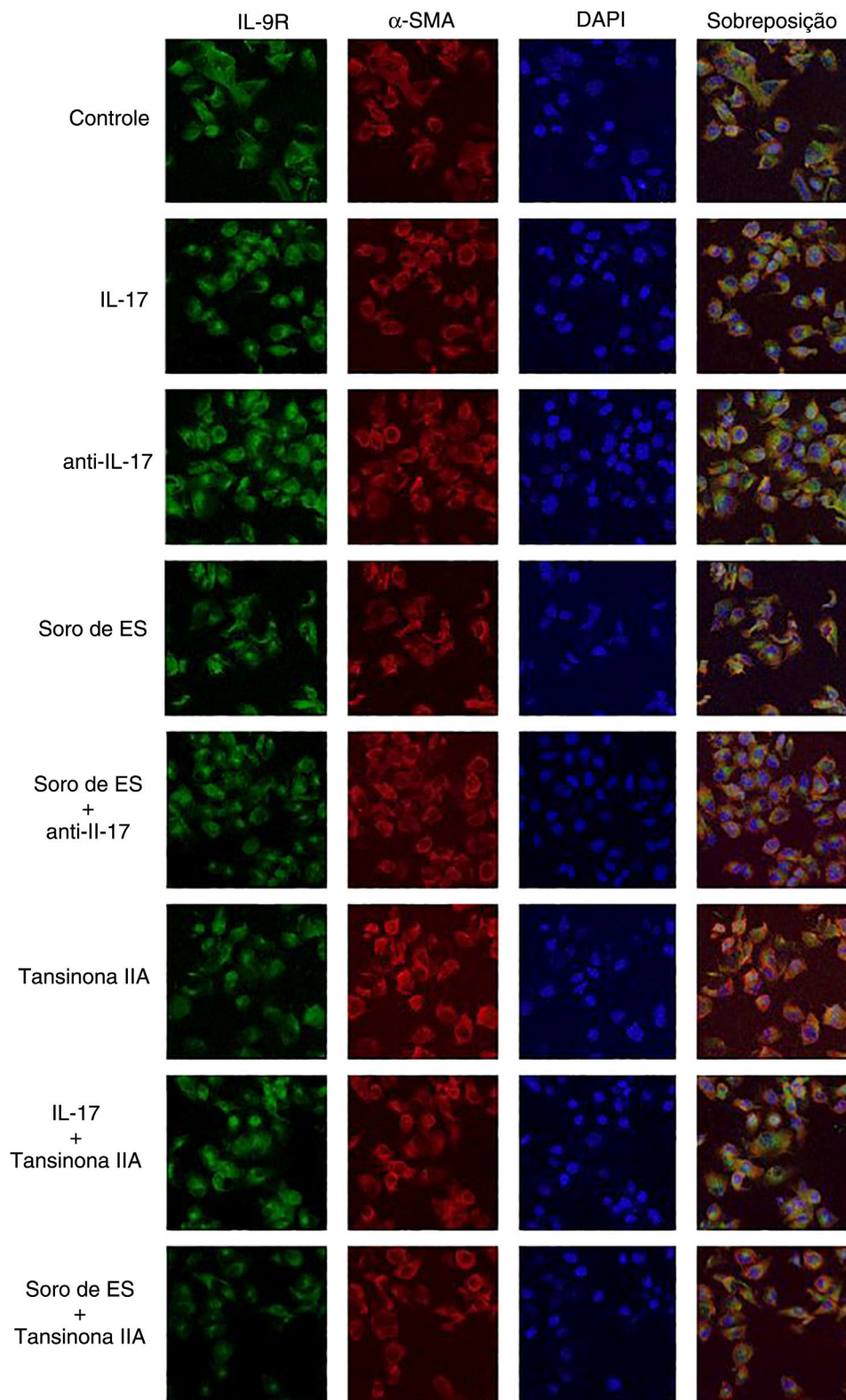


Figura 7 O anticorpo neutralizador de IL-17 e a tansinona IIA inibem a expressão de IL-9R em CMLVD. α -SMA, fluorescência vermelha; IL-9R, fluorescência verde.

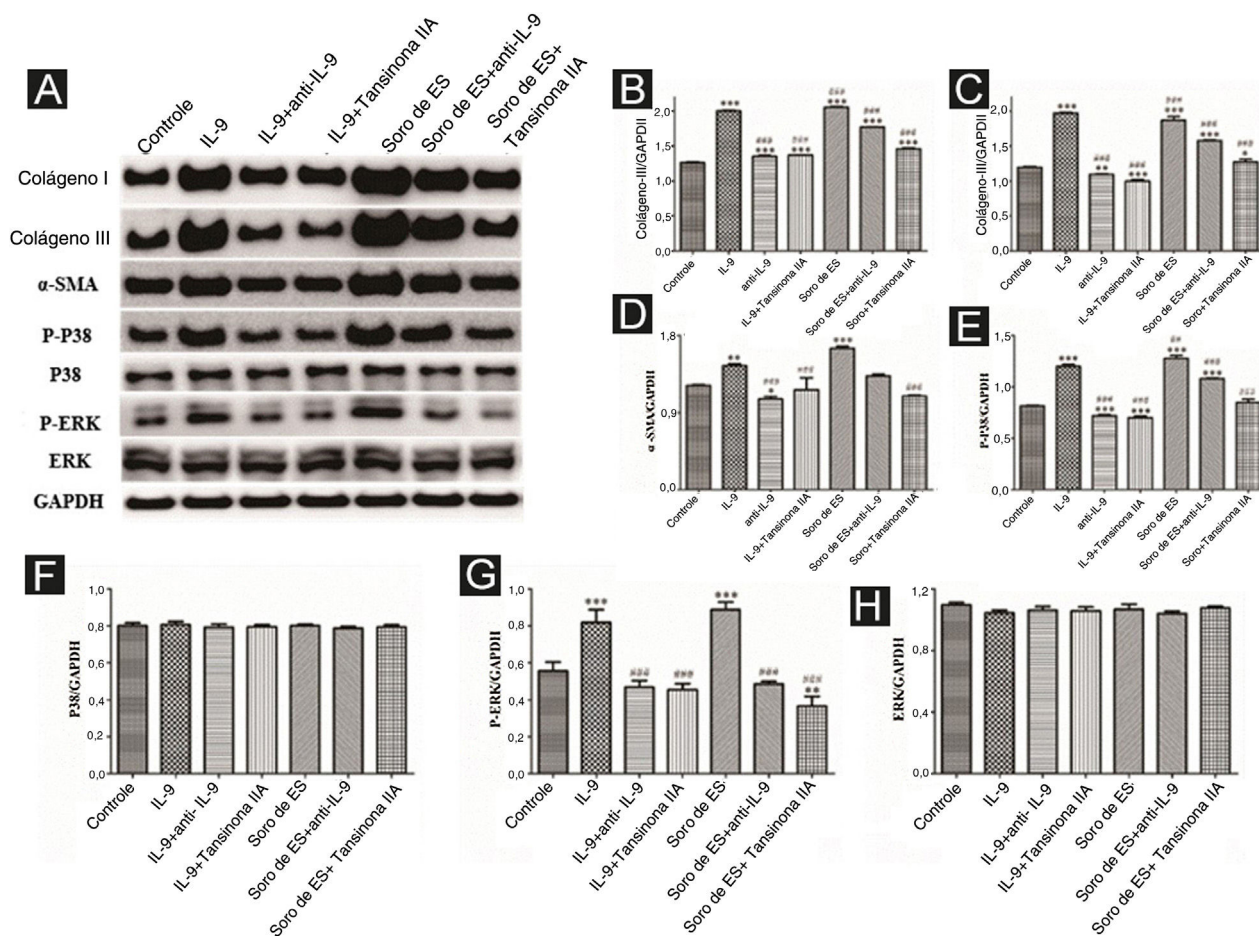


Figura 8 A expressão de várias proteínas relacionadas à fibrose e proteínas relacionadas à via de sinalização em CMLVD funcionalmente ativadas foi detectada por *Western blotting*. (A) Bandas imunorreativas de *Western blotting* de várias proteínas. A IL-9 promove a expressão de várias proteínas em CMLVD, que é inibida pela tansinona IIA. (B–H) Dados de *Western blotting* de colágeno I, colágeno III, α -SMA, P-P38, P-ERK e ERK são representados como gráficos estatísticos.

e P-ERK. Além disso, o anticorpo neutralizante de IL-9 e a tansinona IIA revertem os efeitos da IL-9 e do soro de ES (fig. 8).

IL-17 e soro de ES promovem a ativação funcional de CMLVD, e tansinona IIA reverte esse efeito

As CMLVD foram incubadas com IL-17, IL-17 e anticorpos neutralizantes de IL-17, IL-17 e tansinona IIA, soro de ES, soro de ES e anticorpos neutralizantes de IL-17 e soro de ES e tansinona IIA por três dias. Colágeno I, colágeno III, α -SMA, P-P38, P38, P-ERK e ERK foram detectados por WB. Os resultados mostraram que a IL-17 e o soro de ES promovem significativamente a expressão de colágeno I, colágeno III, α -SMA, P-P38 e P-ERK. O anticorpo neutralizante de IL-17 e a tansinona IIA revertem os efeitos da IL-17 e do soro de ES (fig. 9).

Tansinona IIA inibe o efeito sinérgico de IL-9 e IL-17 na ativação funcional de CMLVD

As CMLVD foram tratadas com IL-17, IL-9, IL-17 e IL-9, anticorpo neutralizante de IL-17 e anticorpo neutralizante de IL-9, IL-17 e IL-9 e tansinona IIA, soro de ES, soro de ES/anticorpo neutralizante de IL-17/anticorpo

neutralizante de IL-9 e soro de ES e tansinona IIA por três dias. As proteínas foram coletadas para detecção por WB de colágeno I, colágeno III, α -SMA, P-P38, P38, P-ERK e ERK. Os resultados mostraram que a IL-17, IL-9 e soro de ES promovem significativamente a expressão de colágeno I, colágeno III, α -SMA, P-P38 e P-ERK. Além disso, os anticorpos neutralizantes de IL-9 e IL-17 e a tansinona IIA inibiram o efeito sinérgico de IL-9 e IL-17 (fig. 10).

Discussão

Th9, um subconjunto definido de células T-helper, foi identificado pela potente produção de IL-9, proteína de 144 aminoácidos com sequência de sinal secretor de 18 aminoácidos.¹⁶ Curiosamente, a IL-9 se liga ao IL-9R em células-alvo.¹⁷ Embora o papel do subconjunto de células Th9 tenha sido descrito recentemente em muitos tipos de doenças inflamatórias (especificamente, doenças atópicas, inflamação parasitária, encefalomielite autoimune experimental e doenças inflamatórias intestinais),¹⁸⁻²³ o papel na patogênese de doenças reumáticas, como ES, ainda é desconhecido.

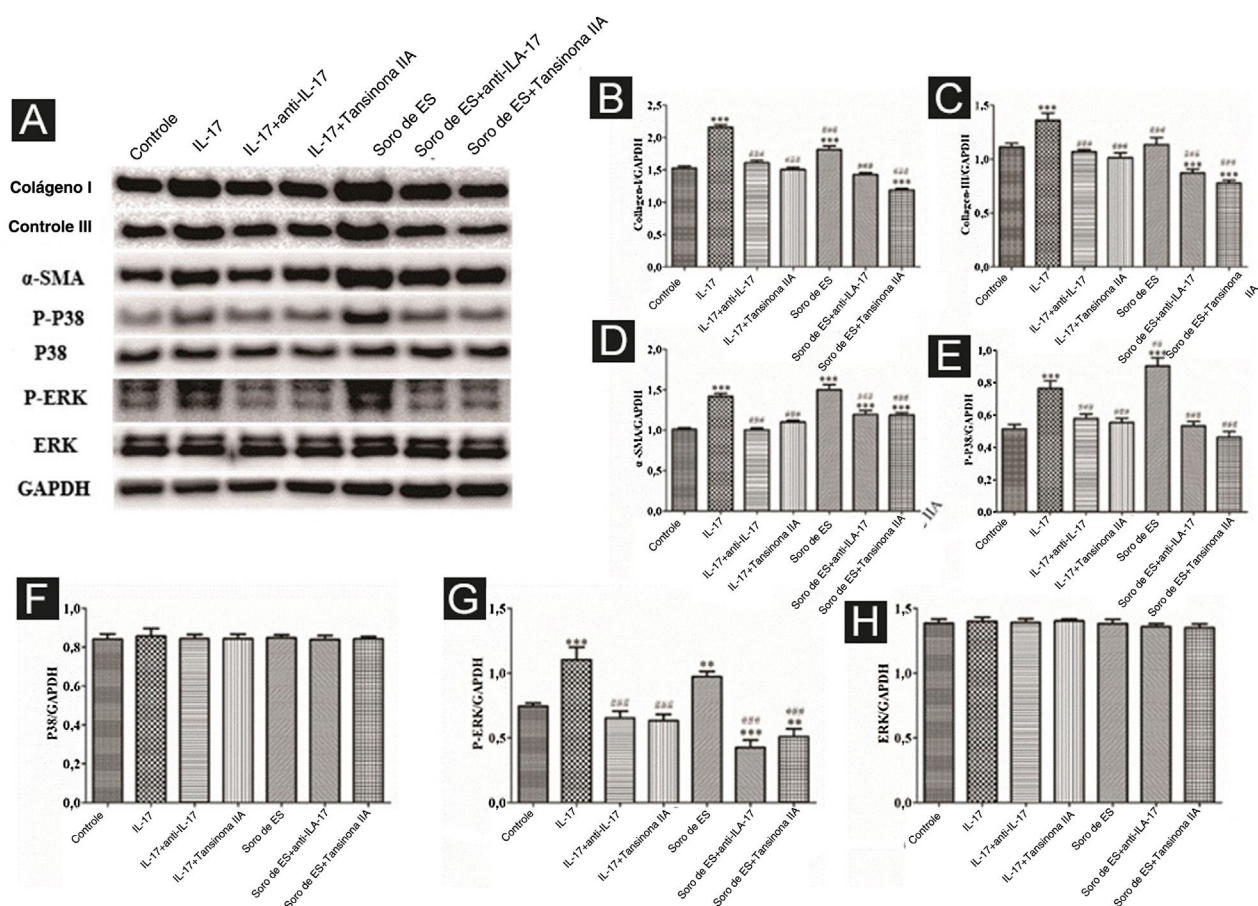


Figura 9 A expressão de várias proteínas relacionadas à fibrose e proteínas relacionadas à via de sinalização em CMLVD funcionalmente ativadas foi detectada por *Western blotting*. (A) Bandas imunorreativas de *Western blotting* de várias proteínas. A IL-17 promove a expressão de várias proteínas em CMLVD, que é inibida pela tansinona IIA. (B–H) Os resultados de *Western blotting* de colágeno I, colágeno III, α -SMA, P-P38, P-ERK e ERK são expressos na forma de gráficos estatísticos.

A presença de altos níveis de IL-9 e a forte expressão de Th9 na ES questionam a possível participação das células Th9 na patogênese da ES. No presente estudo, houve forte expressão de IL-9R que foi demonstrada recentemente no tecido cutâneo de pacientes com ES. Além disso, a expressão de IL-9 foi observada nas CMSP de pacientes com ES. A maioria das células produtoras de IL-9 na pele foram identificadas como células Th9. Entre as células mononucleares do sangue periférico, as células Th9 são a principal fonte de IL-9, que está significativamente aumentada em pacientes com ES em comparação com os controles. A participação de IL-9 e Th9 no processo de inflamação e fibrose na ES ainda precisa ser elucidada.

A pesquisa anterior do autor confirmou que IL-17 e Th17 aumentam a proliferação, síntese e secreção de colágeno e a migração de CMLVD derivadas de pacientes com ES por meio da via de sinalização de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPKs).⁹ Além disso, o estudo anterior também demonstrou que a tansinona IIA (C19H18O3), um componente farmacologicamente ativo lipossolúvel da erva chinesa *S. miltiorrhiza*, conhecido medicamento fitoterápico tradicional chinês usado no tratamento de doenças cardiovasculares e do tecido conjuntivo, exerce

efeito inibitório na ativação funcional de CMLVD derivadas de pacientes com ES.¹⁰

O presente estudo se concentra nos efeitos das células Th17 e Th9 em CMLVD derivadas de pacientes com ES. O autor também estudou o efeito regulador da tansinona IIA nesse processo. Th17 e Th9 promovem sua diferenciação de linfócitos T imaturos por meio das citocinas características IL-17 e IL-9. IL-17, IL-9 e soro de ES promoveram a expressão de colágeno I, colágeno III, α -SMA, P-P38 e P-ERK, induzindo a ativação funcional de CMLVD. O aumento da síntese de colágeno e secreção de CMLVD indica o agravamento da angiopatia e fibrose na ES. Entretanto, os anticorpos neutralizantes de IL-17 e IL-9 e a tansinona IIA reverteram os efeitos.

Vários aspectos das evidências da pesquisa demonstraram a estreita associação de Th9 com o desenvolvimento de células Th17. Primeiro, a IL-9 poderia induzir a diferenciação de células T-CD4+ virgens em células Th17. Segundo, a IL-9 amplifica o desenvolvimento de Th17 em um *loop* autócrino positivo. Além disso, a IL-9 pode estar envolvida no desenvolvimento de doenças autoimunes por meio de inflamação e vasculopatia associadas a Th17. Consistente com a relação entre IL-9 e desenvolvimento de células Th17,

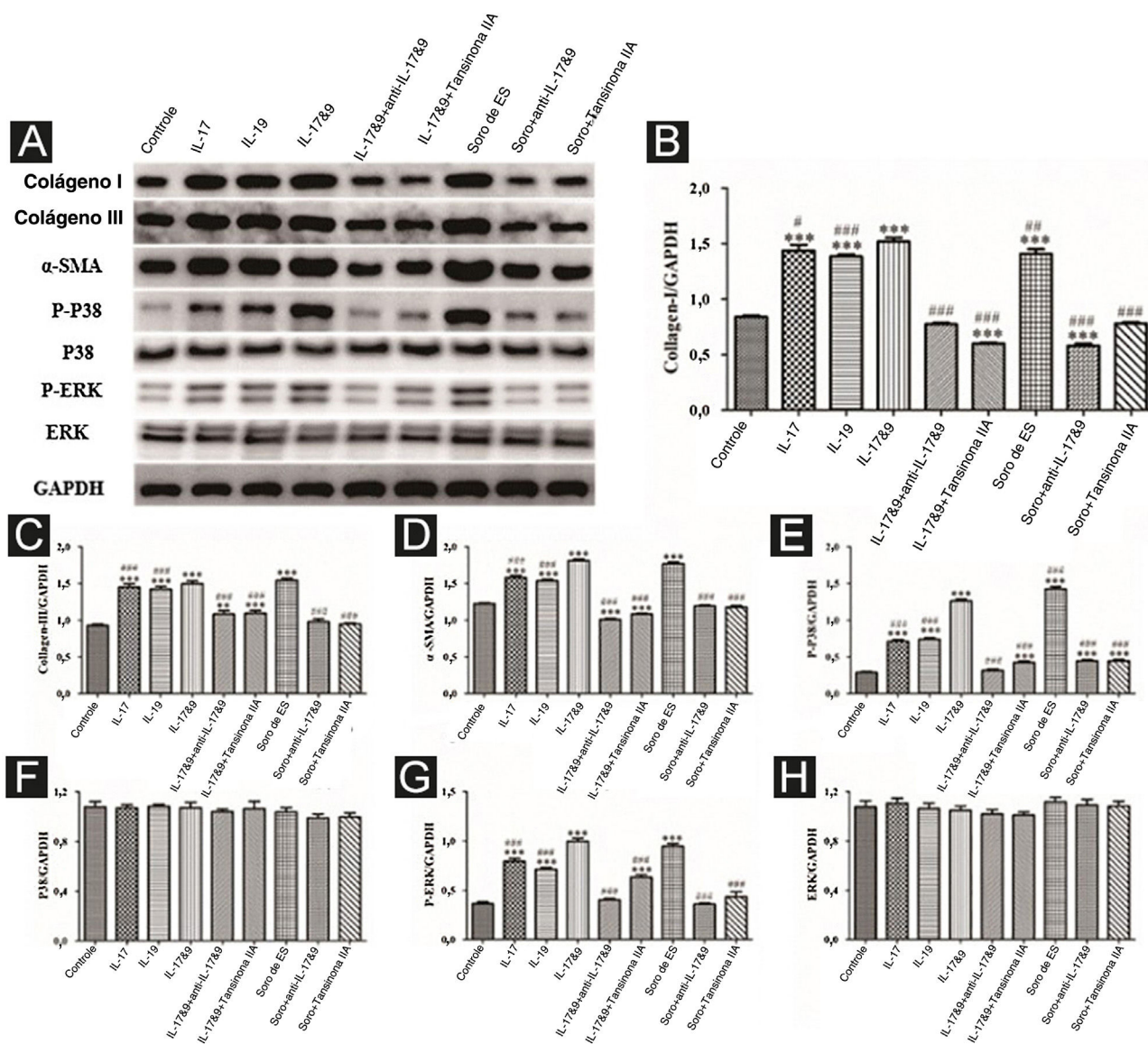


Figura 10 A expressão de várias proteínas relacionadas à fibrose e relacionadas à via de sinalização em CMLVD funcionais ativadas foi detectada por *Western blotting*. (A) Bandas imunorreativas de *Western blotting* de várias proteínas. IL-9 e IL-17 desempenham papel sinérgico na promoção da expressão de várias proteínas em CMLVD, que é inibida pela tansinona IIA. (B-H) Dados de *Western blotting* de colágeno I, colágeno III, α -SMA, P-P38, P-ERK e ERK são representados como gráficos.

uma correlação positiva de células Th9 com células Th17, bem como de IL-9 com IL-17, foi observada em pacientes com ES, indicando que Th9/IL-9 e Th17/IL-17 podem estar envolvidas de maneira cooperativa na patogênese da ES. Entretanto, o mecanismo exato pelo qual Th9 e Th17 regulam umas às outras durante o desenvolvimento da ES permanece incerto e requer mais investigações.

Conclusões

Os resultados desse estudo revelaram o efeito da interação de células T na ativação funcional de CMLVs na ES. Assim, detectou-se a correlação entre a anormalidade imune celular e a angiogênese na patogênese da ES, o que fornece

uma base teórica e experimental para encontrar novos alvos terapêuticos e medicamentos para a ES.

Suporte financeiro

Este trabalho recebeu suporte financeiro da National Natural Science Foundation of China (81602747).

Contribuição do autor

Mengguo Liu projetou e conduziu os experimentos, realizou a análise estatística e escreveu e revisou o manuscrito.

Conflito de interesses

Nenhum.

Agradecimentos

O autor agradece a todos os pacientes que participaram do estudo.

Referências

- Pillai S. T and B lymphocytes in fibrosis and systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol.* 2019;31:576–81.
- Shi X, Liu Q, Zhao H, Lu J, Huang Y, Ma Y, et al. Increased expression of GAB1 promotes inflammation and fibrosis in systemic sclerosis. *Exp Dermatol.* 2019;28:1313–20.
- Henry TW, Mendoza FA, Jimenez SA. Role of microRNA in the pathogenesis of systemic sclerosis tissue fibrosis and vasculopathy. *Autoimmun Rev.* 2019;18:102396.
- Di Benedetto P, Ruscitti P, Liakouli V, Cipriani P, Giacomelli R. The Vessels Contribute to Fibrosis in Systemic Sclerosis. *Isr Med Assoc J.* 2019;21:471–4.
- Trojanowska M. Cellular and molecular aspects of vascular dysfunction in systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol.* 2010;6:453–60.
- Jun JB, Kuechle M, Harlan JM, Elkon KB. Fibroblast and endothelial apoptosis in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol.* 2003;15:756–60.
- Yang X, Yang J, Xing X, Wan L, Li M. Increased frequency of Th17 cells in systemic sclerosis is related to disease activity and collagen overproduction. *Arthritis Res Ther.* 2014;16:R4.
- Xing X, Yang J, Yang X, Wei Y, Zhu L, Gao D, et al. IL-17A induces endothelial inflammation in systemic sclerosis via the ERK signaling pathway. *Plos One.* 2013;8:e85032.
- Liu M, Yang J, Xing X, Cui X, Li M. Interleukin-17A promotes functional activation of systemic sclerosis patient-derived dermal vascular smooth muscle cells by extracellular-regulated protein kinases signalling pathway. *Arthritis Res Ther.* 2014; 16:4223.
- Liu M, Yang J, Li M. Tanshinone IIA attenuates interleukin-17A-induced systemic sclerosis patient-derived dermal vascular smooth muscle cell activation via inhibition of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. *Clinics (Sao Paulo).* 2015;70:250–6.
- Liu M, Wu W, Sun X, Yang J, Xu J, Fu W, et al. New insights into CD4(+) T cell abnormalities in systemic sclerosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016;28:31–6.
- Guggino G, Lo PM, Di Liberto D, Rizzo A, Cipriani P, Ruscitti P, et al. Interleukin-9 over-expression and T helper 9 polarization in systemic sclerosis patients. *Clin Exp Immunol.* 2017;190:208–16.
- Ciccia F, Guggino G, Ferrante A, Cipriani P, Giacomelli R, Triolo G. Interleukin-9 and T helper type 9 cells in rheumatic diseases. *Clin Exp Immunol.* 2016;185:125–32.
- Nowak EC, Weaver CT, Turner H, Begum-Haque S, Becher B, Schreiner B, et al. IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease. *J Exp Med.* 2009;206:1653–60.
- Elyaman W, Bradshaw EM, Uyttenhove C, Dardalhon V, Awasthi A, Imitola J, et al. IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:12885–90.
- Li J, Chen S, Xiao X, Zhao Y, Ding W, Li XC. IL-9 and Th9 cells in health and diseases-From tolerance to immunopathology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2017;37:47–55.
- Smedt M, Verhasselt B, Kerre T, Vanhecke D, Naessens E, Leclercq G, et al. Signals from the IL-9 receptor are critical for the early stages of human intrathymic T cell development. *J Immunol.* 2000;164:1761–7.
- Kerzerho J, Maazi H, Speak AO, Szely N, Lombardi V, Khoo B, et al. Programmed cell death ligand 2 regulates TH9 differentiation and induction of chronic airway hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131:1048–57.
- Nallegew N, Chiriach MT, Podstawa E, Lehmann C, Rau TT, Atreya R, et al. IL-9 and its receptor are predominantly involved in the pathogenesis of UC. 2015;64:743–55.
- Weigmann B, Neurath MF. Th9 cells in inflammatory bowel diseases. *Semin Immunopathol.* 2017;39:89–95.
- Elyaman W, Khoury SJ. Th9 cells in the pathogenesis of EAE and multiple sclerosis. *Semin Immunopathol.* 2017;39:79–87.
- Angkasekwinai P. Allergic Inflammation and Atopic Disease: Role of Th9 Cells. *Methods Mol Biol.* 2017;1585:189–99.
- Pinto M, Licona-Limon P. Th9 Cells and Parasitic Inflammation: Use of *Nippostrongylus* and *Schistosoma* Models. *Methods Mol Biol.* 2017;1585:223–45.