



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

ANDERSON RODRIGUES DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA E ANTIFIBRÓTICA DA
VITAMINA D NA ESCLEROSE SISTÊMICA**

Recife
2018

ANDERSON RODRIGUES DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA E ANTIFIBRÓTICA DA
VITAMINA D NA ESCLEROSE SISTÊMICA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Orientadora: Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta

Co-orientadoras: Profa. Dra. Michelly Cristiny Pereira

Profa. Dra. Andréa Tavares Dantas

Recife

2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Almeida, Anderson Rodrigues de

Avaliação da atividade imunomoduladora e antifibrótica da vitamina D na esclerose sistêmica / Anderson Rodrigues de Almeida. – 2018.

95 f. : il.

Orientadora: Maira Galdino da Rocha Pitta.

Coorientadores: Michelly Cristiny Pereira, Andrea Tavares Dantas

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2018.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Escleroderma sistêmico. 2. Vitamina D. I. Pitta. Maria Galdino da Rocha (Orientadora). II. Pereira, Michelly Cristiny (Coorientadora) III. Dantas, Andrea Tavares (Coorientadora). VI. Título.

616.7

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 219

ANDERSON RODRIGUES DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA E ANTIFIBRÓTICA DA
VITAMINA D NA ESCLEROSE SISTÊMICA**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de
Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em
Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 26/02/2018

BANCA EXAMINADORA

Profa.Dra.Angela Luzia Branco Pinto Duarte

Instituição: Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE)

Assinatura: _____

Profa.Dra.Valdênia Maria Oliveira de Souza

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Assinatura: _____

Profa.Dra.Mariana Brayner Cavalcanti Freire Bezerra

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois em todos os momentos ele se faz presente em minha vida;

Aos meus pais, Edson e Adriana, por toda dedicação, apoio, ensinamentos, tudo o que fizeram e fazem até hoje para que eu possa seguir os melhores caminhos, toda gratidão à vocês.

À minha irmã, Érika, pela alegria de sempre e por todo carinho.

À minha noiva, Anna Paula, pela paciência, compreensão, incentivo e grande ajuda, você torna tudo melhor;

À minha bisavó, Antônia (*in memoriam*), por ter me ensinado tantas coisas, por ter sido sempre tão presente em minha vida, muitas saudades;

À minha avó, Cícera, pelo acolhimento e cuidado de sempre, por me dar todo o apoio necessário nessa jornada;

À toda minha família, que me apoia e está comigo em todos os momentos;

À Profa.Maira Pitta, minha orientadora, pelo grande apoio, confiança, incentivo e por sempre buscar o melhor para minha formação;

Às minhas co-orientadoras, Andréa e Michelly, por sempre me acompanharem tão de perto, pelo cuidado na construção do trabalho e pelos ensinamentos;

Ao prof.Moacyr, pela atenção e pelas grandes contribuições;

À todos do LINAT, especialmente Wanessa, Kamila, Eudes, Priscilla, Pablo, Marina, Maria Andreza, pela inestimável ajuda, pela companhia diária;

Aos amigos que sempre estão presentes e fazem tudo ser mais fácil, especialmente a Elaine, Sâmara, Eudes e Kamila;

À equipe do serviço de Reumatologia do HC-UFPE, especialmente a Andréa, Rafaela e Dra.Angela, pela parceria e pela grande ajuda;

Ao secretário do PPGIT, Paulo, que sempre nos ajuda com tanta competência e atenção;

À equipe do Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP, especialmente a Marina Cadena,
Kleber Jatahy e Profa. Leuridan, pela grande contribuição;

Aos pacientes com esclerose sistêmica, os grandes motivadores de todo o trabalho, sem eles
não seria possível desenvolver esse projeto.

A todas as pessoas que estiveram comigo e me ajudaram na realização do estudo.

RESUMO

A Esclerose sistêmica (ES) é uma doença do tecido conjuntivo, caracterizada pela fibrose da pele e de órgãos internos, alterações vasculares e presença de autoanticorpos. Poucas terapias eficazes existem até o momento para tratamento da ES, e a maior parte é direcionada para os sintomas, não existindo nenhuma modalidade terapêutica que atue comprovadamente no envolvimento fibrótico da doença. A vitamina D atua nas células do sistema imunológico, regulando a produção de citocinas, além de promover a redução de marcadores fibróticos. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar a atividade imunomoduladora e antifibrótica da vitamina D na ES. Foram incluídos no estudo 36 pacientes com ES atendidos no serviço de reumatologia do HC-UFPE. A resposta ao tratamento *in vitro* foi realizada em cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) estimuladas com anti-CD3 e anti-CD28 de 21 pacientes com ES e 10 controles saudáveis e em fibroblastos saudáveis de pele (HFF-1) e pulmão (MRC-5) estimulados com fator transformador do crescimento- β (TGF- β). As células foram tratadas com a 1,25-dihidroxivitamina D3 (1,25 (OH) $_2$ D3) em diferentes concentrações (0,1, 1, 10 e 100 nM) e a dexametasona (1.000 nM) foi utilizada como controle positivo. Adicionalmente foi realizada a dosagem da 25 (OH) vitamina D sérica pela técnica de quimioluminescência em 36 pacientes e 36 controles saudáveis pareados por sexo e idade. As dosagens das citocinas presentes no sobrenadante nas culturas de PBMC foram realizadas utilizando o ELISA ou CBA. A avaliação da expressão gênica foi realizada por PCR em tempo real após extração do RNA dos fibroblastos. Observamos que 63,8% dos pacientes com ES apresentavam insuficiência de vitamina D e níveis séricos mais baixos quando comparados com os controles saudáveis ($p= 0.04$). O tratamento com a 1,25 (OH) $_2$ D3 promoveu redução significativa nos níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-17F, IFN- γ e TNF em sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes com ES, além disso, observou-se um aumento nos níveis de IL-10 e IL-4. O tratamento com 1,25 (OH) $_2$ D3 em culturas de fibroblastos de pele reduziu significativamente a expressão gênica de ACTA2 ($p<0.05$). Adicionalmente, vimos que a dexametasona promoveu redução nos níveis de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-17F, IFN- γ , TNF e IL-1 β . Com base nos resultados obtidos, sugere-se a vitamina D como um possível agente terapêutico para o tratamento da ES. Ademais, os resultados vistos com a dexametasona esclarecem os efeitos desempenhados por esse medicamento *in vitro* e podem dar suporte para novas possibilidades de investigação do papel da molécula desempenhado *in vivo*.

Palavras-chave: Esclerose sistêmica. Vitamina D. Citocinas. Inovação Terapêutica.

ABSTRACT

Systemic sclerosis (SSc) is a connective tissue disease characterized by fibrosis of the skin and internal organs, vascular changes and the presence of autoantibodies. Few effective therapies exist to date for treatment of SSc, and most are directed at symptoms, and there is no therapeutic modality that acts demonstrably in the fibrotic involvement of the disease. Vitamin D acts on the cells of the immune system, regulating the production of cytokines, in addition to promoting the reduction of fibrotic markers. Thus, the objective of this study was to evaluate the immunomodulatory and antifibrotic activity of vitamin D in SSc. The study included 36 patients with SSc from the rheumatology department of the HC-UFPE. The response to *in vitro* treatment was performed in anti-CD3 and anti-CD28 stimulated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 21 SSc patients and 10 healthy controls and in healthy skin (HFF-1) and lung (MRC-5) fibroblasts stimulated with transforming growth factor- β (TGF- β), the cells were treated with 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25 (OH)₂ D₃) at different concentrations (0.1, 1, 10 and 100 nM) and dexamethasone (1.000 nM) was used as a positive control. In addition, 25 (OH) vitamin D serum was measured by chemiluminescence in 36 patients and 36 healthy controls matched by sex and age. The dosage of the cytokines present in PBMC cultures supernatant were performed using the ELISA or CBA. Gene expression evaluation was performed by real-time PCR after extraction of RNA from fibroblasts. We observed that 63.8% of SSc patients had vitamin D insufficiency and lower serum levels when compared to healthy controls ($p= 0.04$). The treatment with 1,25 (OH)₂ D₃ promoted significant reduction in IL-2, IL-4, IL-6, IL-17A, IL-17F, IFN- γ and TNF levels in the supernatant PBMC culture of SSc patients, in addition, an increase in IL-10 and IL-4 levels was observed. Treatment with 1,25 (OH)₂ D₃ in cultures of skin fibroblasts significantly reduced gene expression of ACTA2 ($p<0.05$). In addition, we found that dexamethasone reduced IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-17F, IFN- γ , TNF and IL-1 β levels. Based on the results obtained, vitamin D is suggested as a possible therapeutic agent for the treatment of SSc. In addition, the results seen with dexamethasone clarify the effects of this drug *in vitro* and may support new possibilities for investigation the role of the molecule performed *in vivo*.

Keywords: Systemic sclerosis. Vitamin D. Cytokines. Therapeutic innovation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Espessamento cutâneo e alteração de pigmentação em mãos de pacientes com ES.....	20
Figura 2 -	A. Fenômeno de Raynaud B. Úlceras digitais e necrose em polpas digitais.....	21
Figura 3 -	Fisiopatogênese da esclerose sistêmica. Interação entre vasculopatia, desregulação imunológica e fibrose.....	23
Figura 4 -	Fibroblasto e mediadores do processo fibrótico.....	32
Figura 5 -	Células precursoras do miofibroblasto e mediadores da diferenciação.	33
Figura 6 -	Estrutura química da 1,25-dihidroxitamina D ₃	45
Figura 7 -	Níveis séricos de 25 (OH) vitamina D em pacientes com esclerose sistêmica (ES) e controles saudáveis.....	52
Figura 8 -	Avaliação do efeito da 1,25 (OH) ₂ D ₃ na produção de citocinas em culturas de PBMC de pacientes com esclerose sistêmica.....	54
Figura 9 -	Avaliação do efeito da 1,25 (OH) ₂ D ₃ na produção de citocinas em culturas de PBMC de controles saudáveis.....	56
Figura 10 -	Avaliação do efeito da 1,25 (OH) ₂ D ₃ na expressão de ACTA2, COL1A1 e IL6 em fibroblastos saudáveis de pele (HFF-1) (A) e pulmão (MRC-5) (B).....	57
Figura 11 -	Efeitos da dexametasona <i>in vitro</i> em PBMC de pacientes com esclerose sistêmica.....	58
Figura 12 -	Efeitos da dexametasona <i>in vitro</i> em PBMC de voluntários saudáveis..	60
Figura 13 -	Efeito da dexametasona <i>in vitro</i> em PBMC de pacientes com esclerose sistêmica usando glicocorticoides (GC+) ou não (GC-).....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Citocinas avaliadas pela técnica ELISA, fabricantes e limites de detecção.....	48
Tabela 2 -	Citocinas do kit CBA Humano Th1/Th1/Th17 e limites de detecção.....	48
Tabela 3 -	Comparação das características clínicas entre as formas cutânea difusa e limitada de pacientes com Esclerose Sistêmica do estudo.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,25(OH) ₂ D ₃	1,25- dihydroxyvitamin D ₃ (1,25-dihidroxivitamina D ₃)
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
ANA	Anticorpos anti-nucleares
Anti-RNAP	Anticorpo anti-RNA polimerase
Anti-SCI70	Anticorpo anti-DNA topoisomerase I
BANK 1	<i>B-cell scaffold protein with ankryn repeats 1</i>
CD	Cutânea Difusa
CL	Cutânea Limitada
CTGF	<i>Connective tissue growth factor</i> (Fator de crescimento do tecido conectivo)
DEX	Dexametasona
DPI	Doença Pulmonar Intersticial
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition (Transição epitelial-mesenquimal)
ES	Esclerose Sistêmica
ET1	<i>Endothelin 1</i> (Endotelina 1)
EULAR	<i>European League Against Rheumatism</i>
FRy	Fenômeno de Raynauld
GC	Glicocorticoides
HAP	Hipertensão Arterial Pulmonar
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i> (Molécula de adesão intracelular 1)
IECA	Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IL23R	Receptor da Interleucina 23
IL-6R	Receptor da IL-6
IRF5	<i>Interferon regulatory factor 5</i> (Fator regulador do interferon 1)
iTreg	T regulatórias induzidas
JNK	<i>C-Jun N-Terminal Kinases</i>
LAP	<i>Latency-associated peptide</i> (Peptídeo associado à latência)
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinases</i> (Proteínas-quinases ativadas por mitógenos)
MEC	Matriz extracelular

MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MMP	Metaloproteinases de matriz
NO	<i>Nitric oxide</i> (Óxido nítrico)
NOS	<i>Nitric oxide synthase</i> (Óxido nítrico sintetase)
nTreg	T regulatórias naturais
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> (Células mononucleares do sangue periférico)
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i> (Fator de crescimento derivado de plaquetas)
pSmad2/3	Smad2/3 fosforiladas
pSmad3	Smad3 fosforilada
PTH	Paratormônio
ROR	<i>Retinoic acid nuclear orphan receptor</i>
sIL-6R	Receptor solúvel da IL-6
SLC	<i>Small latent complex</i> (Pequeno complexo latent)
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i> (Transdutor de sinal e ativador de transcrição)
STAT4	<i>Signal transducer and activators of transcription-4</i> (Transdutor de sinal e ativador de transcrição 4)
TC	Tomografia computadorizada
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i> (Fator transformador do crescimento)
TGI	Trato gastrointestinal
Th	Linfócitos T helper
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
Tr1	T regulatórias 1
Treg	T regulatória
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion protein 1</i> (Proteína de adesão celular vascular 1)
VDR	Receptor da vitamina D
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (Fator de crescimento endotelial vascular)
α -SMA	α -Actina de Músculo Liso

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS	16
1.1.1	Objetivo geral	16
1.1.2	Objetivos específicos	16
1.2	JUSTIFICATIVA	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	ESCLEROSE SISTÊMICA	19
2.1.1	Etiopatogênese	19
2.1.2	Manifestações clínicas	20
2.1.3	Fisiopatogêneses	23
2.1.3.1	Comprometimento vascular	23
2.1.3.2	Desregulação imunológica	25
2.1.3.3	Fibrose	31
2.1.4	Diagnóstico	35
2.1.5	Modalidades terapêuticas	36
2.2	VITAMINA D	37
2.2.1	Ação imunomoduladora da vitamina D	38
2.2.2	Ação antifibrótica da vitamina D	39
2.2.3	Vitamina D na esclerose sistêmica	41
3	METODOLOGIA	42
3.1	TIPO DE ESTUDO	42
3.2	LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO	42
3.3	POPULAÇÃO DO ESTUDO	42
3.3.1	Recrutamento dos pacientes com ES	42
3.3.2	Recrutamento dos voluntários saudáveis	43
3.4	DEFINIÇÃO DAS VARIÁVEIS CLÍNICAS	43
3.5	MOLÉCULAS AVALIADAS	44
3.6	ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	45
3.7	CULTIVO DOS FIBROBLASTOS	45
3.8	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA	46
3.9	COLETA DE SANGUE E CULTURA DE PBMC	46

3.10	DOSAGEM DE CITOCINAS	47
3.10.1	Dosagem de citocinas por ELISA	47
3.10.2	Dosagem de citocinas por CBA	48
3.11	DOSAGEM DA 25 (OH) VITAMINA D	48
3.12	ASPECTOS ÉTICOS	49
3.13	ANÁLISES DOS RESULTADOS	49
4	RESULTADOS	50
4.1	DETERMINAÇÃO DO PERFIL CLÍNICO DOS PACIENTES COM ESCLEROSE SISTÊMICA	50
4.2	NÍVEIS SÉRICOS DE 25 (OH) VITAMINA D EM PACIENTES COM ES E VOLUNTÁRIOS SAUDÁVEIS	51
4.3	ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	52
4.4	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA 1,25 (OH) ₂ VITAMINA D NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM PBMC DE PACIENTES COM ES E VOLUNTÁRIOS SAUDÁVEIS	52
4.5	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA 1,25 (OH) ₂ VITAMINA D NA EXPRESSÃO DE MARCADORES FIBRÓTICOS EM FIBROBLASTOS DE PELE E PULMÃO	57
4.6	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA DEXAMETASONA NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM PBMC DE PACIENTES COM ES E VOLUNTÁRIOS SAUDÁVEIS	57
5	DISCUSSÃO	63
6	CONCLUSÕES	68
7	PERSPECTIVAS	69
	REFERÊNCIAS	70
	APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) PARA PORTADORES DA ESCLEROSE SISTÊMICA	85
	APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) PARA VOLUNTÁRIOS SAUDÁVEIS	88
	ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFPE..	91

1 INTRODUÇÃO

A Esclerose Sistêmica (ES) é uma doença do tecido conjuntivo de caráter autoimune, que se caracteriza principalmente por fibrose cutânea e visceral progressivas. A ES está relacionada a significativa morbidade, com espessamento da pele, úlceras digitais, contraturas de articulações, hipertensão pulmonar, doença pulmonar intersticial, e insuficiência renal. A doença está associada a alta taxa de mortalidade, que ocorre devido a manifestações graves e ausência de tratamentos efetivos, cerca de 3,5 vezes maior que a estimativa para pessoas do mesmo sexo e idade (ZIMMERMANN; PIZZICHINI, 2013; HUDSON et al., 2009; NIKPOUR; BARON, 2014).

A fisiopatogênese da ES é complexa e ainda não está completamente compreendida, resulta da inter-relação de três mecanismos principais: a disfunção endotelial, a desregulação da imunidade inata e adaptativa e a hiperativação dos fibroblastos e células relacionadas, que resulta no desenvolvimento da fibrose (ZIMMERMANN; PIZZICHINI, 2013).

Pacientes com ES apresentam níveis séricos aumentados de citocinas Th1, Th2 e Th17 em comparação com indivíduos saudáveis. As citocinas pró-inflamatórias Th1 e Th17 parecem estar aumentadas nos estágios iniciais da doença, enquanto que as citocinas Th2 associam-se com o estágio mais tardio da doença. Estudos realizados mostram associações entre as manifestações clínicas da ES e níveis de citocinas presentes no soro e na pele de pacientes (BARAUT et al., 2010; BREMBILLA; CHIZZOLINI, 2012).

A complexa interação entre os mecanismos fisiopatogênicos da ES dificulta o desenvolvimento de uma terapia que seja eficaz. Os tratamentos da ES geralmente são determinados pela extensão e gravidade das manifestações da doença, e a maior parte é direcionada para os sintomas, não existindo nenhuma modalidade terapêutica que atue impedindo a progressão da fibrose (RAJA; DENTON, 2016; TYNDALL et al., 2009; ALLARONE et al., 2016). Os glicocorticoides são amplamente utilizados no tratamento da ES, embora faltem dados que mostrem os seus efeitos positivos no tratamento da doença, e geralmente são usados em associação com outros imunossupressores. Os efeitos terapêuticos dos glicocorticoides estão associados com reações adversas, principalmente quando usados em doses mais elevadas (IUDICI et al., 2014; IUDICI, 2017; SPIES et al., 2011).

Dessa forma, é clara a necessidade de estudos que visem a descoberta de novos tratamentos que possam ser usados para o manejo da ES. A 1,25- Dihidroxitamina D₃ atua nas células T inibindo a proliferação e produção de citocinas por essas células. Evidências mostram que a vitamina D é capaz de regular citocinas das vias Th1, Th2, Th17 e Treg (CARTONA et al., 2015). Além disso, o tratamento *in vitro* com a vitamina D promoveu redução significativa na expressão de mediadores do processo fibrótico da ES e diminuição da fibrose dérmica em modelo experimental de ES (ZEER et al., 2014). Estudos realizados mostram alta prevalência de hipovitaminose D em pacientes com ES, além de correlação com manifestações clínicas da doença (ARNSON et al., 2011; VACCA et al., 2009).

Os efeitos desempenhados pela vitamina D na modulação do sistema imunológico e na regulação de mediadores fibróticos podem representar uma boa alternativa terapêutica para o tratamento da ES, no entanto, até o presente momento não existem estudos que explorem a ação imunomoduladora da vitamina D na doença. Além disso, ainda não foi completamente compreendida a relação existente entre hipovitaminose D e ES, reforçando a necessidade de trabalhos que busquem o entendimento do papel da vitamina D na doença.

O presente estudo tem por finalidade a busca de estratégias de tratamento para a esclerose sistêmica, por meio da avaliação da atividade imunomoduladora e antifibrótica da vitamina D e da dexametasona *in vitro* na esclerose sistêmica, dos níveis séricos da vitamina D em pacientes com ES e das possíveis correlações entre os níveis de vitamina D, manifestações clínicas e resposta aos tratamentos *in vitro*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade imunomoduladora e antifibrótica da vitamina D e da dexametasona *in vitro*.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar os níveis séricos da 25 (OH) vitamina D em pacientes com Esclerose Sistêmica;

- Avaliar o efeito *in vitro* da vitamina D na modulação de citocinas relacionadas com o processo fibrótico;
- Avaliar o efeito *in vitro* da vitamina D na regulação da expressão de genes pro-fibróticos em fibroblastos de pele (HFF-1) e pulmão (MRC-5);
- Avaliar possíveis correlações entre os níveis de vitamina D, manifestações clínicas e a resposta ao tratamento com a vitamina D *in vitro*;
- Avaliar o efeito *in vitro* da dexametasona na produção de citocinas em pacientes com ES.

1.2 JUSTIFICATIVA

A esclerose sistêmica é considerada uma das mais graves doenças reumáticas autoimunes devido ao seu grande impacto na morbimortalidade dos pacientes acometidos. É uma doença que atinge preferencialmente o sexo feminino, com maior incidência dos 30 aos 50 anos, o que representa uma faixa etária economicamente ativa, e o seu alto grau de incapacidade funcional determina grandes repercussões no âmbito psicossocial e econômico

Os mecanismos fisiopatogênicos da doença são complexos e ainda não estão completamente compreendidos. Caracteriza-se essencialmente por dano vascular, desregulação imunológica e fibrose, que representa a via final comum da doença. A soma desses eventos resulta na heterogeneidade clínica da doença e reflete na dificuldade em se estabelecer um tratamento eficaz. Até o momento, as modalidades terapêuticas disponíveis para o tratamento da doença são direcionadas para os sintomas, não existindo ainda nenhum fármaco que comprovadamente atue interferindo na progressão da fibrose, e apresentam pouco impacto na evolução da doença. Neste contexto, fica clara a necessidade de estudos que visem à descoberta de novos alvos e de novos fármacos a serem utilizados no tratamento desta doença.

Estudos têm demonstrado que a vitamina D possui outras funções, além das desempenhadas no metabolismo do cálcio e formação óssea, como a interação com o sistema imunológico e propriedades antifibróticas, sugerindo um grande potencial terapêutico no tratamento da ES. Entretanto, os estudos que avaliaram os efeitos *in vitro* na ES, uma estratégia importante no entendimento do mecanismo de ação da molécula,

são ainda escassos. Sendo assim, o presente trabalho tem como finalidade avaliar efeito imunomodulador e antifibrótico *in vitro* da vitamina D na ES.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESCLEROSE SISTÊMICA

A Esclerose Sistêmica é uma doença do tecido conjuntivo, que se caracteriza pela fibrose da pele e de vários órgãos internos, alterações vasculares e presença de autoanticorpos. De acordo com a extensão e localização do acometimento cutâneo, a ES classifica-se clinicamente em: cutânea limitada (CL) e cutânea difusa (CD) (ZUO et al., 2016; ZIMMERMANN; PIZZICHINE, 2013). Trata-se de uma doença rara, cujas taxas de incidência e prevalência variam de acordo com a localização geográfica, com incidência variando de 3,7 a 22,8 por milhão de habitantes e prevalência variando de 31 a 286 por milhão de habitantes (BARNES; MAYES, 2012). Em um estudo brasileiro foram relatadas taxas de incidência de 11,9 por milhão de habitante e de prevalência de 105,6 por milhão de habitantes, dados que estão inferiores aos encontrados em estudos americanos e próximo dos estudos europeus (HORIMOTO et al., 2016). Além disso, a ES está associada ao aumento da morbidade e mortalidade (BARON, 2016).

2.1.1 Etiopatogênese

Embora os conhecimentos a respeito dos eventos etiopatogênicos da ES tenham avançado, a causa exata do surgimento da doença não é conhecida, mas possivelmente envolve fatores ambientais e genéticos (ZIMMERMANN; PIZZICHINE, 2013; ZUO et al., 2016).

Pesquisas realizadas mostram que mesmo a ES sendo considerada uma doença idiopática na maior parte dos casos, fatores ambientais podem estar relacionados com o surgimento da doença em alguns casos. A exposição à sílica e aos solventes orgânicos representam fatores de risco ambientais que podem ter associação com o desenvolvimento da ES. Além desses fatores, as exposições a agentes infecciosos, principalmente viral, também têm sido relacionadas com a etiologia da ES, como as infecções pelo citomegalovírus, parvovírus B19, Epstein-Barr e papilomavírus humano (ZIMMERMANN; PIZZICHINE, 2013; STICHERLING, 2012).

A susceptibilidade genética é outro fator que tem sido apontado por diversos estudos para o desenvolvimento da ES. Histórico familiar da doença é considerado um fator de risco importante, os parentes de primeiro grau parecem ser os mais

predisponentes ao desenvolvimento da doença em relação a população geral (STICHERLING, 2012; MAYES & TROJANOWSKA, 2007; ARNETT et al., 2001; ENGLERT et al., 1999). Vários estudos buscam descobrir os genes que podem estar envolvidos no aumento da susceptibilidade ao desenvolvimento da ES e na progressão da doença. Os genes da região do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) são os que apresentam maiores indícios de associação com a ES, essa região reúne genes que desempenham importantes funções do sistema imunológico (NAVARRO; BUSTOS, 2006; STICHERLING, 2012; JIN et al., 2014).

2.1.2 Manifestações clínicas

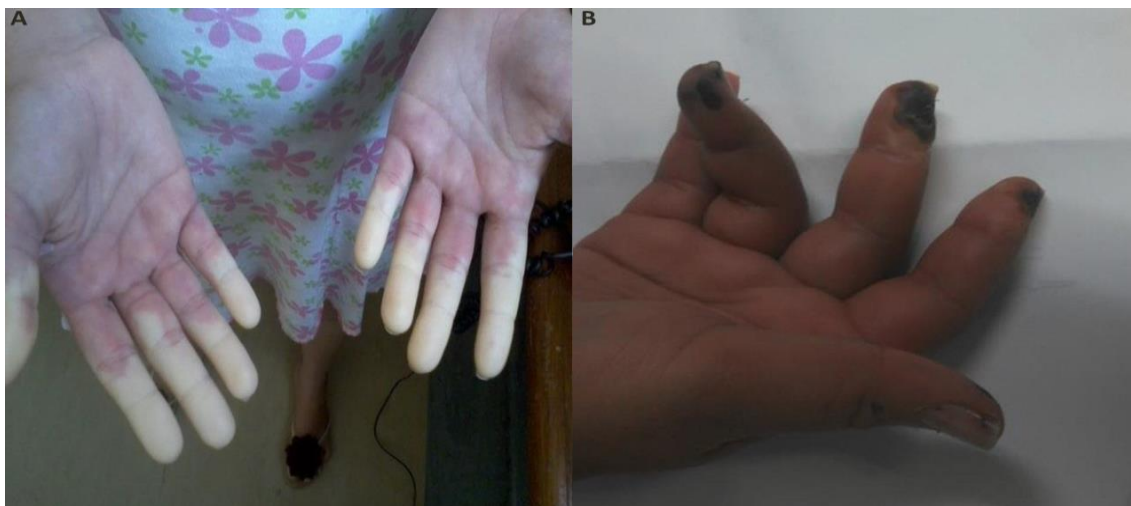
A fibrose da pele representa o comprometimento cutâneo mais característico da ES (Figura 1). De acordo com a natureza e extensão do envolvimento cutâneo, a ES classifica-se em duas formas clínicas: a cutânea limitada (CL) e a cutânea difusa (CD). A CL é a forma de maior ocorrência e o espessamento da pele é restrito à face e às extremidades, essa forma clínica costuma ter uma progressão mais lenta. Enquanto que a CD tem um início mais rápido, e se caracteriza por um comprometimento mais extenso da pele, acometendo além da face e extremidades, os membros e o tronco. Os pacientes podem desenvolver outras manifestações cutâneas além do espessamento da pele, como telangiectasias, calcinose e microstomia, que é a limitação da abertura da boca (KRIEG; TAKEHARA, 2009).

Figura 1. Espessamento cutâneo e alteração de pigmentação em mãos de paciente com ES (Banco de imagens do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas – HC – UFPE).



A disfunção vascular crônica também está presente nos pacientes com ES, inicialmente se manifesta com alterações de vasoconstricção e vasodilatação reversíveis e progridem para alterações estruturais ou vasculopatia da microcirculação. O fenômeno de Raynaud (FRy) se manifesta em aproximadamente 95% dos pacientes, é resultado de uma resposta vasoconstrictora alterada ao frio e/ou estresse que causa espasmo de arteríolas cutâneas e resulta em palidez cutânea e cianose, e pode preceder em anos o desenvolvimento dos demais sintomas da doença (Figura 2A) (FLAVAHAN et al., 2003). As úlceras digitais ocorrem em cerca de 30% dos pacientes, e são resultantes de vasculopatias primárias que podem levar ao espessamento da camada íntima dos vasos e oclusão do lúmen (Figura 2B). As úlceras digitais têm etiologia multifatorial, podendo estar associadas à isquemia, microtraumas repetitivos, esclerodactilia e calcinose (STEEN et al., 2010).

Figura 2. A. Fenômeno de Raynaud B. Úlceras digitais e necrose em polpas digitais (Banco de imagens do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas – HC – UFPE).



Alterações pulmonares também podem ser comuns em pacientes, e inclui a doença pulmonar intersticial (DPI), que pode evoluir com fibrose pulmonar, e a hipertensão arterial pulmonar (HAP), que é resultante da doença vascular pulmonar. Os sinais clínicos do envolvimento pulmonar incluem dispneia, tosse, dor torácica e fadiga. As manifestações pulmonares são a principal causa de morbimortalidade dos pacientes com

ES. DPI pode representar até 16% das mortes em ES. A HAP está presente em aproximadamente 12% dos pacientes com ES e tem uma taxa de mortalidade de 50% nos três anos subsequentes ao diagnóstico (WELLS et al., 2009; CHAISSON; HASSOUN, 2013).

O trato gastrointestinal (TGI) é frequentemente afetado na ES, podendo ser o segundo local mais comum de acometimento da doença, presente tanto em pacientes com a forma CL quanto com a CD. O aspecto fibrótico da doença é que se desenvolve nos órgãos do TGI, promovendo alterações na motilidade, digestão e excreção. Dessa forma, os pacientes podem apresentar refluxo gastroesofágico, incontinência fecal, constipação, disfagia, retardo no esvaziamento gástrico, manifestações que apresentam importantes valores para prognóstico, morbidade e mortalidade (FORBES; MARIE, 2008).

O envolvimento cardíaco é frequentemente secundário a manifestações da doença em outros órgãos, rins ou pulmões, mas pode surgir também como resposta primária, podendo desenvolver fibrose miocárdica, neuropatia autonômica, envolvimento de pequenos vasos coronarianos ou do pericárdio. Assim, várias anormalidades podem surgir dependendo da estrutura afetada, incluindo arritmias cardíacas, derrame pericárdico, isquemia, hipertrofia ou fibrose com ou sem insuficiência cardíaca (ALMEIDA et al., 2011).

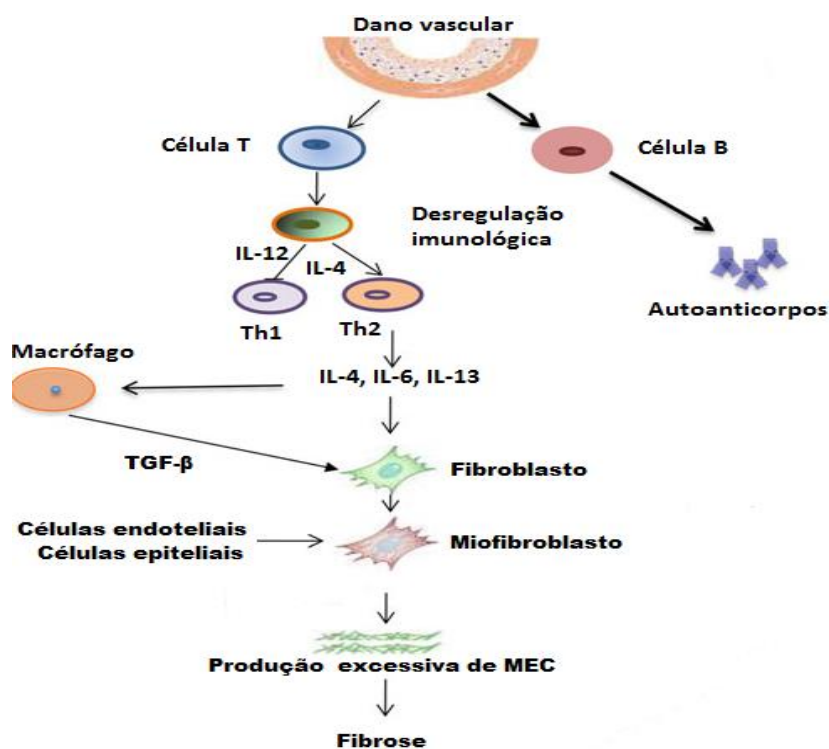
A crise renal esclerodérmica representa o envolvimento renal na ES, e já foi considerada a complicação mais grave da doença, por ter sido a principal causa de morte nos pacientes. Com o desenvolvimento de inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA), a crise renal esclerodérmica se tornou uma manifestação passível de tratamento, embora alguns pacientes tenham resultados desfavoráveis e evoluam com necessidade de terapia substitutiva renal (STEEN, 2014).

O envolvimento músculo-esquelético é comum na ES. Manifesta-se com o acometimento de articulações, que afeta de 46 – 95% dos pacientes na forma de artralgia, contratura articular e artrite, e a miopatia, que é um grupo heterogêneo de distúrbios musculares que inclui fraqueza muscular, mialgia e elevação de enzimas musculares (MORRISROE et al., 2015; ALMEIDA et al., 2011).

2.1.3 Fisiopatogênese

A fisiopatogênese da ES é complexa e incompletamente compreendida, sendo composta por três eventos principais, que são: o dano vascular de pequenas artérias e arteríolas, a desregulação imunológica e a fibrose, que representa a via final comum da doença e acomete a pele e vários órgãos internos (Figura 3). A soma desses eventos fisiopatogênicos resulta na heterogeneidade de expressão fenotípica da doença (KUMAR et al., 2017; ZIMMERMANN; PIZZICHINI, 2013).

Figura 3. Fisiopatogênese da esclerose sistêmica. Interação entre vasculopatia, desregulação imunológica e fibrose.



Fonte: modificado de KUMAR et al., 2017.

2.1.3.1 Comprometimento vascular

A vasculopatia é uma manifestação de grande importância na ES, estando presente em quase todos os indivíduos acometidos pela doença. Os pacientes apresentam diferentes graus de comprometimento vascular, resultantes do desequilíbrio entre os

vasodilatadores e vasoconstrictores (NAVARRO; BUSTOS, 2006). Não se sabe qual o fator inicial desencadeante dos danos vasculares na ES, mas a partir desse fator determinante, iniciam-se uma série de alterações que resultam em mudanças iniciais da microcirculação e culminam com o desenvolvimento de fibrose. Essa série de alterações levam a um comprometimento na microcirculação, disfunção endotelial, alteração de angiogênese e vasculogênese, ativação crônica de plaquetas e vasoconstrição contínua (SEGURA; FERRAZ-AMARO, 2015).

A alteração inicial que ocorre nos capilares é o aumento dos espaços intercelulares, que leva a uma maior permeabilidade e consequentemente ao edema da matriz extracelular (MEC). Posteriormente essas células endoteliais ficam edemaciadas e ativadas, e aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio e a liberação de diversas moléculas como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, que realizam o recrutamento de linfócitos T e B e macrófagos pró-fibróticos para o interstício dos tecidos. Com a ativação de células inflamatórias e hipóxia tecidual decorrentes das lesões vasculares, há liberação de espécies reativas de oxigênio, citocinas e mediadores inflamatórios que impulsionam o desenvolvimento da doença (NAVARRO; BUSTOS, 2006; KUMAR et al., 2017).

A disfunção endotelial leva a um desequilíbrio na liberação de moléculas vasoativas, com um aumento dos vasoconstrictores e diminuição dos vasodilatadores. O aumento da liberação de mediadores como o fator de Von Willebrand, endotelina- 1 e tromboxano B, somado ao aumento da agregação plaquetária induzida pela serotonina, são indicadores de danos às células endoteliais que são mantidas pela hipóxia e por fatores tóxicos como proteases, radicais livres, óxido nítrico (NO) e autoanticorpos antiendoteliais. As células endoteliais aumentam ainda a expressão de moléculas de superfície, como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), proteína de adesão de célula vascular 1 (VCAM-1) e E-selectina, que facilitam a migração de células inflamatórias das paredes dos vasos para o interior dos tecidos (SEGURA; FERRAZ-AMARO, 2015; STICHERLING, 2012).

Todas estas alterações geram um ambiente antiendotelial, que provoca o aumento da taxa de apoptose das células endoteliais, anticorpos endoteliais e redução do número

de células endoteliais progenitoras, o que dificulta a neovascularização (STICHERLING, 2012).

2.1.3.2 Desregulação imunológica

Outra importante alteração que ocorre na fisiopatogênese da ES é a desregulação do sistema imunológico, envolvendo tanto a resposta humoral quanto a resposta celular. Os autoanticorpos estão presentes na ES e são importantes componentes da imunidade humoral, caracterizam as formas clínicas da doença e apresentam associações prognósticas. A imunidade celular é representada principalmente pelos linfócitos T, responsáveis pela produção de diversas citocinas que desempenham papéis importantes, incluindo alterações nas funções das células endoteliais e fibroblastos (RAJA; DENTON, 2016; CHIZZOLINI; BOIN, 2015).

Evidências sugerem diferentes associações dos linfócitos B com a fisiopatogênese da ES (LAFYATIS et al., 2007; SATO et al., 2004; BIELECKI et al., 2010; FRANÇOIS et al., 2013). A alteração da homeostase e função das células B estão implicadas no desenvolvimento e progressão de doenças autoimunes sistêmicas, como a ES. Essas células parecem atuar regulando a ativação de fibroblastos, e dessa forma aceleram o processo fibrótico da doença, além de contribuir para amplificação do processo inflamatório por meio da produção dos autoanticorpos (CHIZZOLINI; BOIN, 2015; FRANÇOIS et al., 2013).

Os autoanticorpos da ES são direcionados para uma série de alvos, intra e extracelulares. Mais de 95% dos pacientes apresentam autoanticorpos no momento do diagnóstico da doença, e os mesmos já foram associados com subtipos da doença e com diferenças na gravidade da doença, como extensão do envolvimento cutâneo, manifestações em órgãos internos e prognóstico. Grande parte dos primeiros anticorpos identificados na ES são direcionados a antígenos nucleares, são os anticorpos antinucleares (ANA). Esses ANA mostraram-se úteis clinicamente na predição do início da doença, antes que se tenha um diagnóstico claramente definido. Os principais ANA associados com a ES e que são úteis no diagnóstico específico, incluem o anticentrômero, anti-DNA topoisomerase I (anti-Scl70), anti-RNA polimerase III (anti-RNAP) e o anti-fibrilarina, esses quatro diferentes autoanticorpos representam até 80% dos ANA detectados na ES (MEHRA et al., 2013).

O anticorpo anticentrômero apresenta uma sensibilidade entre 20 – 40% e especificidade maior que 90% (STTEN, 2005; WALKER; FRITZLER, 2007). Apesar da frequência relatada do anticentrômero em pacientes com ES ser 20 – 40%, já foi visto que pode sofrer variações de acordo com a etnia da população: pacientes brancos apresentaram uma frequência de 30%, enquanto que a frequência foi menor em pacientes afro-americanos (REVEILLE et al., 2001). A maior parte dos pacientes que produzem o anticorpo anticentrômero tem a forma clínica limitada da ES, e apresentam um prognóstico mais favorável, com menor mortalidade, em relação aos pacientes que possuem outros ANA associados com a ES (MEHRA et al., 2013).

O anti-DNA topoisomerase I ou anti-Scl 70 tem uma frequência que varia de 9,2 – 42% em pacientes com ES. A especificidade pode mudar de acordo com a técnica de detecção utilizada, chegando até 99%, embora a sensibilidade geralmente seja inferior a 25% (SENECA et al., 2005; REVEILLE; SOLOMON, 2003; MAHLER et al., 2010). O anti-Scl70 é mais associado com a forma difusa da ES, mas não é exclusivo desse grupo, pois pacientes com a forma limitada da doença também podem apresentar esse autoanticorpo (REVEILLE; SOLOMON, 2003; WALKER et al., 2007). Esse tipo de ANA tem sido associado a pior prognóstico, com aumento da mortalidade, fibrose pulmonar e comprometimento músculo-esquelético e cardíaco (MEHRA et al., 2013).

Os autoanticorpos anti-RNA polimerase (anti-RNAP) I e III frequentemente estão presentes de forma simultânea e representam um padrão de expressão específico para a ES, com prevalência na ES em torno de 20% e frequência variável nas diferentes populações. A presença dos anti-RNAP I e III está associada com o acometimento cutâneo difuso, e em algumas coortes com o maior risco de crise renal. Embora os pacientes com anti-RNAP tenham alta prevalência de comprometimento renal, apresentam melhor sobrevida em comparação aos pacientes com anti-Scl70 e anti-fibrilarina (MEHRA et al., 2013; MIERAU et al., 2011; REVEILLE; SOLOMON, 2003; STEEN, 2010; GRAF et al., 2012).

A fibrilarina é uma proteína nuclear de 35kDa. Os autoanticorpos dirigidos à essa proteína são considerados específicos para a ES, e estão presentes no soro de menos de 7% dos pacientes. Estudos realizados associaram a presença desse autoanticorpo com maior frequência do envolvimento cutâneo difuso, hipertensão arterial pulmonar, lesões

músculo-esqueléticas e cardíacas e uma frequência menor de artrite (TORMEY et al., 2001; SHARIF et al., 2011).

A desregulação imunológica na ES envolve também a ativação dos linfócitos T, que participam do processo fisiopatogênico da doença por meio da produção de citocinas, as quais interagem com células endoteliais e fibroblastos, e dessa forma, desencadeia efeitos de indução ou prevenção de doenças vasculares e síntese excessiva de colágeno (CHIZZOLINI; BOIN, 2015). Estudos realizados demonstraram a presença de infiltrado de células inflamatórias em lesões precoces na ES, sugerindo que essas células, principalmente os linfócitos T, atuam promovendo os mecanismos que levam ao desenvolvimento da vasculopatia e fibrose. As células T ativadas parecem induzir a ativação dos fibroblastos por meio do contato direto ou pela liberação de citocinas que atuam de forma parácrina (MEDSGER et al., 2011; CHIZZOLINI, 2007).

Evidências mostram que pacientes com ES apresentam níveis séricos de citocinas Th1, Th2 e Th17 aumentados em comparação com indivíduos saudáveis. Citocinas pró-inflamatórias Th1 e Th17 parecem estar aumentadas no estágio inicial da doença, enquanto que as citocinas da via Th2 são associadas com a extensão do comprometimento fibrótico e envolvimento de órgãos (BARAUT et al., 2010).

Linfócitos Th1 se diferenciam dos demais subtipos pela expressão do fator de transcrição T-Bet, que regula a expressão de genes específicos das células Th1, essas células produzem principalmente citocinas envolvidas em respostas imune celulares, como IFN- γ , TNF e IL-2 (GIZINSKI; FOX, 2014). Estudos indicam a participação do IFN- γ na fisiopatogênese da ES. O IFN- γ pode atuar regulando a produção de quimiocinas envolvidas com a ES, como demonstrado em cultura de fibroblastos de pacientes (CHIZZOLINI et al., 2005). Scala et al mostraram em seu estudo que pacientes com ES apresentaram níveis mais baixos de IFN- γ em comparação com indivíduos saudáveis (SCALA et al., 2004). Por outro lado, outros estudos realizados evidenciaram que pacientes com ES apresentam níveis séricos mais elevados de IFN- γ em comparação com indivíduos saudáveis, além da associação com manifestações clínicas. Níveis séricos mais altos do IFN- γ foram associados com hipertensão arterial pulmonar e miosite (BALANESCU et al., 2015; DANTAS et al., 2015).

Funções conflitantes também foram descritas para o TNF na ES. O TNF demonstrou propriedades anti-fibróticas *in vitro*, regulando negativamente a produção de colágeno tipo I, e aumentando a produção de metaloproteinases de matriz (MMP), como a MMP-1, que são responsáveis pela degradação do colágeno (CHIZZOLINI et al., 2000). De forma contrária, achados apontam para funções pró-fibróticas do TNF, o bloqueio da citocina preveniu o desenvolvimento da fibrose em modelo de fibrose pulmonar induzida pela bleomicina (CHIZZOLINI, 2007). Estudos realizados mostram que pacientes com ES apresentam níveis séricos de TNF- α significativamente mais elevados em comparação com indivíduos saudáveis, além de sugerir sua participação no desenvolvimento da fibrose pulmonar, hipertensão arterial pulmonar e disfunção endotelial (PEHLIVAN et al., 2012; MUDARCA et al., 2014).

Na ES a IL-2 atua na diferenciação das células precursoras Th0 em células efectoras Th2 (CHIZZOLINI; BOIN, 2015). Níveis séricos de IL-2 foram relacionados com a atividade da ES e associados com doença intersticial pulmonar (SCHMIDT et al., 2009). Segel et al demonstraram que o bloqueio da IL-2 atenuou a fibrose pulmonar induzida por bleomicina *in vivo*, através da redução da infiltração linfocitária pulmonar (SEGEL et al., 2005).

As células do subtipo Th2 expressam o fator de transcrição GATA-3, e assumem esse perfil após a diferenciação do precursor Th0 que é induzida na presença da IL-4 ou IL-2. Esses linfócitos produzem principalmente IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13. IL-6, IL-4 e IL-13 atuam a favor do processo fibrótico, estimulando a produção e colágeno e inibindo a síntese de colagenase. A IL-4 promove a expansão das células Th2 e suprime as demais subpopulações de linfócitos Th (GIZINSKI; FOX, 2014; BARAUT et al., 2010).

As citocinas IL-4 e IL-13 têm um receptor em comum, o IL-4R α 2, e a partir da ligação com seus receptores podem ativar várias vias de sinalização. Ambas citocinas são consideradas pró-fibróticas, e devido ao compartilhamento de um mesmo receptor, elas apresentam muitas funções iguais. Estas citocinas ativam os fibroblastos, que se diferenciam em miofibroblastos, células que produzem e depositam grandes quantidades de MEC. Diversos estudos apontam para os papéis desempenhados pela IL-4 no processo fibrótico, sua atuação ocorre na fibrose de órgãos internos, como fibrose cardíaca, pulmonar e hepática, além de ter apresentado importantes funções pró-fibróticas *in vitro*,

estimulando a proliferação e diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos e aumentando a síntese de colágeno por fibroblastos humanos (KANELLAKIS et al., 2012; HUAUX et al., 2003; SAITO et al., 2003; SUGIMOTO et al., 2005; SOMMER et al., 2002; SEMPOWSKI et al., 1994; HUANG et al., 2015). A IL-13 é considerada o principal mediador pró-fibrótico, está envolvida em vários processos de doenças fibróticas, incluindo a ES. Possui atividades *in vitro*, como a capacidade de ativar e induzir a diferenciação de fibroblastos, e aumentar a expressão de colágeno tipo I e outros genes que possuem funções críticas no processo fibrótico, tais como o α -actina de músculo liso (α -SMA) (WYNN, 2004; FIRSZT et al., 2013; SUGIMOTO et al., 2005). Há relatos na literatura de níveis significativamente elevados de IL-4 e IL-13 em pacientes com ES (HASEWAGA et al., 1997; SALMON-EHR et al., 1996). Estudos realizados encontraram diferenças significativas nos níveis séricos de IL-13 de pacientes com ES em comparação com controles saudáveis (RICCIERI et al., 2003; HASEGAWA et al., 2003; HUANG et al., 2015).

A IL-6 é uma citocina que realiza diversos papéis na inflamação crônica, autoimunidade, disfunção de células endoteliais e fibrose. O receptor da IL-6 (IL-6R) é expresso em poucos tipos celulares, apenas nos hepatócitos, monócitos, células B e neutrófilos, e em uma pequena parcela de células T, mas as células T respondem a IL-6 principalmente pelo mecanismo de transsinalização. Fibroblastos e células endoteliais não expressam o IL-6R, e interagem com a IL-6 também pela transsinalização. A IL-6 pode se ligar ao seu receptor solúvel (sIL-6R), e formar o complexo IL-6/sIL-6R. O IL-6/sIL-6R pode ligar-se ao receptor gp130, que é expresso em uma grande variedade de células, incluindo células endoteliais e fibroblastos, e a partir dessa ligação ocorre a ativação do *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) que irá controlar os processos celulares induzidos pela IL-6, e assim se estabelece a transsinalização (BARNES et al., 2011). Evidências sugerem diversos papéis desempenhados pela IL-6 na ES. Níveis séricos elevados de IL-6 em pacientes com ES já foram relatados, e associados com miosite e com fibrose cutânea, além de também ter sido relatado que células mononucleares do sangue periférico de pacientes com ES produzem níveis mais altos de IL-6 e sIL-6R *in vitro* em comparação com células de indivíduos saudáveis (MATSUSHITA et al., 2006; SATO et al., 2001; GIACOMELLI et al., 1996). Adicionalmente, a IL-6 regula a expressão do fator de crescimento endotelial vascular

(VEGF), um importante mediador de angiogênese e fibrose, que se encontra alterado na ES (NAKAHARA et al., 2003).

Em condições fisiológicas, a IL-10 pode suprimir a ativação de linfócitos T e secreção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6, além de ter sido visto que a IL-10 inibe a expressão de genes do colágeno tipo I em fibroblastos. Dziankowska-Bartkowiak et al encontraram uma correlação negativa estatisticamente significativa entre os níveis séricos de IL-10 e a duração do FRY, sugerindo um envolvimento da IL-10 nas fases iniciais da doença (DZIANKOWSKA-BARTKOWIAK et al., 2004). Há ainda evidências que sugerem a participação da IL-10 na fibrose pulmonar e cutânea de pacientes com ES (SATO et al., 2001; HASEGAWA et al., 1997; SCALA et al., 2004).

As células Th17 produzem as citocinas IL-17, IL-21, IL-22 e IL-23, mas secretam principalmente IL-17A e IL-17F. Essas células expressam o fator de transcrição *retinoic acid nuclear orphan receptor* (ROR) γ T (BALANESCU et al., 2015; CHIZZOLINI; BOIN, 2015). Diversos estudos realizados evidenciam a participação das células Th17 na fisiopatogênese da ES (ZHOU et al., 2015; Yang et al., 2014; Jiang et al., 2014; Lei et al., 2016). A avaliação do infiltrado de células inflamatórias na pele de pacientes no estágio inicial da ES mostrou a presença de células IL-17⁺, além do aumento na porcentagem de células Th17 circulantes e aumento na produção de IL-17 em amostras de pacientes com a doença ativa (YANG et al., 2014). Kurasawa et al encontraram aumento da expressão do mRNA de IL-17 em linfócitos do sangue periférico e lesões fibróticas de pele e pulmão de pacientes com ES, além de elevados níveis de IL-17 no soro dos pacientes, aumento de proliferação de fibroblastos e expressão de moléculas de adesão em células endoteliais induzidos pela IL-17 (KURASAWA et al., 2000).

Embora a IL-22 seja produzida pelas células Th17, existe uma outra subpopulação de células T que também produzem IL-22, mas não produzem IL-17, são as células Th22. Essas células apresentam atividade pró-inflamatória (GIZINSKI; FOX, 2014). Ainda não está bem esclarecido o papel da Th22 na fisiopatogênese da ES. Truchetet et al encontraram um aumento significativo na frequência de células Th22 circulantes em pacientes com ES e associação com doença intersticial pulmonar (TRUCHETET et al., 2011).

As células T regulatórias (Treg) são classificadas em Treg naturais (nTreg) e Treg induzidas (iTreg), são células que expressam o fator de transcrição FoxP3 (JIANG; CHESS, 2006). As nTreg são conhecidas como células T CD25⁺CD4⁺, e estão presentes em condições normais do sistema imunológico, a deficiência dessas células facilita o desenvolvimento de doenças autoimunes (WING; SAKAGUCHI, 2009). As iTreg, inclui as células T regulatórias 1 (Tr1) secretoras de IL-10, células T helper 3 secretoras do fator transformador do crescimento beta (TGF- β), células T CD8⁻CD28⁺ e células T CD4⁻CD8⁻ que expressam o receptor de células T γ/δ (BARAUT et al., 2010). Antiga et al encontraram uma diminuição de células Treg FoxP3⁺ e de células TGF- β ⁺ e IL-10⁺ na pele de pacientes com ES em comparação com controles saudáveis, além de diminuição dos níveis séricos de IL-10 e TGF- β , sugerindo que a diminuição das Treg circulantes e dos níveis de IL-10 e TGF- β podem ser responsáveis pela perda da tolerância imunológica na ES (ANTIGA et al., 2010). Outro estudo semelhante também relatou a redução na porcentagem de células Treg, além da diminuição da atividade supressora de células Treg CD25⁺CD4⁺ e diminuição dos níveis séricos de IL-10 nestes pacientes (PAPP et al., 2011).

Um novo membro das famílias da IL-12 e IL-6 é a citocina IL-27, que é o único ligante do IL-27R, esse receptor está expresso em uma variedade de células, como monócitos, linfócitos T e B e fibroblastos, indicando que a IL-27 pode ter várias funções. O papel da IL-27 em respostas imunes é controverso, uma vez que a mesma apresentou atividades tanto anti-inflamatórias quanto pró-inflamatórias *in vitro* e *in vivo*. Na ES, foi visto que pacientes apresentam níveis séricos mais elevados da IL-27 e correlação positiva com a extensão da fibrose de pele e fibrose pulmonar, além da expressão aumentada do IL-27R em fibroblastos, células B e T CD4 de pacientes (YOSHIZAKI et al., 2010).

3.1.3.3 Fibrose

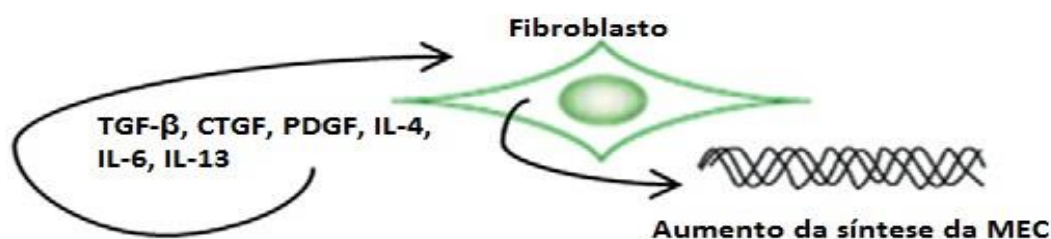
O mecanismo patogênico mais representativo da ES é a fibrose, e resulta da interação de diversos fatores, como mediadores celulares, citocinas e os seus receptores, quimiocinas, fatores de crescimento e moléculas de sinalização intracelular. A complexa interação desses fatores resulta na produção excessiva e acúmulo dos componentes da MEC. Os principais componentes da MEC são colágenos fibrilares tipo I e II, colágeno

tipo VII, fibrilas elastinas, fibrilina e as enzimas que realizam as ligações cruzadas do colágeno. Os fibroblastos são as células responsáveis pela produção e remodelamento da MEC. Nas doenças fibróticas, assim como na ES, o processo de remodelamento que é realizado pelas MMP está alterado, há uma produção excessiva de MEC e pouca degradação. Os fibroblastos na ES estão em um estado permanente de hiperativação, que leva a expressão alterada dos genes que regulam a síntese excessiva de MEC. Das proteínas envolvidas nos mecanismos de fibrose da ES, as citocinas desempenham importante papel na regulação dos fibroblastos. Entre as citocinas pró-fibróticas, a IL-4 é a que tem os mecanismos mais elucidados na fibrose, estimula a síntese de TGF- β que desempenha papel central no processo fibrótico, e o *connective tissue growth factor* (CTGF) que apresenta ação semelhante (ZIMMERMANN et al., 2013; CHIZZOLINI et al., 2011).

Os fibroblastos são as células mais importantes no desenvolvimento do processo fibrótico e a fibrose na ES é caracterizada pela presença de fibroblastos com ativação prolongada. Além dos fibroblastos em si, há a participação dos miofibroblastos, que também participam do processo de fibrose na ES, e são células com função contrátil e maior capacidade de produzir e secretar a MEC (DENTON et al., 2006).

O fenótipo pró-fibrótico ocorre devido a atuação de alguns fatores, como o *platelet-derived growth factor* (PDGF), IL-6, IL-13, IL-4, TGF- β , CTGF, que juntos atuam para promover a inflamação e o desenvolvimento do processo fibrótico (Figura 4) (KENDALL; FEGHALI-BOSTWICK, 2014).

Figura 4. Fibroblasto e mediadores do processo fibrótico.

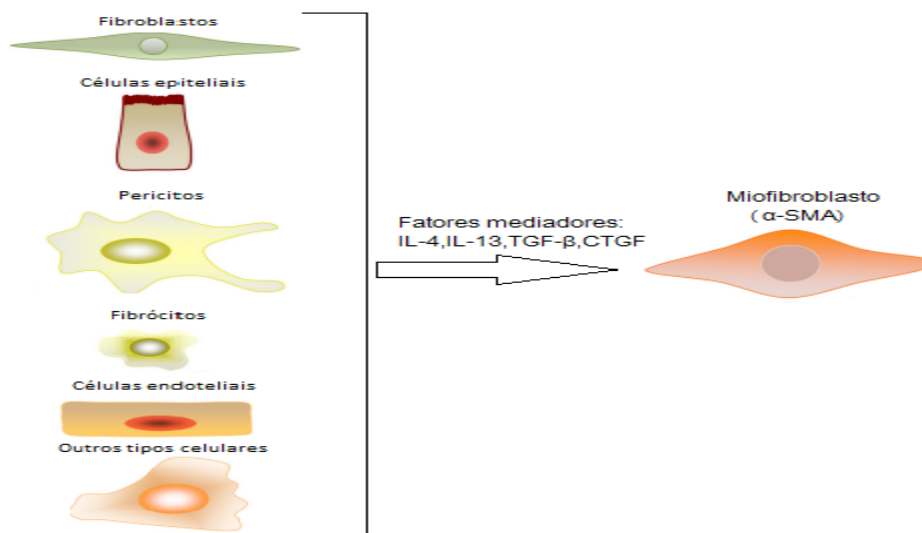


Fonte: modificada de BARAUT et al., 2010

Os miofibroblastos são fibroblastos ativos, com propriedades de células de músculo liso, incluindo a expressão de *alpha-smooth muscle actin* (α -SMA) em suas fibras citoplasmáticas, o que garante funções contráteis. São células especializadas na síntese de colágeno e outros componentes da MEC, além de ser a principal fonte de TGF- β . Essas células se originam de uma variedade de tipos celulares, como fibroblastos, pericitos, células endoteliais e células epiteliais (Figura 5) (HO et al., 2014; POSTLETHWAITE et al., 2004; KENDALL; FEGHALI-BOSTWICK, 2014).

A ES e complicações fibróticas de outras doenças, como fibrose pulmonar associada à artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico, são caracterizadas pelo aumento do número de fibroblastos e miofibroblastos que produzem excessivamente e depositam a MEC na pele e órgãos internos. Fibroblastos isolados de pacientes com ES apresentam mudanças fenotípicas, como aumento de proliferação, migração, invasão da MEC e resistência à apoptose (POSTLETHWAITE et al., 2004; SANTIAGO et al., 2001; HO et al., 2014).

Figura 5. Células precursoras do miofibroblasto e mediadores da diferenciação. IL: Interleucina; TGF- β : *Transforming growth factor β* ; CTGF: *connective tissue growth factor* ; α -SMA: *Alpha-smooth muscle actin*.



Fonte: modificada de KENDALL; FEGHALI-BOSTWICK, 2014.

O TGF- β é o principal regulador da fibrose em condições fisiológicas e também da fibrose patológica. Essa molécula é uma citocina multifuncional que regula o

crescimento, diferenciação e função de vários tipos de células. A superfamília do TGF- β inclui três fatores que apresentam estrutura e funções similares: TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3. A ativação do TGF- β é um processo complexo que promove mudanças conformacionais entre o TGF- β inativo e a proteína ligadora. O TGF- β 1 é secretado na sua forma latente, na qual está ligado não-covalentemente ao peptídeo associado à latência (LAP) formando o pequeno complexo latente (SLC). Nessa conformação, o TGF- β é inativo porque não pode se ligar ao seu receptor. A ativação do TGF- β ocorre após a clivagem do LAP por proteases como plasmina, trombina, endoglicosilases ou pela interação do LAP com proteínas como integrinas e trombospondina-1, que levam à liberação do TGF- β biologicamente ativo (JINNIN, 2010; HO et al., 2014; IHN, 2008).

As ações desempenhadas pelo TGF- β são exercidas pela interação de dois receptores transmembranas, tipo I e II, que são expressos simultaneamente pela maioria das células. Os receptores de TGF- β do tipo I e II são estruturalmente semelhantes, sendo glicoproteínas caracterizadas por um domínio extracelular rico em cisteína, um domínio hidrofóbico transmembrânico, e um domínio c-terminal citoplasmático serina/treonina-quinase. Para iniciar a sinalização, é necessário que o TGF- β se ligue ao receptor tipo II, essa ligação promove o recrutamento e fosforilação do receptor tipo I para produzir um complexo que ativa a via de sinalização. O receptor do TGF- β tipo I é incapaz de se ligar diretamente ao TGF- β , e o receptor tipo II é incapaz de sinalizar sem o recrutamento do receptor do tipo I, de forma que para que ocorra a ativação da via de sinalização do TGF- β é preciso a interação entre os dois tipos de receptores (IHN, 2008).

A sinalização do receptor do TGF- β I até o núcleo ocorre principalmente através da fosforilação de proteínas citoplasmáticas da família Smad. O receptor do tipo I reconhece e fosforila Smad2/3, o que leva a formação de um complexo com Smad4. Esse complexo é translocado para o núcleo e desempenha suas funções como fatores de transcrição, ligando-se diretamente ao DNA ou a outros fatores de transcrição que se ligam ao DNA. Existem as proteínas da família Smad que atuam como inibidores, tais como Smad6 e Smad7, elas se ligam ao receptor TGF- β tipo I e previne a fosforilação da Smad2/3 e consequentemente a formação e translocação para o núcleo do complexo com a Smad4 (MASSAGUE; CHEN, 2000; IHN, 2008).

Além da família de proteínas Smad, o TGF- β pode desenvolver sua sinalização através de outras vias que são independentes das Smad, como a *mitogen activated protein kinases* (MAPK) p38 e a *c-Jun n-terminal kinases*(JNK) (IHN, 2008).

Diversos estudos indicam que o TGF- β participa ativamente dos mecanismos fibróticos da ES. Foi visto que células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com ES produzem quantidades maiores de TGF- β 1 ativo e total, que inclui a forma latente e ativa, em comparação com a produção por PBMC de voluntários saudáveis, além de associação com parâmetros da doença, como duração e presença de anticorpo anticentrômero (HASEGAWA et al., 2004). Fibroblastos de pacientes com ES têm expressão aumentada dos receptores do TGF- β , além de se correlacionar com elevados níveis de mRNA do COL1A1, indicando que esses receptores induzem a transcrição do colágeno tipo I (KAWAKAMI et al., 1998). Dantas et al demonstraram que pacientes com ES apresentam níveis séricos aumentados de TGF- β 1 quando comparados com indivíduos saudáveis, além de associação com parâmetros clínicos da doença como fibrose pulmonar, úlceras digitais e presença de anticorpo anti-SCI70 (DANTAS et al., 2016).

2.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico da ES, assim como de outras doenças do tecido conjuntivo, é realizado através dos dados clínicos em associação com as avaliações laboratoriais. Os critérios do *American College of Rheumatology* (ACR) que são utilizados até agora para classificação da ES foram desenvolvidos em 1980, e incluem o espessamento simétrico da pele dos dedos, fibrose pulmonar e perda de tecido, embora essas características clínicas representem lesão tecidual avançada para ES, foi reconhecido que os critérios classificatórios do ACR de 1980 não são sensíveis para diagnóstico precoce da doença, particularmente para aqueles pacientes com a forma CL (KOWAL-BIELECKA et al., 2013; MASI et al., 1980).

O ACR e a *European League Against Rheumatism* (EULAR) criaram uma comissão para elaborar uma proposta conjunta de critérios para a ES, com os seguintes objetivos: (1) incluir pacientes em fase precoce e tardia da doença, (2) incluir manifestações vasculares, imunológicas e fibróticas, (3) ser viável para o uso na prática

clínica e (4) estar de acordo com os critérios utilizados para diagnóstico da ES na prática clínica. Os critérios incluem: espessamento bilateral da pele dos dedos, *puffy fingers* ou esclerodactilia, lesões isquêmicas nas pontas dos dedos (úlceras ou microcicatrices), telangiectasias, capilaroscopia alterada, HAP ou DPI, FRy e presença de autoanticorpos específicos (VAN DE HOOGEN et al., 2013).

2.1.5 Modalidades terapêuticas

A complexa interação entre os três pilares da fisiopatogênese da ES, vasculopatia, desregulação imunológica e fibrose, dificulta o desenvolvimento de um agente terapêutico que seja eficiente. No geral, os tratamentos da ES são determinados pela extensão e gravidade das manifestações da doença. Poucas terapias eficazes existem até o momento, e a maior parte é direcionada para o tratamento sintomático, não existindo nenhuma modalidade terapêutica que atue comprovadamente no envolvimento fibrótico da doença (RAJA; DENTON, 2016; TYNDALL et al., 2009; ALLARONE et al., 2016).

Atualmente, o tratamento de escolha para doença pulmonar intersticial e alguns casos da doença cutânea precoce e difusa, é a ciclofosfamida (KOWAL-BIELECKA et al., 2009). Um estudo observacional avaliou o uso de três imunossupressores: metotrexato, micofenolato de mofetila e ciclofosfamida, e sugeriu melhora de pele associada ao uso desses fármacos (HERRICK et al., 2010). No entanto, os benefícios do tratamento com esses imunossupressores tradicionais são considerados parciais e não abrangem todos os pacientes, apenas os que estão em fases iniciais da doença, e tem diminuição da eficácia à medida que a doença progride (MANNO; BOIN, 2010).

Os glicocorticoides (GC) são amplamente utilizados no tratamento de diversas doenças reumatológicas devido os seus efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores, mas esses efeitos terapêuticos estão associados a reações adversas, principalmente em doses mais elevadas (SPIES et al., 2011). Embora faltem evidências mostrando os benefícios dos GC no tratamento da ES, aproximadamente 45% dos pacientes utilizam GC. Os GC têm sido utilizados principalmente para tratamento das manifestações musculo-esqueléticas e da DPI, geralmente em associação com outros imunossupressores (IUDICI et al., 2014; IUDICI, 2017). O uso de altas doses de glicocorticoides foi associado com o desenvolvimento de crise renal esclerodérmica (STEEN; MEDSGER, 1998).

As alterações vasculares na ES são promovidas pelo desequilíbrio entre as substâncias vasodilatadoras e vasoconstrictoras, dessa forma, o tratamento para essas manifestações tem sido realizado principalmente com o uso de vasodilatadores. No tratamento dos pacientes com FRY, o objetivo principal é aumentar a vasodilatação e/ou diminuir a vasoconstrição. Entre as opções farmacológicas utilizadas estão os bloqueadores de canais de cálcio (BCC), antagonistas alfa adrenérgicos, antagonistas de endotelina e inibidores da fosfodiesterase (SINNATHURAI; SCHRIEBER, 2013; HERRICK, 2012). Nos pacientes com crise renal, o tratamento da hipertensão é essencial para prevenir o desenvolvimento de lesões vasculares irreversíveis. O IECA reduz significativamente a pressão arterial em alguns pacientes. O uso dos bloqueadores de canais de cálcio pode ser empregado em pacientes que não respondem bem ao tratamento com inibidores da IECA (DENTON et al., 2009).

Estudos recentes avaliam o uso de anticorpos monoclonais para terapias de alvos moleculares na ES. O tocilizumabe é um anticorpo monoclonal (anti-receptor de IL-6) que apresentou benefícios na fibrose dérmica, úlceras digitais e alterações de capilares em pacientes com ES (FERNANDES DAS NEVES et al., 2015; KHANNA et al., 2016; SAKKAS, 2016; TANIGUCHI et al., 2017). Tendo como alvo as células B, o rituximabe (anti-CD20) promoveu diminuição de miofibroblastos e das células B infiltradas na pele de pacientes com ES (LAFYATIS et al., 2009), além disso existem outros relatos dos benefícios oferecidos pelo rituximabe em pacientes com ES, como melhora da calcinose e de úlceras digitais (DAOUSSIS et al., 2012; KHOR et al., 2014). O fresolimumabe (anti-TGF- β) também mostrou benefícios na ES (RICE et al., 2015), embora efeitos adversos como sangramento e anemia tenham sido relatados (ASANO, 2017a).

2.2 VITAMINA D

A vitamina D desempenha funções fundamentais na homeostase do cálcio e é produzida através da clássica via envolvendo a pele, o fígado, e por último os rins, com a produção da 1,25- Dihidroxitamina D3 (1,25 (OH) $_2$ D3 ou calcitriol), que é a forma ativa da vitamina D. A ativação da vitamina D nos rins é catalisada pela enzima CYP27B1, que realiza uma α - hidroxilação na 25-hidroxitamina D circulante e assim libera a forma ativa 1,25 (OH) $_2$. A ligação da 1,25(OH) $_2$ D3 ao seu receptor, o receptor da vitamina D (VDR), inicia os diversos efeitos biológicos desempenhados pela vitamina

D. Os VDRs foram encontrados em quase todos os tipos de células dos vertebrados, o que levou a reavaliação dos papéis da vitamina D na saúde e em doenças de outros tecidos não-esqueléticos. Além das funções desempenhadas na homeostase do cálcio e metabolismo ósseo, a vitamina D tem uma série de atividades biológicas, incluindo indução da diferenciação celular, inibição do crescimento celular, imunomodulação e regulação de sistemas hormonais. A vitamina D desempenha suas funções imunorreguladoras tanto na imunidade inata, quanto na imunidade adaptativa (DELUCA et al., 1992; ADAMS; HEWISON, 2008; O'BRIEN; JACKSON, 2012; WHITE, 2012).

A deficiência de vitamina D tem sido associada a várias doenças autoimunes, como lúpus eritematoso sistêmico (SCHNEIDER et al., 2014), esclerose múltipla (HAAS et al., 2016), diabetes mellitus (MORI et al., 2015) e ES (VACCA et al., 2009; CARAMASCHI et al., 2010). Na ES, a maior prevalência de hipovitaminose D foi associada com parâmetros clínicos da doença, como maior duração de sintomas, fibrose pulmonar, acrosteólise, hipertensão pulmonar e velocidade de sedimentação das hemácias (CALZOLARI et al., 2009; VACCA et al., 2009; BRAUN-MOSCOVICI et al., 2008; CARAMASCHI et al., 2010).

2.2.1 Ação imunomoduladora da vitamina D

O VDR e a CYP27B1 são expressos em vários tipos de células imunológicas, como linfócitos T, neutrófilos e células apresentadoras de antígenos, o que sugere a ação da vitamina D na modulação da imunidade inata e adaptativa (WHITE, 2012).

A 1,25 (OH)₂ D₃ desempenha ações diretas e indiretas nas células T, inibindo a proliferação e produção de citocinas por essas células. Diversos estudos mostram que a vitamina D é capaz de regular citocinas das vias Th1, Th2, Th17 e Treg. A vitamina D promoveu inibição na transcrição de IL-2 e IFN- γ e inibiu a secreção de IL-17 por células Th17. Os efeitos da vitamina D nas citocinas da via Th2 são mais controversos, há evidências que a vitamina D inibe a transcrição de IL-4, mas também foi relatado que a vitamina D regulou positivamente a IL-4 em camundongos e células T humanas. Além disso, o tratamento com a vitamina D induziu a produção de IL-10 e a diferenciação de células Treg (CANTORNA et al., 2015; PALMER et al., 2011; KORF et al., 2012; STAEVA-VIEIRA; FREEDMAN, 2002; BOONSTRA et al., 2001).

Em modelos animais, a vitamina D mostrou suprimir o desenvolvimento e a progressão de doenças mediadas por células Th1 e Th17. *In vivo*, o tratamento com a vitamina D suprimiu o desenvolvimento e progressão da encefalomielite autoimune experimental, doença intestinal inflamatória e diabetes mellitus tipo I. A inibição de IL-17 e IFN- γ , e a indução de IL-10 e células Treg foram os mecanismos propostos para explicar as ações supressoras da vitamina D no desenvolvimento dessas doenças (CANTORNA et al., 2015; ZELLA et al., 2003; GREGORI et al., 2002; CANTORNA et al., 2000).

Estudos *in vitro* evidenciaram que o tratamento com a vitamina D aumenta a secreção de IL-4 por células humanas e murinas (MAHON et al., 2003; VAN DER EERDEN et al., 2014). A produção de IL-13 foi estimulada após o tratamento com a vitamina D em cultura de células Th9, em contrapartida os níveis de IL-13 foram reduzidos após o tratamento com vitamina D em PBMC de pacientes com asma (KEATING et al., 2014). Adicionalmente, a vitamina D atua na produção de IL-10 e diferenciação de células Treg, que podem suprimir a resposta Th2 (CANTORNA et al., 2015).

He et al demonstraram em seu estudo que a vitamina D e o VDR podem inibir a ativação de células T CD4⁺ e suprimir as respostas imunes no lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide (HE et al., 2016). Macrófagos de pacientes com artrite reumatoide tiveram a produção de TNF- α reduzida após tratamento com a vitamina D, além de diminuição dos níveis das citocinas IL-1a, IL-1b e IL-6, evidenciando o papel da vitamina D na regulação de mediadores pró-inflamatórios (NEVE et al., 2013).

2.2.2 Ação antifibrótica da vitamina D

Diversos estudos realizados apontam para a atividade antifibrótica da vitamina D na ES e em outras doenças com manifestações fibróticas. Zeer et al mostraram evidências da participação da vitamina D e do VDR no processo fibrótico da ES. A expressão do VDR está diminuída na pele e nos fibroblastos de pacientes e em modelo experimental de ES, e o estímulo com TGF- β , principal mediador da ativação de fibroblastos, regula negativamente a expressão do VDR em fibroblastos. Os níveis do VDR foram correlacionados negativamente com os níveis de Smad3 fosforilada (pSmad3), indicador da sinalização do TGF- β . Além disso, o tratamento com paricalcitol, um análogo da

vitamina D, promoveu redução da fibrose induzida por bleomicina em modelo experimental de ES, que foi visto pela diminuição do espessamento dérmico, bloqueio da diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos e diminuição dos níveis de mRNA do colágeno tipo I (ZEER et al., 2014). Outro estudo mostrou o uso tópico de um análogo da vitamina D em modelo experimental de ES, com redução significativa da fibrose cutânea (USATEGUI et al., 2014).

A 1,25 (OH)₂ D₃ inibiu a proliferação de fibroblastos de pulmão induzida pelo TGF-β₁, além de inibir a diferenciação de miofibroblastos também induzida pelo TGF-β₁, através da redução da expressão de α-SMA, marcador da diferenciação do miofibroblasto, diminuição da expressão de colágenos tipo I e III, e redução da fibronectina. Esses dados mostram que a vitamina D é capaz de inibir o fenótipo pró-fibrótico estimulado pelo TGF-β₁ em fibroblastos de pulmão (RAMIREZ et al., 2010).

Estudos evidenciam a participação da vitamina D na regulação negativa da fibrose renal. A vitamina D reduziu significativamente a fibrose, as lesões tubulares e a diferenciação de miofibroblastos, além de diminuir a expressão do colágeno tipo I (ARFIAN et al., 2016). Em outro estudo, foi visto que o VDR atenua a lesão renal obstrutiva, representada por atrofia tubular e fibrose intersticial, através da supressão do sistema renina-angiotensina (ZHANG et al., 2010).

A transição epitelial-mesenquimal (EMT) é um processo que permite que uma célula epitelial se diferencie em um miofibroblasto, e tenha a capacidade de migrar para outros tecidos e produzir fibrose. Esse processo pode ser induzido pelo TGF-β. Um análogo da vitamina D inibiu a expressão de marcadores da EMT induzidos pelo TGF-β₁ (FISCHER; AGRAWAL, 2014).

Outros estudos mostram a atividade antifibrótica da vitamina D na fibrose hepática, através da redução do TGF-β₁, Smad2/3, Smad2/3 fosforiladas (pSmad2/3), PDGF, colágeno tipo I e α-SMA, e na fibrose intestinal, por meio da redução dos níveis de TGF-β₁, Smad3, pSmad3 e colágeno tipo I (WAHSH et al., 2016; ABRAMOVITCH et al., 2014; TAO et al., 2014).

2.2.3 Vitamina D na Esclerose Sistêmica

Estudos evidenciaram a diminuição dos níveis séricos de vitamina D em pacientes com ES e correlacionaram essa hipovitaminose com vários parâmetros clínicos da doença. A vitamina D e o paratormônio (PTH) desempenham funções essenciais no metabolismo e reabsorção óssea, e podem afetar manifestações da ES, como acrosteólise e calcinose. Um estudo avaliou os níveis séricos do PTH e da vitamina D em pacientes com ES, e relatou que 46% dos pacientes avaliados apresentaram deficiência de vitamina D. Os níveis do PTH correlacionaram-se significativamente com acrosteólise, calcinose, duração da doença e com os níveis da vitamina D (BRAUN-MOSCOVICI et al., 2008). Vacca et al avaliaram pacientes com ES de duas populações distintas, originados da França e Itália, e encontrou taxas comparáveis e elevadas de deficiência e insuficiência de vitamina D nas duas populações, além da correlação negativa entre os níveis da vitamina D com a atividade da doença, velocidade de sedimentação das hemácias e pressão arterial pulmonar (VACCA et al., 2009). Um estudo realizou a avaliação dos níveis séricos da vitamina D em 327 paciente com ES, e esse grupo de pacientes apresentou redução significativa dos níveis da vitamina D em comparação com o grupo controle, além de correlação inversa entre os níveis de vitamina D e envolvimento fibrótico cutâneo (ARNSON et al., 2011).

Outros estudos realizados também mostraram a alta prevalência de hipovitaminose D em pacientes com ES, e associaram os baixos níveis de vitamina D com acometimento pulmonar, cardíaco, muscular, contraturas digitais e fibrose da pele (CORRADO et al., 2015; GROSEANU et al., 2015; CARAMASCHI et al., 2010).

3 METODOLOGIA

3.1 TIPO DE ESTUDO

A primeira etapa do presente trabalho foi um estudo transversal, descritivo, com componente analítico, para avaliação dos níveis séricos de 25(OH) vitamina D nos pacientes com ES. Na segunda etapa do trabalho foi realizado um estudo experimental translacional para avaliação dos efeitos *in vitro* dos tratamentos com a vitamina D e dexametasona (DEX) em pacientes com ES.

3.2 LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO

O estudo foi realizado no período de março/2016 a fevereiro/2018. Os pacientes avaliados no estudo foram atendidos ambulatório serviço de Reumatologia do HC-UFPE e os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT).

3.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

3.3.1 Recrutamento dos pacientes com ES

Foram incluídos no estudo 36 pacientes com esclerose sistêmica, selecionados aleatoriamente de acordo com o atendimento do ambulatório, através dos critérios de inclusão e exclusão.

Critérios de inclusão:

- Idade acima de 18 anos;
- Ser portador de ES, classificado de acordo com os critérios preliminares do *American College of Rheumatology* (MASI et al., 1980) ou os critérios do *American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism* (ACR/EULAR) 2013 (VAN DE HOOGEN et al., 2013);
- Estar em acompanhamento regular no ambulatório de reumatologia do HC-UFPE.

Critérios de exclusão:

- Não consentimento em participar do estudo;
- Estar em uso regular de colecalciferol;

- Diagnóstico conhecido de outra doença reumatológica autoimune (síndrome de superposição);
- Infecções agudas ou crônicas conhecidas;
- Gravidez;
- Neoplasia;
- Impossibilidade de coleta de sangue.

3.3.2 Recrutamento dos voluntários saudáveis

O grupo controle foi composto por 46 voluntários saudáveis (42 mulheres), selecionados aleatoriamente no HC-UFPE. Os indivíduos foram submetidos a entrevista e eram excluídos caso tivessem diagnóstico conhecido de alguma doença reumatológicas ou doença infecciosa, estivessem em uso regular de medicações, consumido álcool ou fumado nos últimos 15 dias.

3.4 DEFINIÇÃO DAS VARIÁVEIS CLÍNICAS

Para caracterização do comprometimento clínico dos pacientes o médico reumatologista utilizou as seguintes definições (MUANGCHAN et al., 2013; STEEN; MEDSGER, 2000b):

- classificação da doença: cutânea limitada e cutânea difusa (LEROY et al., 1988);
- tempo de doença (meses): tempo desde o início do primeiro sintoma, excluindo-se o FRY;
- fadiga: avaliada pela escala visual analógica (EVA) (IBN YACOUN et al., 2012);
- comprometimento cutâneo: avaliação clínica quanto à presença de espessamento cutâneo;
- extensão do comprometimento cutâneo: avaliada pelo escore modificado de Rodnan (CLEMENTS et al., 1995);
- fenômeno de Raynaud objetivo: presença avaliada pelo médico (FLAVAHAN et al., 2003; LEROY; MEDSGER, 2001);

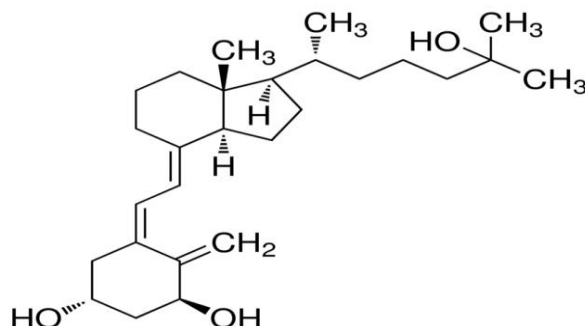
- úlceras: presença ou história de ulceração de polpas digitais ou superfícies extensoras ou história de necrose extensa e/ou amputação;
- comprometimento articular: presença de artrite evidenciada no exame físico;
- comprometimento muscular: fraqueza muscular acompanhada de elevação das enzimas musculares;
- comprometimento gastrintestinal: presença de dismotilidade esofageana avaliada pela cintilografia esofágica e/ou alteração na manometria esofageana;
- fibrose pulmonar: presença de fibrose pulmonar evidenciada na tomografia de torác;
- hipertensão arterial pulmonar: pressão sistólica da artéria pulmonar ≥ 35 mmhg estimada pelo ecocardiograma transtorácico com doppler;
- crise renal esclerodérmica: registro no prontuário de insuficiência renal, com ou sem elevação da pressão arterial, atribuída à ES;
- medicações utilizadas pelos pacientes: BCC, IECA, bloqueador do receptor de angiotensina (BRA), ácido acetilsalicílico, pentoxifilina, cilostazol, sildenafil, bosentana, corticosteroide, metotrexato, azatioprina, micofenolato de mofetila, ciclofosfamida (oral ou venosa), inibidor da bomba de prótons (IBP), procinéticos e anti-inflamatórios não-hormonais;
- perfil de autoanticorpos: positividade para anticorpos antinucleares, anticentrômero e/ou anti-Scl70, de acordo com registro no prontuário;
- peso, altura e pressão arterial sistólica e diastólica, avaliados no dia da consulta;
- avaliação da qualidade de vida através do *Health Assessment Questionnaire* (HAQ) e do *Scleroderma Health Assessment Questionnaire* (sHAQ).

3.5 MOLÉCULAS AVALIADAS

Foi avaliada no estudo a $1\alpha,25$ -Dihidroxitamina D₃ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (Figura 6) nas concentrações de 0,1, 1, 10 e 100 nM. Utilizou-se ainda a

dexametasona (Ache, Guarulhos, SP, BR) na concentração de 1000nM (COLIN et al., 2010).

Figura 6. Estrutura química da $1\alpha,25$ -Dihidroxitamina D_3 .



3.6 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

O método de redução do MTT foi utilizado para avaliação da toxicidade. PBMC (1×10^6 células/poço) e fibroblastos (1×10^4 células/poço) foram plaqueados (placas de 96 poços) e incubados em estufa de atmosfera úmida a 37°C com 5% de CO₂. Posteriormente, as células foram expostas a $1\alpha,25$ -Dihidroxitamina D_3 em diferentes concentrações (0,1 e 100 nM) e dexametasona na concentração de 1000 nM. Após 48 horas, foram adicionados 20µL de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) na concentração de 5mg/mL. Três horas depois, foram adicionados 130µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) a 20%. A absorbância foi mensurada 24 horas depois no comprimento de onda de 570nm em leitora de placas (Elx808, Biotek, EUA). Foram realizados três experimentos independentes. Em todos os experimentos, foram incluídos controles não tratados e controles tratados com etanol (0,1%), veículo de diluição da vitamina D, vitamina D nas concentrações de 0,1nM e 100nM, além da dexametasona na concentração de 1.000nM.

3.7 CULTIVO DOS FIBROBLASTOS

As linhagens de fibroblastos de pele (HFF-1) e pulmão (MRC-5) foram obtidas através do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram cultivadas em meio DMEM (Gibco®), 3,7 g/L Bicarbonato de Sódio (ISO FAR Ltda.) e 200 U/mL de

penicilina e estreptomicina (Gibco®), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) para a linhagem MRC-5 e 20% de SFB para a linhagem HFF-1. As mesmas foram mantidas em estufa de atmosfera úmida a 37°C 5%CO₂.

Após atingirem a confluência de 80%, as células foram lavadas com uma solução de PBS 1X/EDTA 1mM e tratadas com tripsina 0,25% (Invitrogen®) durante 5 – 10 minutos. Após centrifugação (2000 rpm, 3 minutos), as células foram redistribuídas em garrafas de poliestireno (TPP®) ou em placas para realização dos ensaios.

3.8 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

Para avaliar a ação da vitamina D na expressão de marcadores fibróticos, as células foram colocadas em placas de 06 poços, estimuladas com TGF- β e tratadas com vitamina D nas concentrações de 0,1, 1, 10 e 100 nM. Após o período de 06 horas, as células foram recolhidas para extração do RNA total através do reagente TRIzol (Thermo Fisher Scientific), seguindo as recomendações do fornecedor. Cada amostra foi ressuspensa em 30 μ l de água (DNase/RNase free) e mantidas em banho seco durante 10 minutos a 60°C para a solubilização do RNA. Posteriormente as amostras foram quantificadas por análise fluorométrica utilizando o Qubit® 3.0 Fluoremeter (Thermo Fisher Scientific). As amostras foram estocadas a -80 °C até a realização dos demais procedimentos.

O gel de agarose (1%) foi utilizado para avaliar a integridade do RNA. As amostras foram preparadas em tubo contendo 1 μ l de RNA, 3 μ l de água, 1 μ l de brometo de etídeo (1:10) e 4 μ l de tampão de aplicação (10 μ L água livre de DNase/RNase, 10 μ L glicerol, 15 μ L MOPS 10X, 75 μ L formamida, 24 μ L formaldeído 37% e 8 μ L azul de bromofenol). A corrida foi realizada em tampão MOPS 1X a 100V durante 20-30 minutos.

3.9 COLETA DE SANGUE E CULTURA DE PBMC

Foram realizadas coletas de sangue em tubos contendo o anticoagulante heparina (18 mL), para isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), e em tubo seco com gel (4 mL) para dosagem da 25 (OH) vitamina D. As coletas foram feitas por profissionais competentes e devidamente treinados para reduzir os riscos para os

participantes da pesquisa. Todas as coletas foram realizadas com autorização prévia dos participantes e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

As PBMC foram isoladas a partir do sangue de doadores sadios (n= 10) e portadores de ES (n=21) por centrifugação com Ficoll Paque TM Plus (*GE HealthcareBio-Sciences*). As PBMC isoladas foram cultivadas em placas de 24 poços (10^6 células/poço) com meio RPMI 1640 (Gibco®), suplementado com L-Glutamina, 10% de Soro Bovino Fetal (Lonza®), 10 mM de HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (Gibco®) e 200 U/mL de Penicilina/Estreptomicina (Gibco®). As células foram estimuladas com anti-CD3 e anti-CD28 (Ebiosciences) e tratadas com a $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ nas concentrações de 0,1, 1, 10 e 100 nM ou dexametasona (Ache) 1000 nM, posteriormente foram cultivadas em estufa de CO₂ 5% a 37°C. Após 48 horas, as placas foram centrifugadas, o sobrenadante coletado e armazenado a -20°C para posterior dosagem de citocinas.

3.10 DOSAGEM DE CITOCINAS

As dosagens das citocinas presentes no sobrenadante das culturas foram realizadas utilizando o Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) ou o Cytometric Bead Array (CBA).

3.10.1 Dosagem de citocinas por ELISA

O ELISA do tipo sanduíche foi utilizado para dosagem das citocinas IL-6, IL-17F, IL-22, IL-23, IL-27, IL-1 β e IFN- γ (Tabela 1) no sobrenadante das culturas de células, seguindo as instruções recomendadas pelos fornecedores. A leitura da absorbância foi realizada em leitora de microplacas de 96 poços (Biotek) devidamente calibrada.

A tabela abaixo apresenta as citocinas avaliadas por ELISA, seus fabricantes e limites de detecção.

Tabela 1. Citocinas avaliadas pela técnica ELISA, fabricantes e limites de detecção.

CITOCINA	FABRICANTE	LIMITES DE DETECÇÃO (pg/ml)
IL-6	BD Biosciences	4,69 – 600
IL-17F	Ebioscience	31,25 – 2000
IL-22	Ebioscience	7,8 – 1000
IL-23	Ebioscience	15,6 – 2000
IL-27	Ebioscience	62,5 – 8000
IL-1 β	BD Biosciences	3,90 – 500
IFN- γ	BD Biosciences	4,68 – 600

3.10.2 Dosagem de citocinas por CBA

O Kit Human Th1/Th2/Th17 Cytokine (Ref 560485, BD Bioscience) foi utilizado para dosagem das citocinas IL-2, IL-4, IL-10, TNF e IL-17A (Tabela 2). As amostras foram adquiridas pelo citômetro de fluxo BDTM FACS Verse. As análises para quantificação das citocinas foram realizadas pelo BDTM FCAP Array Software v3.0 seguindo as instruções do fabricante.

A tabela abaixo apresenta as citocinas do kit Human Th1/Th2/Th17 Cytokine e os limites de detecção.

Tabela 2. Citocinas do Kit CBA Humano Th1/Th2/Th17 e limites de detecção.

Kit Human Th1/Th2/Th17 Cytokine	
CITOCINA	LIMITES DE DETECÇÃO (pg/ml)
IL-2	2,60 – 5000
IL-4	4,90 – 5000
IL-10	4,50 – 5000
TNF	3,80 – 5000
IL-17A	18,9 – 5000

3.11 DOSAGEM DA 25 (OH) VITAMINA D

Os níveis séricos de 25 (OH) vitamina D foram dosados em 36 pacientes com ES

e 36 voluntários saudáveis pareados por sexo e idade. A dosagem da 25 (OH) vitamina D sérica foi realizada usando o kit Access 25(OH) Vitamin D Total (Beckman Coulter, Brea, CA, EUA) no equipamento Access 2 Immunoassay System (Beckman Coulter, Brea, CA, EUA) pela técnica de quimioluminescência. Os níveis de vitamina D foram considerados normais quando ≥ 30 ng/mL, insuficientes entre 10 e 30 ng/mL e deficientes <10 ng/mL (GROSEANU et al., 2016; ZHANG et al., 2017).

3.12 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa em seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco. CAAE nº: 63517517.1.0000.5208 (Anexo A). Todos os indivíduos incluídos no presente estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para pacientes com esclerose sistêmica (Apêndice A) ou para voluntários saudáveis (Apêndice B).

3.13 ANÁLISES DOS RESULTADOS

As análises foram realizadas com o software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). O teste de D'Agostino foi utilizado para avaliação de normalidade das amostras. A expressão dos resultados das variáveis contínuas foi feita pelas médias/desvios-padrão ou mediana/variação interquartil. Para comparação dos níveis de citocinas entre duas condições foi utilizado o teste Wilcoxon's signed rank. O teste "t" de Student ou Mann-Whitney foi utilizado para comparar os níveis de 25(OH) vitamina D e o teste de probabilidade Fisher's exact para comparar as frequências. Análises de variância (ANOVA) e Turkey test como pós-teste foram realizados para comparar a expressão gênica. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

4 RESULTADOS

4.1 DETERMINAÇÃO DO PERFIL CLÍNICO DOS PACIENTES COM ESCLEROSE SISTÊMICA

Foram incluídos no estudo 36 pacientes com esclerose sistêmica, sendo 32 (88.8%) do sexo feminino, com média de idade de 45.3 anos (variando de 20 a 71). Metade dos pacientes (50%) apresentava a forma clínica cutânea difusa (CD) e a outra metade (50%) apresentava a forma cutânea limitada (CL). As manifestações clínicas mais frequentes foram disfunção esofágica, úlceras digitais e fibrose pulmonar. A tabela 3 resume as características clínicas e demográficas dos pacientes avaliados.

Na comparação entre os pacientes com as formas clínicas CD e CL as manifestações clínicas e variáveis demográficas foram semelhantes, havendo diferença apenas no escore de Rodnan que foi maior no grupo CD ($p=0.01$). A tabela 3 resume os dados comparativos entre os grupos.

Tabela 3. Comparação das características clínicas entre as formas cutânea difusa e limitada de pacientes com Esclerose Sistêmica do estudo (n=36).

CARACTERÍSTICAS	TOTAL (n=36)	CUTÂNEA DIFUSA (n=18)	CUTÂNEA LIMITADA (n=18)	p
Idade (anos)				
média ± DP (mín-máx)	45.3 ± 12.5 (20 – 71)	45.06 ± 12.00 (24 – 71)	45.83 ± 13.06 (20 – 66)	0.85
Sexo feminino				
N (%)	32 (88.8)	15 (83.3)	17 (94.4)	0.60
Duração da doença (meses)				
Média ± DP (mín-máx)	137.2 ± 89.82 (22 – 360)	118.8 ± 77.52 (24 – 276)	155.4 ± 99.56 (22 – 360)	0.22
Manifestações clínicas N(%)				
Disfunção esofágica	24 (66.6)	12 (66.6)	12 (66.6)	1.00
Úlceras digitais	19 (52.7)	9 (50.0)	10 (55.5)	1.00
Fibrose pulmonar	14 (38.8)	9 (50.0)	5 (27.7)	0.30
HAP	5 (13.8)	2 (11.1)	3 (16.6)	1.00
Artrite	8 (22.2)	3 (16.6)	5 (27.7)	0.69
Comprometimento muscular	5 (13.8)	3 (16.6)	2 (11.1)	1.00
Escore de Rodnan				
Mediana (mín-máx)	20.0 (1 - 43)	25.17 (3 – 43)	15.67 (1 – 28)	0.01
Autoanticorpos N(%)				
ANA positivo	30/35 (85.7)	14/17 (82.3)	16 (88.8)	0.65
Anticentrômero positivo	2/17 (11.7)	0/8	2/9 (22.2)	-
Anti-Scl70 positivo	5/21 (23.8)	4/11 (36.3)	2/12 (16.6)	0.37
Tratamentos N(%)				
Corticosteroide	13 (36.1)	6 (33.3)	7 (38.8)	1.00
Azatioprina	9 (25.0)	5 (27.7)	4 (22.2)	1.00
Metotrexato	7 (19.4)	4 (22.2)	3 (16.6)	1.00
Ciclofosfamida	1 (2.7)	1 (5.5)	0	-
Micofenolato de mofetila	2 (5.5)	0	2 (11.1)	-

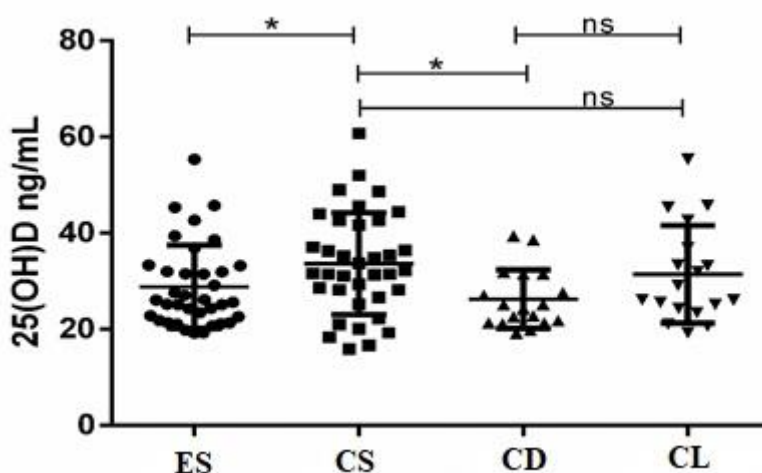
DP: desvio-padrão; HAP: hipertensão arterial pulmonar; ANA: anticorpos antinucleares.

4.2 NÍVEIS SÉRICOS DE 25 (OH) VITAMINA D EM PACIENTES COM ES E VOLUNTÁRIOS SAUDÁVEIS

Pacientes com ES apresentaram menores níveis de 25 (OH) vitamina D quando comparados com indivíduos saudáveis (p= 0.04). Além disso, a insuficiência de vitamina D foi mais frequente no grupo de pacientes com ES (63.8%) quando comparado com o grupo de voluntários saudáveis (36.1%, p=0.03). Nenhum dos indivíduos avaliados no estudo apresentou deficiência de vitamina D (Figura 7). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os níveis séricos de vitamina nos pacientes com ES CD

e CL, embora seja possível observar que há uma redução nos níveis do grupo de pacientes CD (26.27 ± 6.10 X 31.44 ± 10.15 ng/mL, $p=0.072$). Quando comparados com indivíduos saudáveis, os pacientes CD apresentaram menores níveis da 25 (OH) vitamina D ($p=0.01$), mas não se observou diferença entre os pacientes com CL e indivíduos saudáveis ($p= 0.40$) (Figura 7). A porcentagem de pacientes com insuficiência de vitamina D foi de 72.2% no grupo CD e 55.5% no grupo CL, mas essa diferença não teve significância estatística ($p=0.29$). Não foi observada nenhuma associação entre os níveis de vitamina D e os parâmetros clínicos da doença.

Figura 7. Níveis séricos da 25 (OH) vitamina D em pacientes com esclerose sistêmica (ES) e controles saudáveis (CS). CD= cutânea difusa; CL= cutânea limitada. * $p<0.05$, ns= não significante. N= 36 (ES e CS).



4.3 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

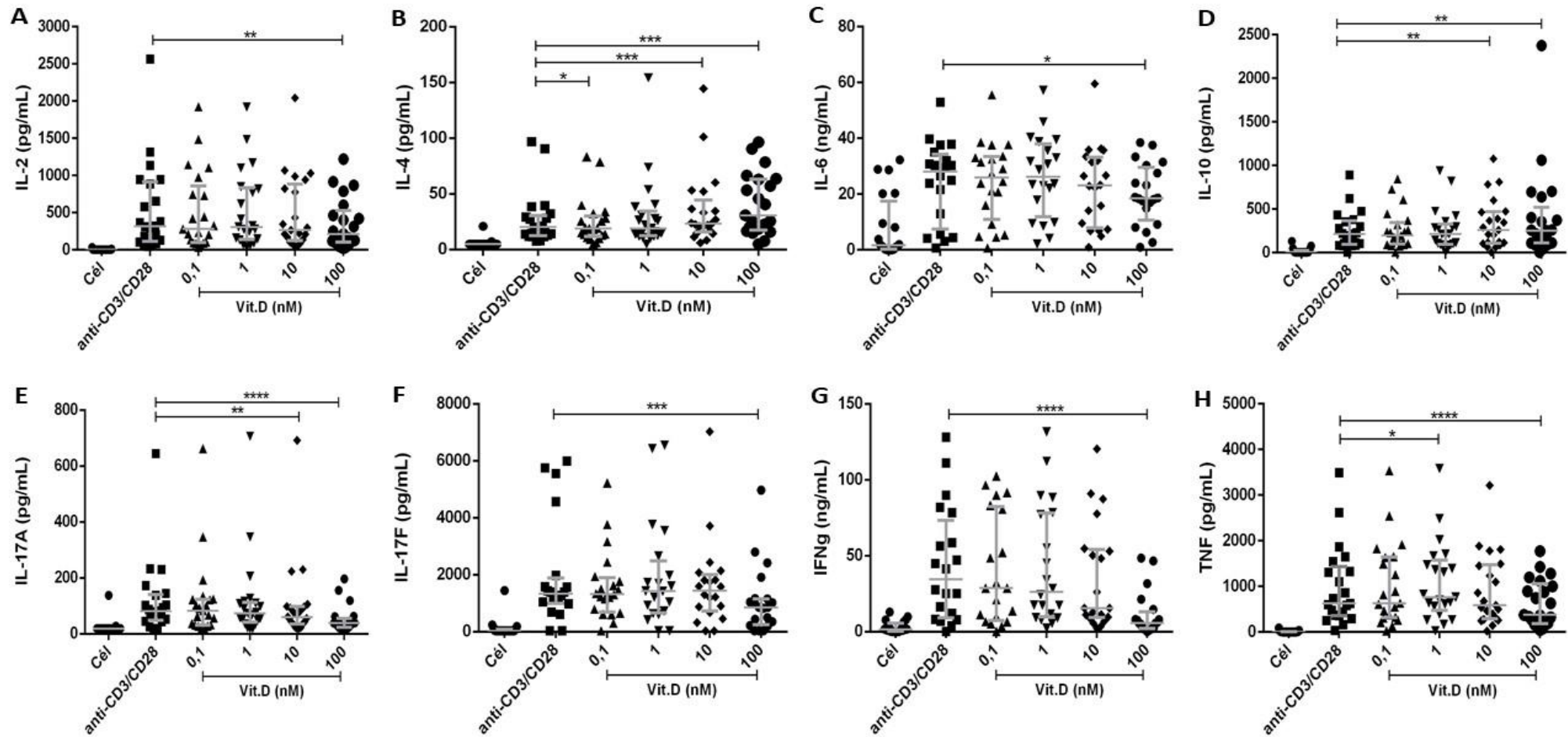
As concentrações da 1,25 (OH)₂ vitamina D testadas (0.1 e 100 nM) em PBMC e fibroblastos não foram tóxicas. A média da viabilidade celular dos três experimentos foi 100% em PBMC e 94% em fibroblastos da linhagem MRC-5. Ademais, o tratamento com a dexametasona (1.000nM) em PBMC evidenciou que a concentração testada não foi tóxica para as células, mantendo a viabilidade celular após o período de 48 horas.

4.4 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA 1,25 (OH)₂ VITAMINA D NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM PBMC DE PACIENTES COM ES E VOLUNTÁRIOS SAUDÁVEIS

Posteriormente foram avaliados os efeitos do tratamento com a vitamina D na produção de citocinas em culturas de PBMC de pacientes com ES e voluntários saudáveis.

No sobrenadante das culturas de PBMC de pacientes com ES, a vitamina D na concentração de 100nM promoveu redução nos níveis de IL-2 ($p = 0.003$), IL-6 (0.036), IFN- γ ($p < 0.0001$) e IL-17F ($p = 0.0004$). Os níveis da citocina IL-17A foram reduzidos nas concentrações de 10 e 100nM ($p = 0.0028$ e < 0.0001 , respectivamente). Curiosamente, os níveis de IL-4 e TNF foram reduzidos ou aumentados dependendo da concentração utilizada, apresentando uma resposta dose-dependente. A produção da IL-4 foi reduzida na concentração de 0.1nM ($p = 0.0384$) e aumentada nas concentrações de 10 e 100nM ($p = 0.0006$ e 0.0005 , respectivamente). Os níveis de TNF aumentaram após o tratamento com a vitamina D 1nM ($p = 0.0239$) e reduziram a 100nM ($p < 0.0001$). Na avaliação dos níveis da IL-10, foi possível observar que o tratamento com a vitamina D promoveu aumento significativo nos níveis dessa citocina nas concentrações de 10nM ($p = 0.0017$) e 100nM ($p = 0.0042$) (Figura 8). Não foi observada alteração significativa nos níveis de IL-1 β ($p = 0.494$). Todas as comparações foram realizadas em relação a condição estimulada com anti-CD3 e anti-CD28.

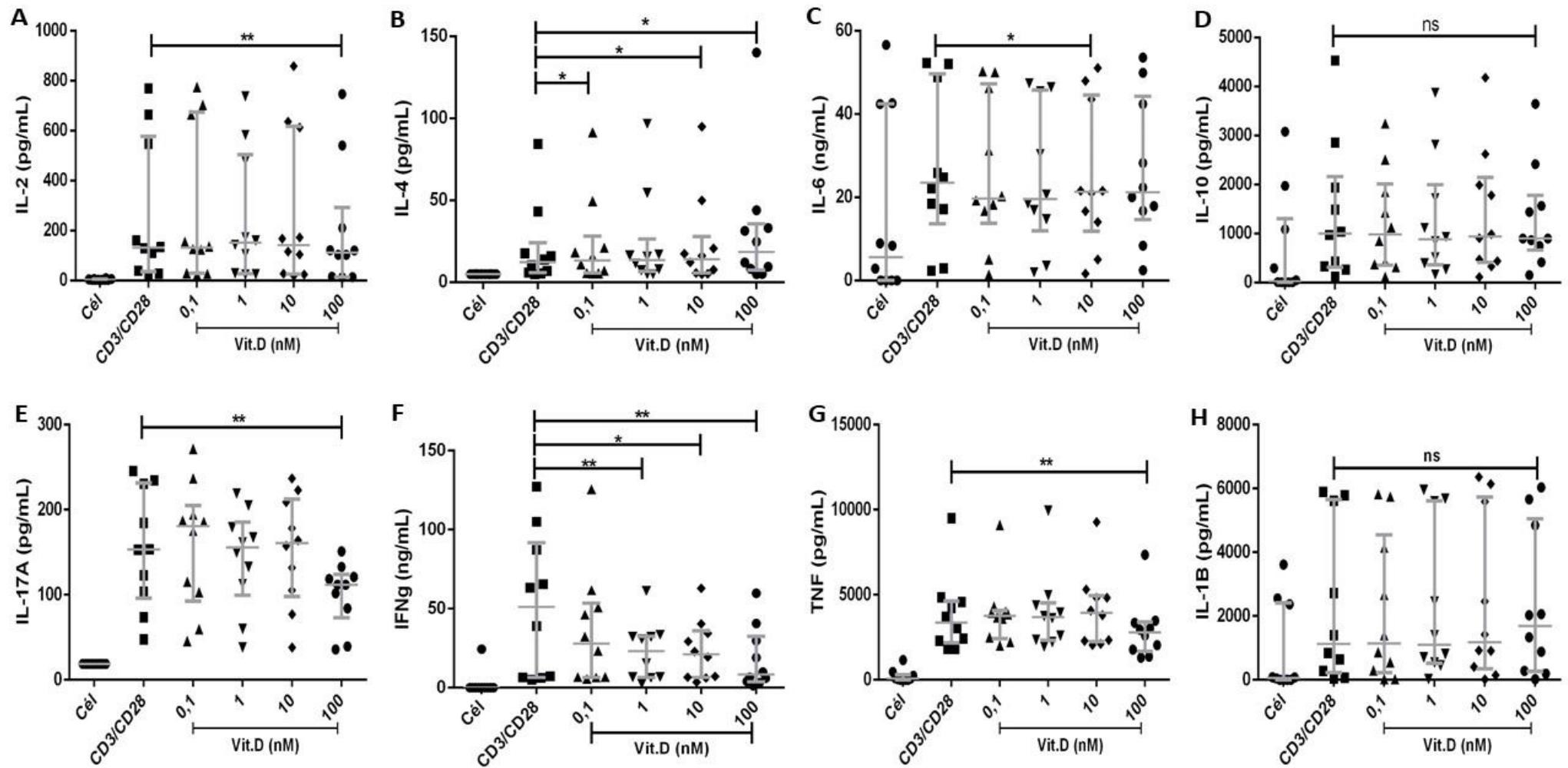
Figura 8. Avaliação do efeito da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na produção de citocinas em culturas de PBMC de pacientes com esclerose sistêmica. (A) Níveis de IL-2. (B) Níveis de IL-4. (C) Níveis de IL-6[#]. (D) Níveis de IL-10. (E) Níveis de IL-17A. (F) Níveis de IL-17F[#]. (G) Níveis de IFN- γ [#]. (H) Níveis de TNF. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. # = 20 pacientes.



As citocinas IL-22, IL-23 e IL-27 não foram detectadas no sobrenadante das culturas de PBMC de pacientes com ES.

No sobrenadante das culturas de PBMC de voluntários saudáveis, o tratamento com a vitamina D reduziu significativamente os níveis das citocinas IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF e IL-17A, e também promoveu aumento significativo nos níveis da IL-2. A vitamina D 100nM reduziu significativamente os níveis das citocinas IL-2, IFN- γ , TNF e IL-17A ($p= 0.002$ para IL-2, IFN- γ e TNF, e 0.005 para IL-17A). Os níveis da IL-4 no sobrenadante das culturas aumentaram significativamente nas concentrações de 0.1, 10 e 100nM ($p= 0.013$, 0.019 e 0.011 , respectivamente). Nas concentrações de 1 e 10nM a vitamina D reduziu os níveis de IFN- γ no sobrenadante das culturas ($p= 0.013$ e 0.002 , respectivamente), e reduziu significativamente os níveis de IL-6 na concentração de 10nM ($p= 0.019$). Os níveis de IL-10 e IL-1 β não foram alterados significativamente em nenhuma das concentrações testadas da vitamina D (Figura 9).

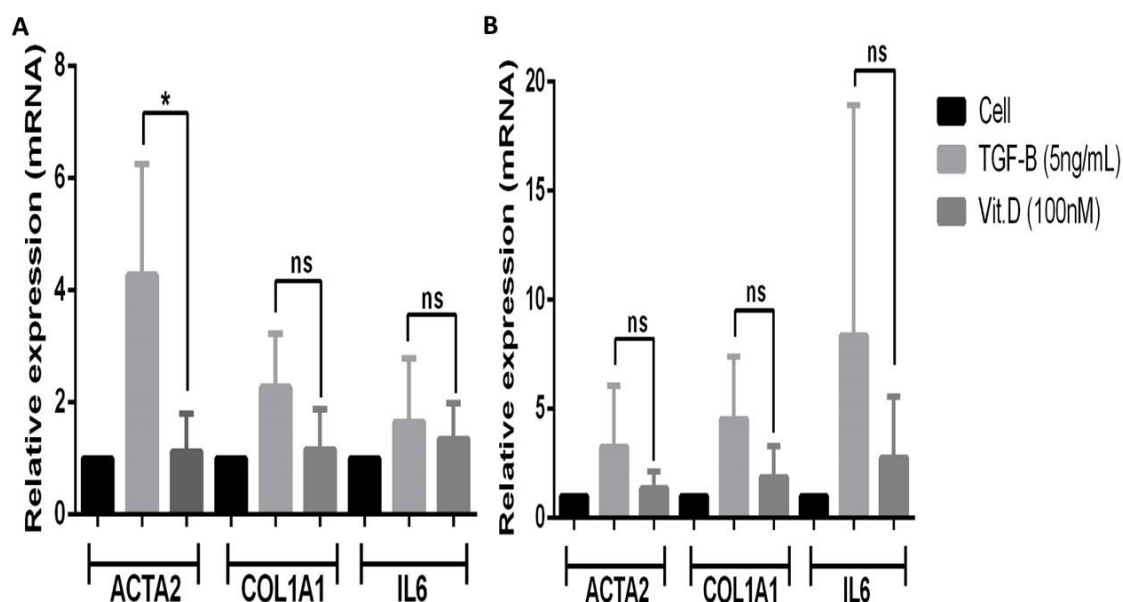
Figura 9. Avaliação do efeito da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na produção de citocinas em culturas de PBMC de voluntários saudáveis. (A) Níveis de IL-2. (B) Níveis de IL-4. (C) Níveis de IL-6. (D) Níveis de IL-10. (E) Níveis de IL-17A. (F) Níveis de IFN- γ . (G) Níveis de TNF. (H) Níveis de IL-1 β . * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ns= não significante.



4.5 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA 1,25 (OH)₂ VITAMINA D NA EXPRESSÃO E MARCADORES FIBRÓTICOS EM FIBROBLASTOS DE PELE E PULMÃO

A ação da vitamina D na expressão de marcadores fibróticos foi avaliada em linhagens de fibroblastos de pele (HFF-1) e pulmão (MRC-5) estimulados com TGF- β . Foi observado que o tratamento com a vitamina D promoveu redução estatisticamente significativa na expressão gênica de ACTA2 ($p < 0.05$) em fibroblastos de pele (HFF-1), mas não alterou significativamente os níveis de mRNA de COL1A1 e IL6 (Figura 9). Adicionalmente, o efeito da vitamina D na regulação dos níveis de mRNA de ACTA2, COL1A1 e IL6 em fibroblastos de pulmão (MRC-5) foi avaliado, mas não foram observadas diferenças significativas na expressão de nenhum desses genes (Figura 9).

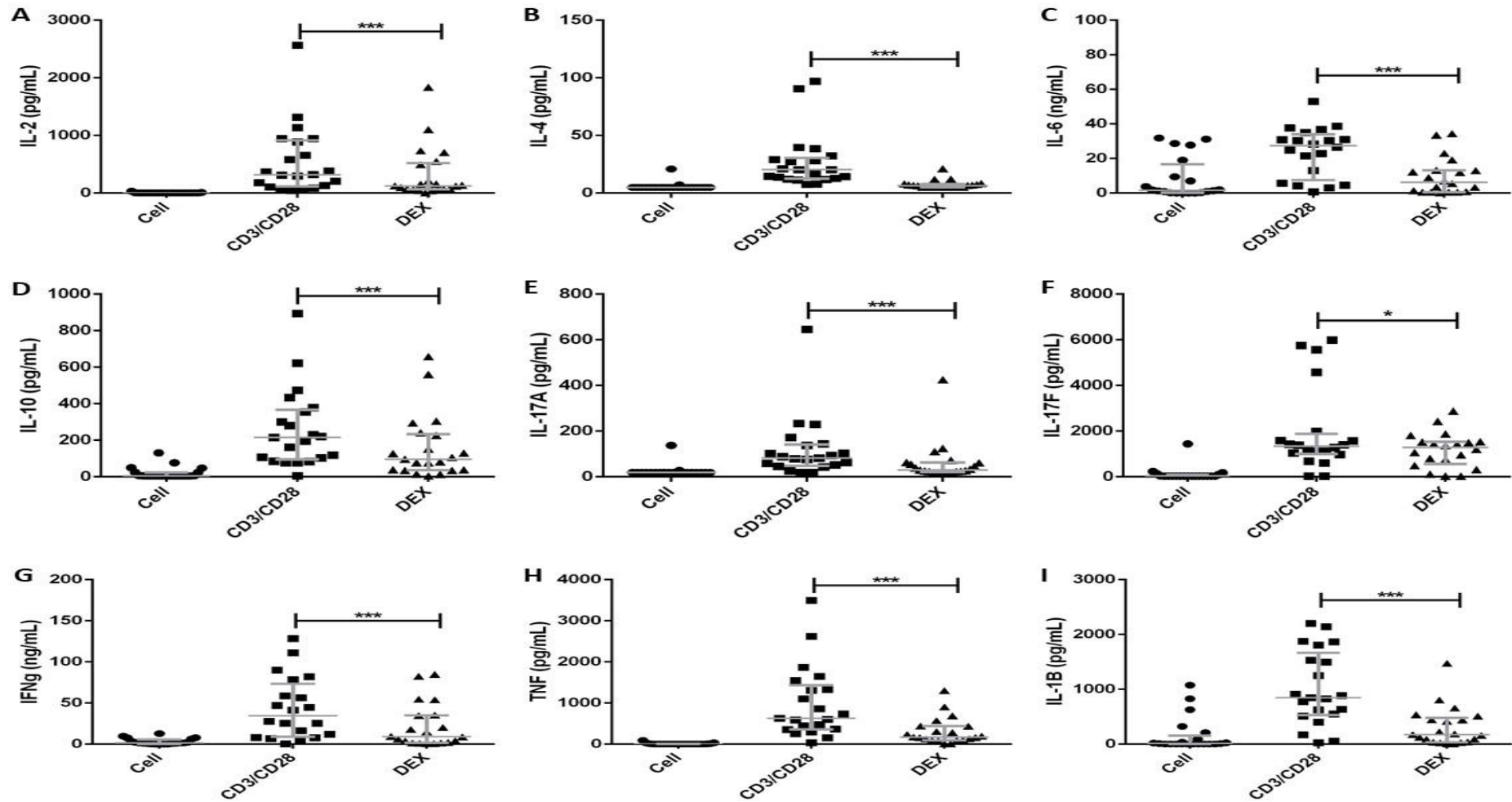
Figura 10. Avaliação do efeito da 1,25 (OH)₂ D₃ na expressão de ACTA2, COL1A1 e IL6 em fibroblastos saudáveis de pele (HFF-1) (A) e pulmão (MRC-5) (B). Valores da quantificação relativa após normalização com o gene de referência 18S e aplicação da fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$.



4.6 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA DEXAMETASONA NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM PBMC DE PACIENTES COM ES E VOLUNTÁRIOS SAUDÁVEIS

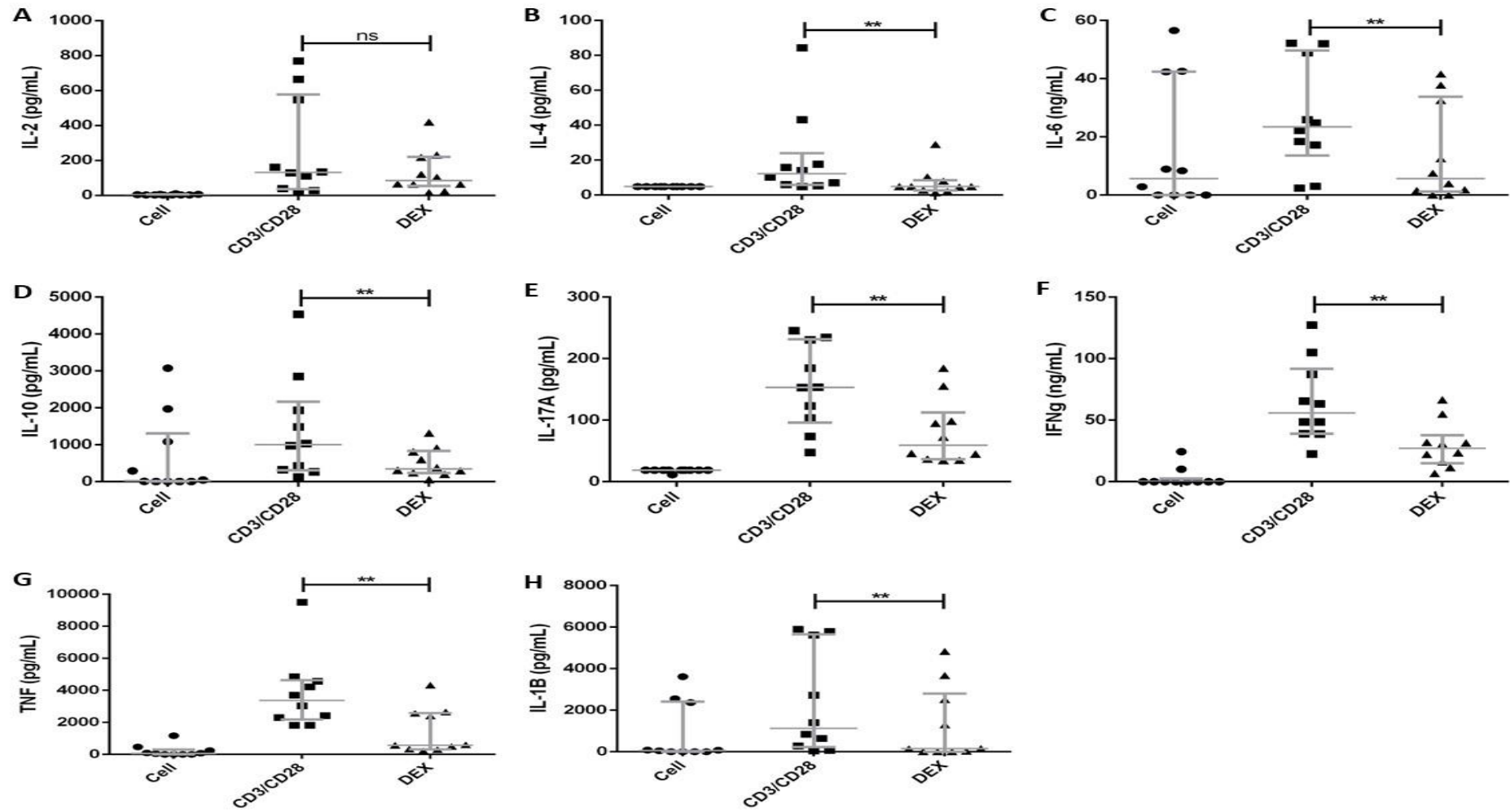
Na avaliação dos efeitos da DEX na concentração de 1.000nM em PBMC de pacientes com ES estimuladas com anti-CD3 e anti-CD28, foi possível observar que o tratamento promoveu redução significativa nos níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ , TNF, IL-1 β ($p < 0.001$ para todas), e IL-17F ($p = 0.023$) (Figura 10).

Figura 11. Efeitos da dexametasona *in vitro* em PBMC de pacientes com esclerose sistêmica. Níveis de IL-2 (A), IL-4 (B), IL-6[#] (C), IL-10 (D), IL-17A (E), IL-17F[#] (F), IFN- γ [#] (G), TNF (H) e IL-1 β (I). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, # = 20 pacientes.



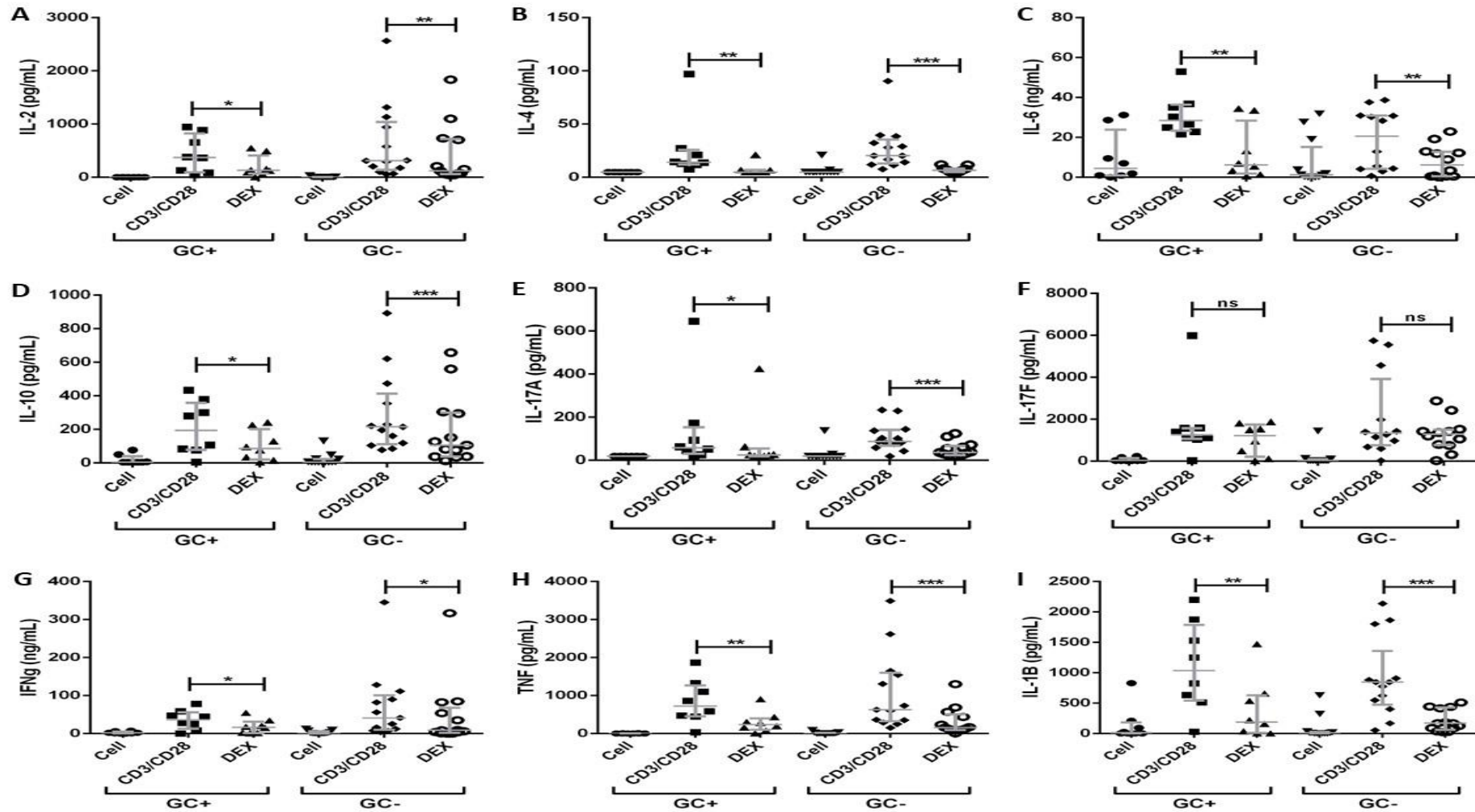
Em PBMC de voluntários saudáveis, o tratamento com DEX após estimular as células com anti-CD3/28 promoveu redução significativa nos níveis de IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ , TNF e IL-1 β no sobrenadante das culturas ($p= 0.003$ para IL-4 e IFN- γ ; e $p= 0.002$ para IL-6, IL-10, IL-17A, TNF e IL-1 β). Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de IL-2 após o tratamento com DEX ($p= 0.084$) (Figura 11).

Figura 12. Efeitos da dexametasona *in vitro* em PBMC de voluntários saudáveis. Níveis de IL-2 (A), IL-4 (B), IL-6 (C), IL-10 (D), IL-17A (E), IFN- γ (F), TNF (G), IL-1 β (H). ** $p < 0.01$, ns= não significante.



Foi avaliado separadamente o efeito da dexametasona *in vitro* em PBMC de pacientes que estavam tomando corticosteroides (n=8) e PBMC de pacientes que não estavam fazendo o uso desses medicamentos (n=13). A resposta ao tratamento *in vitro* foi semelhante em ambos os grupos e não foi possível observar a influência do tratamento prévio com corticoides sistêmicos. Com exceção da IL-17F, que não foi reduzida em ambos os grupos quando avaliados separadamente (p= 0.296 e 0.053), todas as demais citocinas foram reduzidas significativamente em ambos os grupos após o tratamento com a dexametasona *in vitro* (Figura 12).

Figura 13. Efeito da dexametasona *in vitro* em PBMC de pacientes com esclerose sistêmica usando glicocorticoides (GC+) ou não (GC-). Níveis de IL-2 (A), IL-4 (B), IL-6[#] (C), IL-10 (D), IL-17A (E), IL-17F[#] (F), IFN- γ [#] (G), TNF (H) e IL-1 β (I). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. [#]= 20 pacientes.



5 DISCUSSÃO

Sabe-se que a vitamina D é um importante regulador do sistema imunológico capaz de atuar nas células T, inibindo a proliferação e secreção de várias citocinas (CANTORNA et al., 2015; PALMER et al., 2011), e tem mostrado eficácia no tratamento e prevenção de doenças autoimunes (CARMEL et al., 2015; LEMIRE; INCE; TAKASHIMA, 1992; MATHIEU et al., 1994). Além disso, foram descritas propriedades antifibróticas desempenhadas pela vitamina D na produção de colágeno e na sinalização do TGF- β (KENDALL; FEGHALI-BOSTWICK, 2014; ZERR et al., 2014).

No presente trabalho buscamos avaliar os níveis séricos da 25 (OH) vitamina D em pacientes com esclerose sistêmica e as possíveis correlações com parâmetros clínicos da doença. Observamos que pacientes com ES apresentam menores níveis séricos de vitamina D e uma alta frequência de insuficiência de vitamina D quando comparados com controles saudáveis. Esses resultados estão de acordo com estudos prévios e com uma recente meta-análise que confirmou a diminuição dos níveis de vitamina D em pacientes com ES (PARK et al., 2017; SAMPAIO-BARROS et al., 2016b; TROMBETTA et al., 2017; VACCA et al., 2009; ZHANG et al., 2017; AN; CHEN, 2017). Entretanto, ainda não está claro se essa hipovitaminose D generalizada dos pacientes é causa ou consequência da doença. Alguns fatores de risco parecem influenciar a alta prevalência de hipovitaminose D em pacientes com ES, como redução da exposição ao sol, insuficiência renal, comprometimento gastrointestinal, fibrose e hiperpigmentação da pele, fatores podem interferir na síntese e absorção da vitamina D (CARMEL et al., 2015). Não encontramos diferenças significativas nos níveis de vitamina D quando comparamos pacientes com a forma cutânea difusa e cutânea limitada, embora alguns autores mostrem que pacientes com a forma cutânea difusa apresentam concentrações mais baixas de vitamina D (AN; CHEN, 2017; CORRADO et al., 2015b). Essa diferença nos resultados pode ser explicada pelo baixo número de pacientes analisados no nosso estudo. Estudos sugerem associações entre hipovitaminose D e disfunção diastólica, contraturas digitais, hipertensão arterial pulmonar, calcinose e úlceras digitais (GIUGGIOLI et al., 2017; GROSEANU et al., 2016; PARK et al., 2017), embora não tenhamos encontrado nenhuma associação com parâmetros clínicos da doença.

A 1 α ,25-dihidroxitamina D (1,25(OH) $_2$ D $_3$) é a forma ativa da vitamina D e exerce suas funções através do VDR, um receptor nuclear que atua como um fator de

transcrição dependente de ligante. A variada expressão desse receptor nos diversos tecidos do corpo garante a gama de efeitos desempenhados pela vitamina D, incluindo as ações na imunidade inata e adaptativa (MOK et al., 2012; YEE et al., 2005). Embora alguns estudos tenham demonstrado os efeitos imunomoduladores da vitamina D em modelos animais de doenças autoimunes (CANTORNA; HAYES; DELUCA, 1998; FOURNIER et al., 1990; LEMIRE; INCE; TAKASHIMA, 1992; VAN ET TEN et al., 2003), não há estudos avaliando esses efeitos na ES. No nosso estudo, mostramos que o tratamento com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ em PBMC de pacientes com ES promoveu redução significativa nos níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-17A, IL-17F, IFN- γ e TNF. Esses achados corroboram com estudos que mostram inibição das respostas Th1/Th17 promovida pela vitamina D (BAEKE et al., 2010; BANSAL et al., 2012; BOONSTRA et al., 2015). No entanto, há evidências mostrando que a vitamina D promove inibição das células Th1, expansão das células Th2 e aumento da produção de IL-4 (BOONSTRA et al., 2015; MAHON et al., 2003). Em contraste, Staeva-Vieira e Freedman [2002] mostraram a ação da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ no processo de diferenciação de células T, inibindo a produção de IFN- γ e IL-4 produzidas por células Th1 e Th2, respectivamente (STAEVA-VIEIRA; FREEDMAN, 2002). De forma interessante, observamos que o tratamento com a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ promoveu redução nos níveis de IL-4 na menor concentração e a resposta foi alterada a medida que a concentração da vitamina D aumentou, induzindo assim a um aumento nos níveis de IL-4.

Os efeitos desempenhados pela vitamina D em PBMC de pacientes com ES podem representar uma importante alternativa de tratamento, visto que essas citocinas moduladas desempenham papéis fundamentais na fisiopatogênese da doença. Pacientes com ES apresentam níveis séricos aumentados das citocinas IFN- γ e TNF, além de associação com hipertensão arterial pulmonar e fibrose pulmonar (BĂLĂNESCU et al., 2015b; MURDACA et al., 2014; PEHLIVAN et al., 2012), adicionalmente a IL-2 também é associada com a doença pulmonar intersticial (SCHMIDT et al., 2009). Vários estudos mostraram a participação da IL-17 na ES, foram descritas associações com a atividade da doença, envolvimento pulmonar e fibrose de pele (MURATA et al., 2008b; OLEWICZ-GAWLIK et al., 2014; YANG et al., 2014). A IL-10 pode ser produzida por células Th0, Th1 e Th2, e podem suprimir a proliferação de linfócitos e também a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6. Estudos realizados mostram que a vitamina D promove aumento na produção de IL-10, corroborando com os nossos

resultados em PBMC de pacientes com ES (DZIANKOWSKA-BARTKOWIAK; ZALEWSKA; SYSA-JEDRZEJOWSKA, 2004; SCHLEITHOFF et al., 2006). Adicionalmente, observamos que a vitamina D promoveu redução dos níveis de IL-6, essa citocina é associada com disfunção endotelial e com o processo fibrótico na ES (BARNES; ANDERSON; MOOTS, 2011). O tratamento com tocilizumabe, um anticorpo monoclonal anti-IL-6R, promoveu melhora da fibrose dérmica em pacientes com ES (SHIMA et al., 2010).

A fibrose representa um dos principais mecanismos da ES que contribuem para o aumento da mortalidade e diminuição da qualidade de vida dos indivíduos acometidos pela doença (HIGUCHI et al., 2015). A expressão de α -SMA é uma característica do miofibroblasto, uma célula especializada que produz grandes quantidades de matriz extracelular (KENDALL; FEGHALI-BOSTWICK, 2014; LEASK, 2010). Estudos realizados mostraram a presença de miofibroblastos em lesões fibróticas de pele e pulmão de pacientes com ES, sugerindo que essas células contribuem ativamente para o desenvolvimento da fibrose patológica que acomete esses órgãos (HUA-HUY et al., 2010; VARGA; ABRAHAM, 2007). Nós mostramos nesse estudo que o tratamento com a vitamina D promoveu redução significativa na expressão gênica de ACTA2 (α -SMA) em fibroblastos de pele saudável estimulados com TGF- β , embora não tenhamos visto redução significativa na expressão dos genes IL6 e COL1A1. Em fibroblastos saudáveis de pulmão não observamos redução significativa na expressão dos genes avaliados. Zeer *et al.* [2014] mostraram em seu estudo que o VDR é um regulador negativo da sinalização do TGF- β , o tratamento com um análogo da vitamina D melhorou a fibrose em um modelo animal de ES e inibiu a sinalização do TGF- β em fibroblastos dérmicos (ZERR et al., 2014). A regulação na expressão de α -SMA após o tratamento com a vitamina D em fibroblastos estimulados com TGF- β que observamos no nosso estudo pode envolver os mecanismos observados por Zeer *et al.*

O tratamento da ES é desafiador, uma vez que se trata de uma doença complexa que afeta múltiplos órgãos e a fisiopatogênese não está completamente compreendida. Não existe um tratamento que cure a ES, embora tenha havido progresso substancial nas últimas décadas (DENTON, 2015; KOWAL-BIELECKA et al., 2009).

Os glicocorticoides (GC) são uma classe de hormônios esteroides que regulam várias funções do sistema imunológico, inflamação, metabolismo e homeostase. Os GC

são amplamente usados em todo o mundo no tratamento de várias doenças inflamatórias e autoimunes devido os seus importantes efeitos imunomoduladores (RAMAMOORTHY; CIDLOWSKI, 2016; YANABA, 2016). No tratamento da ES, os GC são amplamente utilizados, embora não existam muitas evidências comprovando sua eficácia, e os efeitos desempenhados na doença sejam controversos (HERRICK, 2017; YANABA, 2016).

Aproximadamente 40% dos pacientes com ES fazem uso de corticoides, principalmente aqueles com a forma cutânea difusa, doença pulmonar intersticial, miosite e artrite (HUNZELMANN et al., 2009; IUDICI et al., 2016). Alguns estudos sugerem que os GC apresentam benefícios no tratamento da ES, como melhora da fibrose cutânea, em pacientes que receberam DEX intravenosa como monoterapia ou associada com ciclofosfamida (DOGRA et al., 2017; PAI et al., 1995b; SHARADA et al., 1994; VISWANATH et al., 2010). Os GC são frequentemente usados em combinação com outros medicamentos, principalmente metotrexato, ciclofosfamida, azatioprina e micofenolato de mofetil (HUNZELMANN et al., 2009). No nosso estudo, 38% dos pacientes com ES avaliados usavam corticoides, desse grupo 75% usavam em associação com outros medicamentos, principalmente azatioprina. Adicionalmente, o grupo de pacientes que fazia uso de corticoides apresentou uma maior frequência de disfunção esofágica, quando comparado ao grupo que não usava esses medicamentos. Embora o uso dos GC seja amplo na ES, alguns estudos sugerem que eles representam um fator de risco para o desenvolvimento de crise renal (DEMARCO et al., 2002; DENTON; STEEN, 2012; STEEN; MEDSGER, 2000).

Estudos *in vivo* e *in vitro* realizados anteriormente relataram efeitos desempenhados pelos GC na inibição de citocinas Th1, como IFN- γ , TNF e IL-2, e aumento das citocinas Th2, como IL-4, IL-10 e IL-13 (AGARWAL; MARSHALL, 1998; ELENKOV, 2004). Nós observamos os efeitos promovidos pela DEX em PBMC de pacientes com ES, os níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-17F, IFN- γ , TNF e IL-1 β foram reduzidos significativamente após tratamento das células estimuladas com os anticorpos anti-CD3 e anti-CD28. Esses resultados mostram que o efeito da DEX não foi seletivo, promoveu supressão de todas as citocinas avaliadas no estudo. Em PBMC de voluntários saudáveis os efeitos foram semelhantes, com exceção da IL-2 que não foi reduzida significativamente no sobrenadante das culturas. Esses resultados são de grande importância, uma vez que as citocinas moduladas pelo

tratamento com DEX em PBMC de pacientes com ES desempenham papéis cruciais na fisiopatogênese da doença. Além disso, há uma ausência de estudos que mostrem os efeitos desempenhados pelos GC na ES, esses dados podem ajudar a esclarecer os mecanismos de ação desses medicamentos na doença e dar suporte para o desenvolvimento de mais estudos que façam uma investigação mais ampla. Em PBMC de pacientes com artrite reumatoide o tratamento com DEX promoveu redução nos níveis de IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ , corroborando com os nossos achados (DE et al., 2002; SONG et al., 2013). Em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES), pacientes tratados com corticoides apresentaram níveis séricos menores de IL-10 quando comparados com pacientes que não usavam esses medicamentos, além disso observou-se que a DEX *in vitro* promoveu redução nos níveis de IL-10 em PBMC de pacientes com LES e controles saudáveis (CEPIKA et al., 2012).

6 CONCLUSÕES

- Pacientes com ES apresentaram níveis séricos de 25(OH) vitamina D mais baixos e maior frequência de hipovitaminose D quando comparados com indivíduos saudáveis.
- O tratamento com a vitamina D promoveu redução nos níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-17A, IL-17F, IFN- γ e TNF, além de aumentar os níveis de IL-4 e IL-10 em PBMC de pacientes com ES, sugerindo seu potencial terapêutico na doença.
- A vitamina D regulou negativamente a expressão de α -SMA em fibroblastos saudáveis de pele estimulados pelo TGF- β , evidenciando sua ação antifibrótica.
- Não foram observados efeitos do tratamento da vitamina D em fibroblastos saudáveis de pulmão.
- Não houve diferenças entre manifestações clínicas e resposta ao tratamento *in vitro* em pacientes com níveis séricos suficientes ou insuficientes de vitamina D.
- O tratamento com DEX em PBMC de pacientes com ES promoveu redução significativa nos níveis de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-17F, IFN- γ , TNF e IL-1 β , evidenciando importante atividade imunomoduladora ainda não descrita anteriormente na ES.

7 PERSPECTIVAS

- Avaliar a atividade antifibrótica da vitamina D em fibroblastos cutâneos de pacientes com ES.
- Investigar os mecanismos de ação da vitamina D em PBMC e fibroblastos cutâneos de pacientes com ES.
- Avaliar a atividade imunomoduladora da vitamina D na produção de quimiocinas em PBMC de pacientes com ES.
- Avaliar a atividade imunomoduladora e antifibrótica da vitamina D em modelos animais de ES.
- Avaliar a atividade antifibrótica da DEX em fibroblastos cutâneos de pacientes com ES.
- Investigar os mecanismos de ação da DEX em PBMC e fibroblastos cutâneos de pacientes com ES.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, S. K.; MARSHALL, G. D. Glucocorticoid-induced type 1/type 2 cytokine alterations in humans: a model for stress-related immune dysfunction. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 18, n. 12, p. 1059–68, 1998.
- ALLANORE, Y.; MATUCCI-CERINIC, M.; DISTLER, O. Treatment of systemic sclerosis: is there any hope for the future? **RMD open**, v. 2, n. 2, p. e000260, 2016.
- ALMEIDA, I. et al. Systemic sclerosis refractory disease: From the skin to the heart. **Autoimmunity Reviews**, v. 10, n. 11, p. 693–701, 2011.
- AN, L.; CHEN, F. Vitamin D levels in systemic sclerosis patients : a meta-analysis. p. 3119–3125, 2017.
- ANTIGA, E. et al. Regulatory T cells in the skin lesions and blood of patients with systemic sclerosis and morphoea. **British Journal of Dermatology**, v. 162, n. 5, p. 1056–1063, 2010.
- ARFIAN, N. et al. Vitamin D attenuates kidney fibrosis via reducing fibroblast expansion, inflammation, and epithelial cell apoptosis. **Kobe Journal of Medical Sciences**, v. 62, n. 2, p. E38–E44, 2016.
- ARNETT, F. C. et al. Familial occurrence frequencies and relative risks for systemic sclerosis (Scleroderma) in three United States cohorts. **Arthritis and Rheumatism**, v. 44, n. 6, p. 1359–1362, 2001.
- ARNSON, Y. et al. Serum 25-OH vitamin D concentrations are linked with various clinical aspects in patients with systemic sclerosis: A retrospective cohort study and review of the literature. **Autoimmunity Reviews**, v. 10, n. 8, p. 490–494, 2011.
- ASANO, Y. Recent advances in the treatment of skin involvement in systemic sclerosis. **Inflammation and Regeneration**, v. 37, n. 1, p. 12, 2017.
- BAEKE, F. et al. **Vitamin D: Modulator of the immune system** *Current Opinion in Pharmacology*, 2010.
- BĂLĂNESCU, P. et al. IL-17, IL-6 and IFN- γ in Systemic Sclerosis Patients. **Romanian journal of internal medicine = Revue roumaine de medecine interne**, v. 53, n. 1, p. 44–9, 2015.
- BANSAL, A. S. et al. T helper cell subsets in arthritis and the benefits of immunomodulation by 1,25(OH) $_2$ vitamin D. **Rheumatology international**, v. 32, n. 4, p. 845–52, 2012.
- BARNES, T. C.; ANDERSON, M. E.; MOOTS, R. J. The many faces of interleukin-6: The role of IL-6 in inflammation, vasculopathy, and fibrosis in systemic sclerosis. **International Journal of Rheumatology**, v. 2011, 2011.
- BARON, M. Special Issue on Rheumatology Targeted Therapy in Systemic Sclerosis. n. 4, p. 1–6, 2016.

BARNES, J.; MAYES, M. D. Epidemiology of systemic sclerosis : incidence , prevalence , survival , risk factors , malignancy , and environmental triggers. p. 165–170, 2012.

BARNES, T. C.; ANDERSON, M. E.; MOOTS, R. J. The many faces of interleukin-6: The role of IL-6 in inflammation, vasculopathy, and fibrosis in systemic sclerosis. **International Journal of Rheumatology**, v. 2011, 2011.

BIELECKI, M. et al. Increased production of a proliferation-inducing ligand (APRIL) by peripheral blood mononuclear cells is associated with antitopoisomerase I antibody and more severe disease in systemic sclerosis. **Journal of Rheumatology**, v. 37, n. 11, p. 2286–2289, 2010.

BOONSTRA, A. et al. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 Has a Direct Effect on Naive CD4 + T Cells to Enhance the Development of Th2 Cells. **The Journal of immunology**, v. 167, p. 4974–4980, 2015.

BRAUN-MOSCOVICI, Y. et al. Vitamin D, parathyroid hormone, and acroosteolysis in systemic sclerosis. **Journal of Rheumatology**, v. 35, n. 11, p. 2201–2205, 2008.

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

CANTORNA, M. T. et al. Vitamin D and 1,25(OH)₂D Regulation of T cells. **Nutrients**, v. 7, p. 3011–3021, 2015.

CANTORNA, M. T.; HAYES, C. E.; DELUCA, H. F. 1,25-Dihydroxycholecalciferol inhibits the progression of arthritis in murine models of human arthritis. **The Journal of nutrition**, v. 128, n. June 1997, p. 68–72, 1998.

CARAMASCHI, P. et al. Very low levels of vitamin D in systemic sclerosis patients. **Clinical Rheumatology**, v. 29, n. 12, p. 1419–1425, 2010.

CARMEL, N. N. et al. Vitamin D Antibodies in Systemic Sclerosis Patients: Findings and Clinical Correlations. **The Israel Medical Association journal : IMAJ**, v. 17, n. 2, p. 80–4, 2015.

CARTONA, M. T., SNYDER, L., LIN, Y., YANG, L. Vitamin D and 1,25(OH)₂D Regulation of T cells. **Nutrients**, v(7) 3011-3021.

CEPIKA, A. M. et al. Decrease in circulating DNA, IL-10 and BAFF levels in newly-diagnosed SLE patients after corticosteroid and chloroquine treatment. **Cellular Immunology**, v. 276, n. 1–2, p. 196–203, 2012.

CHAISSON, N. F.; HASSOUN, P. M. Systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension. **Chest**, v. 144, n. 4, p. 1346–1356, 2013.

CHIZZOLINI, C. et al. Th2 cell membrane factors in association with IL-4 enhance matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) while decreasing MMP-9 production by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-differentiated human monocytes. **J Immunol**, v. 164, n. 11, p. 5952–5960, 2000.

CHIZZOLINI, C. Update on pathophysiology of scleroderma with special reference to immunoinflammatory events. **Annals of medicine**, v. 39, n. November, p. 42–53, 2007.

CHIZZOLINI, C. et al. Fibrosis and immune dysregulation in systemic sclerosis. **Autoimmunity Reviews**, v. 10, n. 5, p. 276–281, 2011.

CHIZZOLINI, C.; BOIN, F. The role of the acquired immune response in systemic sclerosis. **Seminars in Immunopathology**, v. 37, n. 5, p. 519–528, 2015.

CHIZZOLINI, C., PAREL, Y., SCHEJA, A., DAYER, J. Polarized subsets of human T-helper cells induce distinct patterns of chemokine production by normal and systemic sclerosis dermal fibroblasts. **Arthritis Research & Therapy**, 2005.

CHOI, M. Y.; FRITZLER, M. J. Progress in understanding the diagnostic and pathogenic role of autoantibodies associated with systemic sclerosis. **Current opinion in rheumatology**, v. 28, n. 6, p. 586–94, 2016.

CALZOLARI, G. et al. Hypovitaminosis D in systemic sclerosis. **J Rheumatol**, v(36), 2844–2845, 2009.

CORRADO, A. et al. Relationship between Body Mass Composition, Bone Mineral Density, Skin Fibrosis and 25(OH) Vitamin D Serum Levels in Systemic Sclerosis. **PloS one**, v. 10, n. 9, p. e0137912, 2015.

DAOUSSIS, D. et al. Treatment of systemic sclerosis-associated calcinosis: a case report of rituximab-induced regression of CREST-related calcinosis and review of the literature. **Seminars in arthritis and rheumatism**, v. 41, n. 6, p. 822–829, jun. 2012.

DANTAS, A. T. et al. Interferons and systemic sclerosis: correlation between interferon gamma and interferon-lambda 1 (IL-29). **Autoimmunity**, v. 48, n. 7, p. 429–433, 2015.

DANTAS, A. T. et al. Reassessing the Role of the Active TGF- β 1 as a Biomarker in Systemic Sclerosis : Association of Serum Levels with Clinical Manifestations. v. 2016, 2016.

DELUCA, H. F. et al. P-4 Mechanism of Action of 1,25-Dihydroxyvitamin D on Target Gene Expression. p. 19–26, [s.d.].

DENTON, C. P. et al. Renal complications and scleroderma renal crisis. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 48 Suppl 3, p. iii32–i35, 2009.

DENTON, C. P.; BLACK, C. M.; ABRAHAM, D. J. Mechanisms and consequences of fibrosis in systemic sclerosis. **Nature Clinical Practice Rheumatology**, v. 2, n. 3, p. 134–44, 2006.

DE, A. et al. Effects of dexamethasone on lymphocyte proliferation and cytokine production in rheumatoid arthritis. **The Journal of rheumatology**, v. 29, n. 1, p. 46–51, jan. 2002.

DEMARCO, P. J. et al. Predictors and outcomes of scleroderma renal crisis: The High-Dose Versus Low-Dose D-Penicillamine in early diffuse systemic sclerosis trial. **Arthritis and Rheumatism**, v. 46, n. 11, p. 2983–2989, 2002.

DENTON, C. P. Advances in pathogenesis and treatment of systemic sclerosis. **Clinical medicine (London, England)**, v. 15 Suppl 6, n. 6, p. s58-63, 2015.

DENTON, C. P.; STEEN, V. Scleroderma renal crisis. In: **Scleroderma: From Pathogenesis to Comprehensive Management**. [s.l: s.n.]. p. 361–371.

DOGRA, D. et al. **Dexamethasone-cyclophosphamide pulse therapy in systemic sclerosis: A retrospective study from a tertiary care hospital**. **Indian journal of dermatology, venereology and leprology** India, 2017.

DZIANKOWSKA-BARTKOWIAK, B.; ZALEWSKA, A.; SYSA-JEDRZEJOWSKA, A. Duration of Raynaud's phenomenon is negatively correlated with serum levels of interleukin 10 (IL-10), soluble receptor of interleukin 2 (sIL2R), and sFas in systemic sclerosis patients. **Medical Science Monitor**, v. 10, n. 5, p. CR202-CR208, 2004.

ELENKOV, I. J. Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1024, p. 138–146, 2004.

ENGLERT, H., SMALL-MCMAHON, J., CHAMBERS, P., O 'CONNOR, H., DAVIS, K., MANOLIOS, N., et al. Familial risk estimation in systemic sclerosis. , 1999.

FERNANDES DAS NEVES, M. et al. **Treatment of systemic sclerosis with tocilizumab**. **Rheumatology (Oxford, England)** England, fev. 2015.

FERNANDES, J.; KUMAR, P.; KUMAR, A. Synthesis of Some Novel Oxazolidinones Having Benzo Thiazinen Derivatives as Antimicrobial and Anti-Inflammatory Agents. v. 5, n. 3, p. 101–104, 2013.

FIRSZT, R. et al. Interleukin-13 induces collagen type-1 expression through matrix metalloproteinase- 2 and transforming growth factor- γ 1 in airway fibroblasts in asthma. **European Respiratory Journal**, v. 43, n. 2, p. 464–473, 2014.

FISCHER, K. D.; AGRAWAL, D. K. Vitamin D regulating TGF- β induced epithelial-mesenchymal transition. **Respiratory research**, v. 15, p. 146, 2014.

FLAVAHAN, N. A. et al. The vasculopathy of Raynaud's phenomenon and scleroderma. **Rheumatic diseases clinics of North America**, v. 29, n. 2, p. 275–91, vi, 2003.

FOURNIER, C. et al. In vivo beneficial effects of cyclosporin A and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the induction of experimental autoimmune thyroiditis. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 54, n. 1, p. 53–63, 1990.

FONTES, A.; MARGARET, M.; PIZZICHINI, M. Atualização na etiopatogênese da esclerose sistêmica. v. 3, 2013.

FORBES, A; MARIE, I. Gastrointestinal complications: the most frequent internal complications of systemic sclerosis. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 48 Suppl 3, n. December 2008, p. iii36-i39, 2009.

FRANÇOIS, A. et al. B lymphocytes and B-cell activating factor promote collagen and profibrotic markers expression by dermal fibroblasts in systemic sclerosis. **Arthritis**

research & therapy, v. 15, n. 5, p. R168, 2013.

GIACOMELLI, R., CIPRIANI, P., DANESE, C. et al., Peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic sclerosis produce increased amounts of interleukin 6, but not transforming growth factor β 1. **Journal of Rheumatology**, v(23), 294–296, 1996.

GIUGGIOLI, D. et al. Serum 25-OH vitamin D levels in systemic sclerosis: analysis of 140 patients and review of the literature. **Clinical Rheumatology**, v. 36, n. 3, p. 583–590, 2017.

GIZINSKI, A. M.; FOX, D. A. T cell subsets and their role in the pathogenesis of rheumatic disease. **Current opinion in rheumatology**, v. 26, n. 2, p. 204–10, 2014.

GRAF, S. W., HAKENDORF, P., LESTER, S., PATTERSON, K., WALKER, J. G., SMITH, M. D, et al. South Australian Scleroderma Register: autoantibodies as predictive biomarkers of phenotype and outcome. **Int J Rheum Dis**, v(15), 102–109, 2012.

GREGORI, S. et al. A 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ Analog Enhances Regulatory T-Cells and Arrests Autoimmune Diabetes in NOD Mice. v. 25, n. 25, p. 1367–1374, [s.d.].

GROSEANU, L. et al. Low vitamin D status in systemic sclerosis and the impact on disease phenotype. p. 50–55, 2016.

HAAS, J. et al. Hypovitaminosis D upscales B-cell immunoreactivity in multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 294, p. 18–26, 2016.

HASEGAWA, M.; SATO, S.; TAKEHARA, K. Augmented production of transforming growth factor- β by cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic sclerosis. **Archives of Dermatological Research**, v. 296, n. 2, p. 89–93, 2004.

HASEGAWA, M., SATO, S., NAGAOKA, T., FUJIMOTO, M., TAKEHARA, K. Serum levels of tumor necrosis factor and interleukin-13 are elevated in patients with localized scleroderma. **Dermatology**, v(207), 141–147, 2003.

HASEGAWA M, FUJIMOTO M, KIKUCHI K, TAKEHARA K. Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. **J Rheumatol**, (24), 328–332, 1997.

HE, X.-J. et al. Roles of 1,25(OH) α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ and Vitamin D Receptor in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus by Regulating the Activation of CD4⁺ T Cells and the PKC δ /ERK Signaling Pathway. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 3–4, p. 743–756, 2016.

HERRICK, A. L. et al. Observational Study of Treatment Outcome in Early Diffuse Cutaneous Systemic Sclerosis. **The Journal of Rheumatology**, v. 37, n. 1, p. 116–124, 2010.

HERRICK, A. L. The pathogenesis, diagnosis and treatment of Raynaud phenomenon. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 8, n. 8, p. 469–479, 2012.

HERRICK, A. L. Controversies on the use of steroids in systemic sclerosis. **Journal of Scleroderma and Related Disorders**, v. 2, n. 2, p. 84–91, 31 maio 2017.

HIGUCHI, T. et al. Sildenafil attenuates the fibrotic phenotype of skin fibroblasts in patients with systemic sclerosis. **Clinical Immunology**, v. 161, n. 2, p. 333–338, 2015.

HO, Y. Y. et al. Fibrosis-a lethal component of systemic sclerosis. **Nature reviews. Rheumatology**, v. 10, n. 7, p. 390–402, 2014.

HORIMOTO, A. M. C. et al. Incidência e prevalência de esclerose sistêmica em Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, n. x x, p. 4–11, 2016.

HUANG, X. L. et al. Role of anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-13 in systemic sclerosis. **Inflammation Research**, v. 64, n. 3–4, p. 151–159, 2015.

HUAUX, F. et al. Dual roles of IL-4 in lung injury and fibrosis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 170, n. 4, p. 2083–2092, 2003.

HUA-HUY, T. et al. Increased alveolar concentration of nitric oxide is related to serum-induced lung fibroblast proliferation in patients with systemic sclerosis. **Journal of Rheumatology**, v. 37, n. 8, p. 1680–1687, 2010.

HUDSON, M. et al. Health-related quality of life in systemic sclerosis: a systematic review. **Arthritis and rheumatism**, v. 61, n. 8, p. 1112–20, 2009.

HUNZELMANN, N. et al. High frequency of corticosteroid and immunosuppressive therapy in patients with systemic sclerosis despite limited evidence for efficacy. **Arthritis Res Ther**, v. 11, n. 2, p. R30, 2009.

IBN YACOUB, Y. et al. Assessment of fatigue and its relationships with disease-related parameters in patients with systemic sclerosis. **Clinical Rheumatology**, v. 31, n. 4, p. 655–660, 2012.

IHN, H. Autocrine TGF- β signaling in the pathogenesis of systemic sclerosis. **Journal of Dermatological Science**, v. 49, n. 2, p. 103–113, 2008.

IUDICI, M. et al. Prevalence and factors associated with glucocorticoids (GC) use in systemic sclerosis (SSc): A systematic review and meta-analysis of cohort studies and registries. **Clinical Rheumatology**, v. 33, n. 2, p. 153–164, 2014.

IUDICI, M. What should clinicians know about the use of glucocorticoids in systemic sclerosis? **Modern Rheumatology**, v. 0, n. 0, p. 1–5, 2017.

IUDICI, M. et al. Outcome of a glucocorticoid discontinuation regimen in patients with inactive systemic sclerosis. **Clinical Rheumatology**, v. 35, n. 8, p. 1985–1991, 2016.

JIANG, N., LI, M., ZENG, X. Correlation of Th17 cells and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells with clinical parameters in patients with systemic sclerosis. **Chin Med J**, v(127), 3557–61, 2014.

JIN, J. et al. Systemic Sclerosis is a Complex Disease Associated Mainly with Immune

Regulatory and Inflammatory Genes. **The open rheumatology journal**, v. 8, p. 29–42, 2014.

JINNIN, M. Mechanisms of skin fibrosis in systemic sclerosis. **Journal of Dermatology**, v. 37, n. 1, p. 11–25, 2010.

KANELLAKIS, P. et al. A pro-fibrotic role for interleukin-4 in cardiac pressure overload. **Cardiovascular Research**, v. 95, n. 1, p. 77–85, 2012.

KAWAKAMI, T. et al. Increased expression of TGF- β receptors by scleroderma fibroblasts: Evidence for contribution of autocrine TGF- β signaling to scleroderma phenotype. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 110, n. 1, p. 47–51, 1998.

KEATING, P.; MUNIM, A.; HARTMANN, J. X. Effect of vitamin D on T-helper type 9 polarized human memory cells in chronic persistent asthma. **Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology**, v. 112, n. 2, p. 154–62, 2014.

KENDALL, R. T.; FEGHALI-BOSTWICK, C. A. Fibroblasts in fibrosis: Novel roles and mediators. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5 MAY, n. May, p. 1–14, 2014.

KHANNA, D. et al. Safety and efficacy of subcutaneous tocilizumab in adults with systemic sclerosis (faSScinate): a phase 2, randomised, controlled trial. **Lancet (London, England)**, v. 387, n. 10038, p. 2630–2640, jun. 2016.

KHOR, C.-G. et al. Rituximab for refractory digital infarcts and ulcers in systemic sclerosis. **Clinical rheumatology**, v. 33, n. 7, p. 1019–1020, jul. 2014.

KOWAL-BIELECKA, O. et al. EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials and Research group (EUSTAR). **Annals of the rheumatic diseases**, v. 68, n. 5, p. 620–628, 2009.

KOWAL-BIELECKA, O., et al. Recent advances in the diagnosis and treatment of systemic sclerosis. **PolskieArchiwumMedycynyWewnętrznej**, v(123) 51-58, 2013.

KORF, H. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 curtails the inflammatory and T cell stimulatory capacity of macrophages through an IL-10-dependent mechanism. **Immunobiology**, v. 217, n. 12, p. 1292–1300, 2012.

KRIEG, T.; TAKEHARA, K. Skin disease: a cardinal feature of systemic sclerosis. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 48 Suppl 3, n. May 2008, p. iii14-i18, 2009.

KUMAR, S. et al. Review article: pathogenesis and clinical manifestations of gastrointestinal involvement in systemic sclerosis. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, 2017.

KURASAWA, K. et al. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. **Arthritis and rheumatism**, v. 43, n. 11, p. 2455–2463, 2000.

LAFYATIS, R. et al. B cell depletion with rituximab in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. **Arthritis and rheumatism**, v. 60, n. 2, p. 578–583, fev. 2009.

LAFYATIS, R. et al. B cell infiltration in systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. **Arthritis and Rheumatism**, v. 56, n. 9, p. 3167–3168, 2007.

LEASK, A. Towards an anti-fibrotic therapy for scleroderma: Targeting myofibroblast differentiation and recruitment. **Fibrogenesis and Tissue Repair**, v. 3, n. 1, p. 1–5, 2010.

LEI, L., ZHAO, C., QIN, F., HE, Z. Y., WANG, X., ZHONG, X. N. Th17 cells and IL-17 promote the skin and lung inflammation and fibrosis process in a bleomycin-induced murine model of systemic sclerosis. **ClinExpRheumatol**, v(5):14-22, 2016.

LEMIRE, J. M.; INCE, A.; TAKASHIMA, M. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 attenuates the expression of experimental murine lupus of MRL/l mice. **Autoimmunity**, v. 12, n. 0891–6934 (Print), p. 143–148, 1992.

LEROY, E. C. et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. **The Journal of rheumatology**, v. 15, n. 2, p. 202–205, fev. 1988.

LEROY, E. C.; MEDSGER, J. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. **Journal of Rheumatology**, v. 28, n. 7, p. 1573–1576, 2001.

MAHON, B. D. et al. The targets of vitamin D depend on the differentiation and activation status of CD4 positive T cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 89, n. 5, p. 922–932, 2003.

MAHLER, M., SILVERMAN, E. D., SCHULTE-PELKUM, J., FRITZLER, M. J. Anti-Scl-70 (topo-I) antibodies in SLE: myth or reality? **Autoimmun Rev**, v(9), 756–60, (2010).

MANNO, R.; BOIN, F. Immunotherapy of systemic sclerosis. **Immunotherapy**, v(2), 863-878, 2010.

MASSAGUE, J., CHEN, Y. G. Controlling TGF- β signaling. **Genes Dev** v(14), 627–644, 2000.

MASI, A. T. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). **Arthritis & Rheumatism**, v. 23, n. 5, p. 581–590, 1980.

MATHIEU, C. et al. Prevention of autoimmune diabetes in NOD mice by 1,25 dihydroxyvitamin D3. **Diabetologia**, v. 37, n. 6, p. 552–558, 1994.

MATSUSHITA, T., HASEGAWA, M., HAMAGUCHI, Y., TAKEHARA, K., SATO, S. Longitudinal analysis of serum cytokine concentrations in systemic sclerosis: association of interleukin 12 elevation with spontaneous regression of skin sclerosis **Journal of Rheumatology**, v(33), 275–284, 2006.

MAYES, M. D.; TROJANOWSKA, M. Genetic factors in systemic sclerosis. **Arthritis research & therapy**, v. 9 Suppl 2, p. S5, 2007.

MEDSGER, T. A. et al. GATA-3 up-regulation in CD8⁺ T cells as a biomarker of immune dysfunction in systemic sclerosis, resulting in excessive interleukin-13 production. **Arthritis and Rheumatism**, v. 63, n. 6, p. 1738–1747, 2011.

MEHRA, S. et al. Autoantibodies in systemic sclerosis. **Autoimmunity Reviews**, v. 12, n. 3, p. 340–354, 2013.

MIERAU, R., MOINZADEH, P., RIEMEKASTEN, G., MELCHERS, I., MEURER, M., REICHENBERGER, F., et al. Frequency of disease-associated and other nuclear autoantibodies in patients of the German network for systemic scleroderma: correlation with characteristic clinical features. **Arthritis Res Ther**, 2011.

MINIER, T. et al. Preliminary analysis of the Very Early Diagnosis of Systemic Sclerosis (VEDOSS) EUSTAR multicentre study: evidence for puffy fingers as a pivotal sign for suspicion of systemic sclerosis. **Annals of the rheumatic diseases**, p. 2087–2093, 2013.

MORRISROE, K. B.; NIKPOUR, M.; PROUDMAN, S. M. Musculoskeletal Manifestations of Systemic Sclerosis. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 41, n. 3, p. 507–518, 2015.

MOK, C. C. et al. Vitamin D deficiency as marker for disease activity and damage in systemic lupus erythematosus: A comparison with anti-dsDNA and anti-C1q. **Lupus**, v. 21, n. 1, p. 36–42, 2012.

MUANGCHAN, C. et al. **The 15% Rule in Scleroderma: The Frequency of Severe Organ Complications in Systemic Sclerosis. A Systematic Review** *Journal of Rheumatology*, 2013.

MURATA, M. et al. **Clinical association of serum interleukin-17 levels in systemic sclerosis: Is systemic sclerosis a Th17 disease?** *Journal of Dermatological Science*, 2008.

MURDACA, G. et al. Potential use of TNF- α inhibitors in systemic sclerosis. **Immunotherapy**, v. 6, n. 3, p. 283–9, 2014.

NAKAHARA, H. et al. Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor production in rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 48, n. 6, p. 1521–1529, 2003.

NAVARRO, C.; BUSTOS, M. L. Etiopatogenia. Nuevos conceptos. **Reumatología Clínica**, v. 2, p. S6–S9, 2006.

NEVE, A.; CORRADO, A.; CANTATORE, F. P. Immunomodulatory effects of vitamin D in peripheral blood monocyte-derived macrophages from patients with rheumatoid arthritis. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 14, n. 3, p. 275–283, 2014.

NIKPOUR, M. et al. Epidemiology of systemic sclerosis. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 24, 857-869, 2010

O'BRIEN, M. A.; JACKSON, M. W. Vitamin D and the immune system: Beyond rickets. **Veterinary Journal**, v. 194, n. 1, p. 27–33, 2012.

OLEWICZ-GAWLIK, A. et al. Interleukin-17 and interleukin-23: Importance in the pathogenesis of lung impairment in patients with systemic sclerosis. **International**

Journal of Rheumatic Diseases, v. 17, n. 6, p. 664–670, 2014.

PAI, B. S. et al. Efficacy of Dexamethasone Pulse Therapy in Progressive Systemic Sclerosis. **International Journal of Dermatology**, v. 34, n. 10, p. 726–728, 1995.

PALMER, M. T. et al. Lineage-specific effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the development of effector CD4 T cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 2, p. 997–1004, 2011.

PALMER, M. T. et al. Lineage-specific effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the development of effector CD4 T cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 2, p. 997–1004, 2011.

PAPP, G. et al. Altered T-cell and regulatory cell repertoire in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. **Scandinavian journal of rheumatology**, v. 40, n. 3, p. 205–10, 2011.

PARK, E.-K. et al. Vitamin D deficiency is associated with digital ulcer but not with atherosclerosis or arterial stiffness in patients with systemic sclerosis: a pilot study. **Clinical Rheumatology**, p. 1–9, 2017.

PEHLIVAN, Y. et al. Serum leptin, resistin and TNF- α Levels in patients with systemic sclerosis: The role of adipokines in scleroderma. **International Journal of Rheumatic Diseases**, v. 15, n. 4, p. 374–379, 2012.

POSTLETHWAITE, A. E.; SHIGEMITSU, H.; KANANGAT, S. Cellular origins of fibroblasts: possible implications for organ fibrosis in systemic sclerosis. **Current opinion in rheumatology**, v. 16, n. 6, p. 733–8, 2004.

RAJA, J.; DENTON, C. P. Cytokines in the immunopathology of systemic sclerosis. **Seminars in Immunopathology**, v. 37, n. 5, p. 543–557, 2016.

RAMIREZ, A. M. A. et al. Vitamina D inhibition of pro-fibrotic effects of transforming growth factor B1 in lung fibroblasts and epithelial cells. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 118, n. 3, p. 142–150, 2010.

RAMAMOORTHY, S.; CIDLOWSKI, J. A. Corticosteroids. Mechanisms of Action in Health and Disease. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 42, n. 1, p. 15–31, 2016.

REVEILLE, J. D., SOLOMON, D. H. The American College of Rheumatology Ad hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: anticitromere, Scl-70, and nucleolar antibodies. **Arthritis Rheum**, 49:399–412, 2003.

RICE, L. M. et al. Fresolimumab treatment decreases biomarkers and improves clinical symptoms in systemic sclerosis patients. **The Journal of clinical investigation**, v. 125, n. 7, p. 2795–2807, jul. 2015.

RICCIERI, V. et al. Interleukin-13 in systemic sclerosis: Relationship to nailfold capillaroscopy abnormalities. **Clinical Rheumatology**, v. 22, n. 2, p. 102–106, 2003.

- SAITO, A. et al. Potential action of IL-4 and IL-13 as fibrogenic factors on lung fibroblasts in vitro. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 132, n. 2, p. 168–176, 2003.
- SANTIAGO, B. et al. Decreased susceptibility to Fas-induced apoptosis of systemic sclerosis dermal fibroblasts. **Arthritis and Rheumatism**, v. 44, n. 7, p. 1667–1676, 2001.
- SATO, S.; HASEGAWA, M.; TAKEHARA, K. Serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 correlate with total skin thickness score in patients with systemic sclerosis. **Journal of Dermatological Science**, v. 27, n. 2, p. 140–146, 2001.
- SCALA, E. et al. Cytokine and chemokine levels in systemic sclerosis: Relationship with cutaneous and internal organ involvement. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 138, n. 3, p. 540–546, 2004.
- SAKKAS, L. I. Spotlight on tocilizumab and its potential in the treatment of systemic sclerosis. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 10, p. 2723–2728, 2016.
- SALMON-HER, V., SERPIER, H., NAWROCKI, B., GILLERY, P., CLAVEL, C., KALIS, B., BIREMBAUT, P., MAQUART, F. X. Expression of interleukin-4 in scleroderma skin specimens and scleroderma fibroblast cultures. Potential role in fibrosis. **Arch Dermatol**, v(132), 802–806, 1996.
- SAMPAIO-BARROS, M. M. et al. Low vitamin D serum levels in diffuse systemic sclerosis: a correlation with worst quality of life and severe capillaroscopic findings. **Revista Brasileira de Reumatologia (English Edition)**, v. 56, n. 4, p. 337–344, 2016.
- SCHMIDT, K. et al. Bronchoalveolar lavage fluid cytokines and chemokines as markers and predictors for the outcome of interstitial lung disease in systemic sclerosis patients. **Arthritis research & therapy**, v. 11, n. 4, p. R111, 2009.
- SCHLEITHOFF, S. S. et al. Vitamin D supplementation improves cytokine profiles in patients with congestive heart failure: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, n. 4, p. 754–759, 2006.
- SCHMIDT, K. et al. Bronchoalveolar lavage fluid cytokines and chemokines as markers and predictors for the outcome of interstitial lung disease in systemic sclerosis patients. **Arthritis research & therapy**, v. 11, n. 4, p. R111, 2009.
- SEGEL, M. J. et al. Effect of IL-2-Bax, a novel interleukin-2-receptor-targeted chimeric protein, on bleomycin lung injury. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 86, n. 5, p. 279–288, 2005.
- SEGURA, B. T., FERRAZ-AMARO, I. Large vessels vasculopathy in systemic sclerosis Vasculopatía de grandes vasos en la esclerosis sistémica. **Med Clin (Barc)**, v145(11), 488–492, 2015.
- SEMPOWSKI, G. D., BECKMANN, M. P., DERDAK, S., PHIPPS, R. P. Subsets of murine lung fibroblasts express membrane-bound and soluble IL-4 receptors. Role of IL-4 in enhancing fibroblast proliferation and collagen synthesis. **J Immunol**, v(152), 3606–3614, 1994.

SENECAL, J. L., HENAULT J., RAYMOND, Y. The pathogenic role of autoantibodies to nuclear autoantigens in systemic sclerosis (scleroderma). **J Rheumatol**, v(32), 1643–9, 2005.

SHARADA, B. et al. Intravenous dexamethasone pulse therapy in diffuse systemic sclerosis - A randomized placebo-controlled study. **Rheumatology International**, v. 14, n. 3, p. 91–94, 1994.

SHARIF, R. et al. Anti-Fibrillarin Antibody in African American Patients with Systemic Sclerosis: Immunogenetics, Clinical Features, and Survival Analysis. **J Rheumatol**, v. 38, n. 8, p. 1622–1630, 2012.

SHIMA, Y. et al. The skin of patients with systemic sclerosis softened during the treatment with anti-IL-6 receptor antibody tocilizumab. **Rheumatology**, v. 49, n. 12, p. 2408–2412, 2010.

SINNATHURAI, P.; SCHRIEBER, L. Treatment of Raynaud phenomenon in systemic sclerosis. **Internal Medicine Journal**, v. 43, n. 5, p. 476–483, 2013.

SONG, N. et al. [Effect of selective phosphodiesterase 4 inhibitors on nuclear factor kappa B, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-8 expression in peripheral blood mononuclear cells in rheumatoid arthritis with interstitial lung disease]. **Zhonghua nei ke za zhi**, v. 52, n. 10, p. 829–832, out. 2013.

SOMMER, M., EISMANN, U., GERTH, J., STEIN, G. Interleukin 4 co-stimulates the PDGF-BB and bFGF-mediated proliferation of mesangial cells and myofibroblasts. **Nephron**, v(92), 868–880, 2002.

SPIES, C. M., STREHL C., VAN DER GOES M. C., BIJLSMA, J. W., BUTTGEREIT, F. Glucocorticoids. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v(25), 891–900, 2011.

STAEVA-VIEIRA, T. P.; FREEDMAN, L. P. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Inhibits IFN- and IL-4 Levels During In Vitro Polarization of Primary Murine CD4+ T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 3, p. 1181–1189, 2002.

STEEN, V. D.; MEDSGER, J. Long-term outcomes of scleroderma renal crisis. **Annals of Internal Medicine**, v. 133, n. 8, p. 600–603, 2000a.

STEEN, V. D.; MEDSGER, T. A. Severe organ involvement in systemic sclerosis with diffuse scleroderma. **Arthritis and Rheumatism**, v. 43, n. 11, p. 2437–2444, 2000b.

STEEN, V. et al. Digital ulcers: overt vascular disease in systemic sclerosis. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 48 Suppl 3, n. Table 2, p. iii19–24, 2009.

STEEN, V. D. Kidney involvement in systemic sclerosis. **La Presse Médicale**, v. 43, n. 10, p. e305–e314, 2014.

STEEN, V. D.; MEDSGER, T. A. Case-control study of corticosteroids and other drugs that either precipitate or protect from the development of scleroderma renal crisis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 41, n. 9, p. 1613–1619, 1998.

- STEEN, V. D. Autoantibodies in systemic sclerosis. **Semin Arthritis Rheum**, v(35), 35–42, 2005.
- STICHERLING, M. Systemic sclerosis - dermatological aspects. Part 1: Pathogenesis, epidemiology, clinical findings. **Jddg**, v. 10, n. 10, p. 705–16, 2012.
- STRUENING, K. a m i l i a l Purposes : ~ n Argument Against the promotion of Family Uniformity. v. 27, n. 3, 1999.
- SUGIMOTO, R. et al. Effect of IL-4 and IL-13 on collagen production in cultured LI90 human hepatic stellate cells. **Liver International**, v. 25, n. 2, p. 420–428, 2005.
- TAO, Q. et al. Vitamin D Prevents the Intestinal Fibrosis Via Induction of Vitamin D Receptor and Inhibition of Transforming Growth Factor-Beta1/Smad3 Pathway. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 60, n. 4, p. 868–875, 2015.
- TANIGUCHI, T. et al. Critical contribution of the interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 axis to vasculopathy associated with systemic sclerosis. **The Journal of dermatology**, v. 44, n. 8, p. 967–971, ago. 2017.
- TEJERA SEGURA, B.; FERRAZ-AMARO, I. [Large vessels vasculopathy in systemic sclerosis]. **Med Clin (Barc)**, v. 145, n. 11, p. 488–492, 2015.
- TORMEY, V. J. et al. Anti-fibrillarin antibodies in systemic sclerosis. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 40, n. 10, p. 1157–1162, 2001.
- TRUCHETET, M.-E. et al. Increased frequency of circulating Th22 in addition to Th17 and Th2 lymphocytes in systemic sclerosis: association with interstitial lung disease. **Arthritis research & therapy**, v. 13, n. 5, p. R166, 2011.
- TROMBETTA, A. C. et al. Vitamin D deficiency and clinical correlations in systemic sclerosis patients: A retrospective analysis for possible future developments. **PloS one**, v. 12, n. 6, p. e0179062, 2017.
- TYNDALL, A; MATUCCI-CERINIC, M.; MÜLLER-LADNER, U. Future targets in the management of systemic sclerosis. **Rheumatology (Oxford, England)**, v(48), 49–53, 2009.
- USATEGUI, A. et al. Topical vitamin D analogue calcipotriol reduces skin fibrosis in experimental scleroderma. **Archives of Dermatological Research**, v. 306, n. 8, p. 757–761, 2014.
- VALENTINI, G. Valentini_2002. v. 54, n. 1, p. 9–11, 2002.
- VAN DEN HOOGEN, F. et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: An american college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. **Arthritis and Rheumatism**, v. 65, n. 11, p. 2737–2747, 2013.
- VAN DER EERDEN, B. C. J. et al. A human vitamin D receptor mutation causes rickets and impaired Th1/Th17 responses. **Bone**, v. 69, p. 6–11, 2014.
- VACCA, A. et al. Vitamin D deficiency and insufficiency in 2 independent cohorts of

patients with systemic sclerosis. **Journal of Rheumatology**, v. 36, n. 9, p. 1924–1929, 2009.

VAN ET TEN, E. et al. Combination of a 1,25-dihydroxyvitamin D₃ analog and a bisphosphonate prevents experimental autoimmune encephalomyelitis and preserves bone. **Bone**, v. 32, n. 4, p. 397–404, 2003.

VARGA, J.; ABRAHAM, D. Systemic sclerosis: A prototypic multisystem fibrotic disorder. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 3, p. 557–567, 2007.

VISWANATH, V. et al. DEXAMETHASONE–CYCLOPHOSPHAMIDE PULSE THERAPY IN PROGRESSIVE SYSTEMIC SCLEROSIS. **Indian Journal of Dermatology**, v. 55, n. 3, p. 304–305, 2010.

WAHSH, E. et al. The vitamin D receptor agonist, calcipotriol, modulates fibrogenic pathways mitigating liver fibrosis in-vivo: An experimental study. **European Journal of Pharmacology**, v. 789, p. 362–369, 2016.

WALKER, J. G., FRITZLER, M. J. Update on autoantibodies in systemic sclerosis. **Curr Opin Rheumatol**, v(19), 580–91, 2007.

WALKER, U. A., TYNDALL, A., CZIRJAK, L., DENTON, C. P., FARGE, B. D., KOWAL-BIELECKA, O., et al. Clinical risk assessment of organ manifestations in systemic sclerosis — a report from the EULAR Scleroderma Trials And Research (EUSTAR) group data base. **Ann Rheum Dis**, v(66), 754–63, 2007.

WELLS, A U.; STEEN, V.; VALENTINI, G. Pulmonary complications: one of the most challenging complications of systemic sclerosis. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 48 Suppl 3, n. May 2008, p. iii40–i44, 2009.

WHITE, J. H. Vitamin D metabolism and signaling in the immune system. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 13, n. 1, p. 21–29, 2012.

WING, K.; SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. **Nature immunology**, v. 11, n. 1, p. 7–13, 2010.

WYNN, T. A. FIBROTIC DISEASE AND THE TH 1/TH 2 PARADIGM Thomas. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 8, p. 583–594, 2009.

YANG, X. et al. Increased frequency of Th17 cells in systemic sclerosis is related to disease activity and collagen overproduction. p. 1–11, 2014.

YANABA, K. Strategy for treatment of fibrosis in systemic sclerosis: Present and future. **Journal of Dermatology**, v. 43, n. 1, p. 46–55, 2016.

YANG, X. et al. Increased frequency of Th17 cells in systemic sclerosis is related to disease activity and collagen overproduction. p. 1–11, 2014.

YEE, Y. K. et al. Vitamin D receptor modulators for inflammation and cancer. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 5, n. 8, p. 761–78, 2005.

YOSHIZAKI, A. et al. Elevated serum interleukin-27 levels in patients with systemic

sclerosis: association with T cell, B cell and fibroblast activation. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 70, n. 1, p. 194–200, 2011.

ZEINEDDINE, N.; KHOURY, L. EL; MOSAK, J. Systemic Sclerosis and Malignancy: A Review of Current Data. **Journal of clinical medicine research**, v. 8, n. 9, p. 625–32, 2016.

ZELLA, J. B.; MCCARY, L. C.; DELUCA, H. F. Oral administration of 1,25-dihydroxyvitamin D3 completely protects NOD mice from insulin-dependent diabetes mellitus. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 417, n. 1, p. 77–80, 2003.

ZERR, P. et al. Vitamin D receptor regulates TGF- β signalling in systemic sclerosis. **Annals of the rheumatic diseases**, p. 1–8, 2014.

ZHANG, L. et al. Association between the serum level of vitamin D and systemic sclerosis in a Chinese population: a case control study. **International journal of rheumatic diseases**, v. 20, n. 8, p. 1002–1008, ago. 2017.

ZHANG, Y. et al. Vitamin D receptor attenuates renal fibrosis by suppressing the renin-angiotensin system. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 21, n. 6, p. 966–973, 2010.

ZHOU, Y. et al. The elevated expression of Th17-related cytokines and receptors is associated with skin lesion severity in early systemic sclerosis. **Human Immunology**, v. 76, n. 1, p. 22–29, 2015.

ZIMMERMANN, A., & PIZZICHINI, M. Atualização na etiopatogênese da esclerose sistêmica. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2013.

ZUO, X. XIA et al. Systematic approach to understanding the pathogenesis of systemic sclerosis. **Clinical Genetics**, 2016.

APÊNDICES

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) PARA PORTADORES DA ESCLEROSE SISTÊMICA

« AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA E ANTIFIBRÓTICA DA VITAMINA D NA ESCLEROSE SISTÊMICA »

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

É importante ressaltar que:

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

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

Nós solicitamos a sua colaboração e participação neste estudo porque você é **portador da esclerose sistêmica**. Este estudo inclui a participação de 40 indivíduos. Entre os quais, 15 são voluntários sadios e 25 são portadores da esclerose sistêmica.

Para este estudo, precisamos coletar algumas células de sangue. A coleta de sangue é feita no braço e a quantidade coletada é equivalente a duas colheres de sopa (10-15 ml). Antes de iniciar a coleta, nós limparemos o seu braço com álcool, e todo material usado na coleta é descartável. A coleta será feita por profissionais treinados e competentes e orientados para reduzir os riscos. Para a amostra de pele, serão utilizados restos de pele retirados na sua cirurgia plástica no Hospital das Clínicas, não havendo necessidade de nenhum procedimento adicional. O objetivo é estudar também o que acontece na pele das pessoas que têm esclerose sistêmica, um dos órgãos mais comprometidos na doença, e para isso precisamos comparar com a pele de indivíduos que não possuem a doença.

Os riscos envolvidos nesse projeto se referem à coleta de sangue, que pode ser desconfortável e o braço pode ficar um pouco dolorido e apresentar hematoma que é uma área arroxeadada no local da coleta. Com relação aos benefícios, você será submetido a uma avaliação clínica e, caso seja detectada alguma alteração sugestiva de doença autoimune, será encaminhado para um acompanhamento adequado.

A coleta de dados só será iniciada após a aprovação do projeto de pesquisa pelo CEP e o cronograma proposto será cumprido. O orçamento financeiro desta pesquisa será de inteira responsabilidade do pesquisador principal.

Os dados coletados pelo estudo ficarão armazenados em arquivos no serviço de Reumatologia, sob a responsabilidade da Dra. Andrea Dantas, por um período mínimo de 5 anos. Os resultados deste estudo serão apresentados em congressos, conferências ou em revistas médicas, mas não aparecerá seu nome. Suas informações nunca serão divulgadas, permanecerão confidenciais.

Você tem alguma pergunta sobre a sua participação neste estudo?

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

Anderson Rodrigues de Almeida, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco. Rua Vanda Maria, Nº34, Pau Amarelo, Paulista-PE, CEP: 53435-780. E-mail: andersonr.almeida@hotmail.com. Cel: (81) 99824-6183

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

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

Profa. Dra. Maira Galdino Da Rocha Pitta, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE. E-mail: mgrpitta@gmail.com. Telefone/Fax: 55 (81) 2126-8346

Em caso de dúvidas relacionados aos aspectos éticos desse estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE- CEP/CCS, no Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, situado na Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Telefone/Fax: 55 (81) 2126-8588, email cepccs@ufpe.br.

Você ficará com uma cópia deste documento.

Nome do responsável pela coleta de sangue:

Se você aceitar participar deste estudo, por favor, preencha o formulário abaixo.

Nome:

RG: _____ **Data:**

Endereço: _____

Assinatura: _____

Testemunha 1: -

RG: _____ **Data:**

Testemunha 2:

RG: _____ **Data:**

Pesquisador Responsável:

_____ **Data:** _____

Assinatura:

Eu _____

_____, assino o presente termo de
consentimento.

RG: _____ **Data** _____

Pesquisador Responsável: _____ **Data:** _____

Assinatura: _____

Impressão Digital do
Paciente

APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) PARA VOLUNTÁRIOS SAUDÁVEIS

« AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA E ANTIFIBRÓTICA DA VITAMINA D NA ESCLEROSE SISTÊMICA »

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

É importante ressaltar que:

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

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

Nós solicitamos a sua colaboração e participação neste estudo porque você é **um voluntário saudável não portador desta doença**. Este estudo inclui a participação de 40 indivíduos. Entre os quais, 15 são voluntários sadios e 25 são portadores da esclerose sistêmica.

Para este estudo, precisamos coletar algumas células de sangue. A coleta de sangue é feita no braço e a quantidade coletada é equivalente a duas colheres de sopa (10-15 ml). Antes de iniciar a coleta, nós limparemos o seu braço com álcool, e todo material usado na coleta é descartável. A coleta será feita por profissionais treinados e competentes e orientados para reduzir os riscos. Para a amostra de pele, serão utilizados restos de pele retirados na sua cirurgia plástica no Hospital das Clínicas, não havendo necessidade de nenhum procedimento adicional. O objetivo é estudar também o que acontece na pele das pessoas que têm esclerose sistêmica, um dos órgãos mais comprometidos na doença, e para isso precisamos comparar com a pele de indivíduos que não possuem a doença.

Os riscos envolvidos nesse projeto se referem à coleta de sangue, que pode ser desconfortável e o braço pode ficar um pouco dolorido e apresentar hematoma que é uma área arroxeadada no local da coleta. Com relação aos benefícios, você será submetido a uma avaliação clínica e, caso seja

detectada alguma alteração sugestiva de doença autoimune, será encaminhado para um acompanhamento adequado.

A coleta de dados só será iniciada após a aprovação do projeto de pesquisa pelo CEP e o cronograma proposto será cumprido. O orçamento financeiro desta pesquisa será de inteira responsabilidade do pesquisador principal.

Os dados coletados pelo estudo ficarão armazenados em arquivos no serviço de Reumatologia, sob a responsabilidade da Dra. Andrea Dantas, por um período mínimo de 5 anos. Os resultados deste estudo serão apresentados em congressos, conferências ou em revistas médicas, mas não aparecerá seu nome. Suas informações nunca serão divulgadas, permanecerão confidenciais.

Você tem alguma pergunta sobre a sua participação neste estudo?

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

Anderson Rodrigues de Almeida, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco. Rua Vanda Maria, Nº34, Pau Amarelo, Paulista-PE, CEP: 53435-780. E-mail: andersonr.almeida@hotmail.com. Cel: (81) 99824-6183

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

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

Profa. Dra. Maira Galdino Da Rocha Pitta, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE. E-mail: mgrpitta@gmail.com. Telefone/Fax: 55 (81) 2126-8346

Em caso de dúvidas relacionados aos aspectos éticos desse estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE- CEP/CCS, no Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, situado na Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Telefone/Fax: 55 (81) 2126-8588, email cepccs@ufpe.br.

Você ficará com uma cópia deste documento.

Nome do responsável pela coleta de sangue:

Se você aceitar participar deste estudo, por favor, preencha o formulário abaixo.

Nome: _____

RG: _____ **Data:** _____

Endereço: _____

Assinatura: _____

Testemunha 1: -

RG: _____ **Data:** _____

Testemunha 2:

RG: _____ **Data:** _____

Pesquisador Responsável:

_____ **Data:** _____

Assinatura:

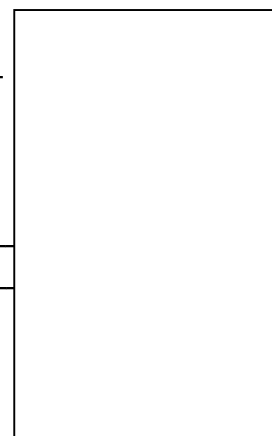
Eu _____

_____, assino o presente termo de
consentimento.

RG: _____ **Data** _____

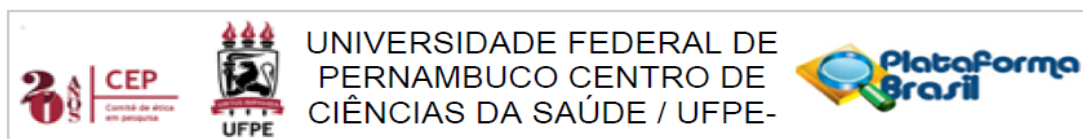
Pesquisador Responsável: _____ **Data:** _____

Assinatura: _____



ANEXOS

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFPE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA E ANTI-FIBRÓTICA DA VITAMINA D NA ESCLEROSE SISTÊMICA

Pesquisador: ANDERSON RODRIGUES DE ALMEIDA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 63517517.1.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.945.148

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica – PPGIT, do mestrando Anderson Rodrigues de Almeida sob a orientação da Profª.Drª.Maira Galdino da Rocha Pitta e co-orientação da Profª.Andréa Tavares Dantas e da Profª.Drª.Michelly Cristiny Pereira. O projeto estuda a esclerose sistêmica e os efeitos imunomodulador e anti-fibrótico da vitamina D.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar os níveis séricos da vitamina D em pacientes portadores de Esclerose Sistêmica (ES), e sua atividade imunomoduladora e anti-fibrótica in vitro em pacientes com ES.

- Avaliar os níveis séricos da 25 (OH) vitamina D em pacientes com Esclerose Sistêmica.
- Avaliar o efeito in vitro da vitamina D na modulação de citocinas e quimiocinas relacionadas com o processo fibrótico em PBMCs de pacientes com ES.
- Avaliar o efeito in vitro da vitamina D na modulação de quimiocinas e da Interleucina-6 em fibroblastos cutâneos de pacientes com ES.
- Avaliar o efeito in vitro da vitamina D na modulação da expressão de fatores de transcrição em PBMCs e fibroblastos cutâneos.
- Correlacionar os dados clínicos com a magnitude da resposta em relação às citocinas e fatores

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

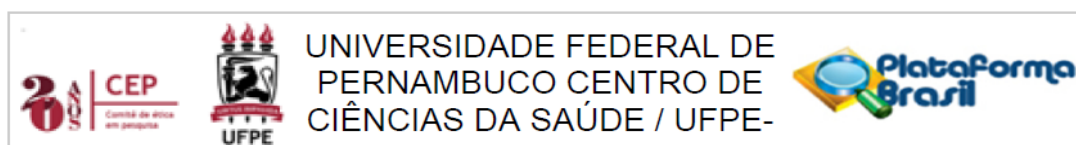
CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.945.148

de transcrição após o tratamento com a vitamina D in vitro.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos envolvidos na pesquisa são riscos mínimos referentes às coletas de sangue ou biópsias de pele, como hematomas e dor. As coletas serão feitas por profissionais competentes e devidamente treinados para reduzir os riscos para o paciente. Os benefícios oferecidos pela pesquisa é a possibilidade de descoberta de um agente terapêutico para tratamento da ES, já que se trata de uma doença sem nenhuma modalidade terapêutica específica, e a gerar conhecimentos sobre a fisiopatogênese da doença em estudo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa será realizada com pacientes com esclerose sistêmica atendidos no ambulatório de pesquisa clínica do Serviço de Reumatologia do HC-UFPE, selecionados aleatoriamente de acordo com o atendimento do ambulatório, através dos critérios de inclusão e exclusão. O grupo de comparação será composto de voluntários saudáveis, que não tenham história clínica ou diagnóstico de ES ou de outras doenças inflamatórias ou autoimunes reumatológicas, selecionados aleatoriamente na população que frequenta o HC acompanhando pacientes que estão em atendimento. Após esclarecimentos sobre a pesquisa, aqueles que aceitarem participar do projeto deverão assinar um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). A amostra será composta por 20 pacientes com ES e 10 voluntários saudáveis. Será coletado 15ml de sangue em tubo contendo o anticoagulante heparina e 4ml de sangue em tubo a seco com gel. As coletas serão feitas por profissionais competentes e devidamente treinados para reduzir os riscos para o paciente. Nenhuma coleta será realizada sem a autorização prévia dos voluntários. A seleção dos participantes está prevista para o semestre 2017.1 e só será iniciada após aprovação pelo CEP. O orçamento é de R\$ 18.288,20 e será de inteira responsabilidade do pesquisador principal.

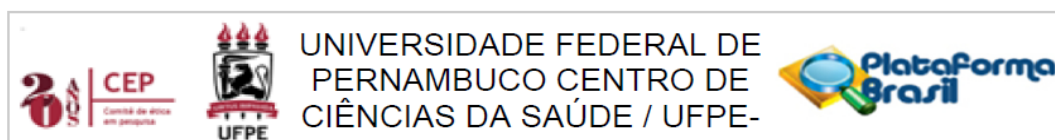
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE desmembrado para pacientes e participantes sadios;
Cartas de anuência dos laboratórios envolvidos estão em acordo com o preconizado;
Folha de rosto assinada;
Termo de confidencialidade em conformidade;

Recomendações:

Sem recomendações

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.945.148

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

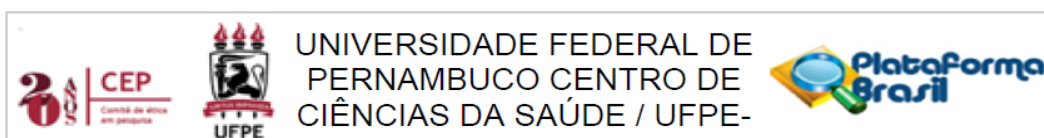
Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_835232.pdf	21/02/2017 23:35:12		Aceito
Outros	CARTA_DE_RESPOSTA_AS_PENDENCIAS.docx	21/02/2017 23:34:51	ANDERSON RODRIGUES DE ALMEIDA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	Projeto_Mestrado.docx	21/02/2017 23:33:06	ANDERSON RODRIGUES DE	Aceito

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.945.148

Investigador	Projeto_Mestrado.docx	21/02/2017 23:33:06	ALMEIDA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Voluntarios.docx	21/02/2017 23:32:51	ANDERSON RODRIGUES DE ALMEIDA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Pacientes.docx	21/02/2017 23:32:36	ANDERSON RODRIGUES DE ALMEIDA	Aceito
Outros	Termo_de_confidencialidade.pdf	04/01/2017 20:57:40	ANDERSON RODRIGUES DE ALMEIDA	Aceito
Outros	Curriculo_Rafaela.pdf	04/01/2017 12:22:49	ANDERSON RODRIGUES DE ALMEIDA	Aceito
Outros	Curriculo_Moacyr.pdf	04/01/2017 12:22:23	ANDERSON RODRIGUES DE ALMEIDA	Aceito
Outros	Curriculo_Michelly.pdf	04/01/2017 12:21:58	ANDERSON RODRIGUES DE ALMEIDA	Aceito
Outros	Curriculo_Maira.pdf	04/01/2017 12:21:34	ANDERSON RODRIGUES DE ALMEIDA	Aceito
Outros	curriculo_claudia.pdf	04/01/2017 12:21:01	ANDERSON RODRIGUES DE ALMEIDA	Aceito
Outros	curriculo_Andrea.pdf	04/01/2017 12:20:33	ANDERSON RODRIGUES DE ALMEIDA	Aceito
Outros	curriculo_Anderson.pdf	04/01/2017 12:19:10	ANDERSON RODRIGUES DE ALMEIDA	Aceito
Outros	Historico.pdf	03/01/2017 22:20:55	ANDERSON RODRIGUES DE ALMEIDA	Aceito
Outros	autorizacao_de_uso_de_dados.pdf	03/01/2017 22:19:20	ANDERSON RODRIGUES DE ALMEIDA	Aceito
Outros	carta_de_anuencia_plastica.pdf	03/01/2017 22:17:52	ANDERSON RODRIGUES DE ALMEIDA	Aceito
Outros	carta_de_anuencia_reumato.pdf	03/01/2017 22:17:04	ANDERSON RODRIGUES DE ALMEIDA	Aceito
Outros	carta_de_anuencia_linat.pdf	03/01/2017 22:16:29	ANDERSON RODRIGUES DE	Aceito

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

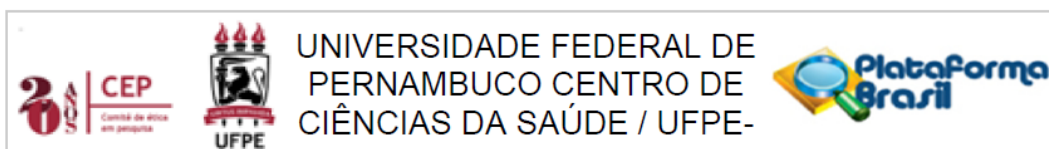
CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.945.148

Outros	carta_de_anuencia_linat.pdf	03/01/2017 22:16:29	ALMEIDA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	03/01/2017 22:09:09	ANDERSON RODRIGUES DE ALMEIDA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 02 de Março de 2017

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br