UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

MAYNARA SANTANA GONÇALVES

Avaliação da integridade endotelial e fibrose na pele de pacientes com esclerose sistêmica submetidos ao transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas

Ribeirão Preto

2020

MAYNARA SANTANA GONÇALVES

Avaliação da integridade endotelial e fibrose na pele de pacientes com esclerose sistêmica submetidos ao transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas

“Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)”

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientadora: Profa. Dra.: Maria Carolina de Oliveira Rodrigues

Ribeirão Preto

2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Santana-Gonçalves, Maynara.

Avaliação da integridade endotelial e fibrose na pele de pacientes com esclerose sistêmica submetidos ao transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas, 2020. 102 p. il. ; 30cm.

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Departamento Imunologia Básica e Aplicada

Orientadora: Oliveira, Maria Carolina

1. Esclerose sistêmica,
2. transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas,
3. fibrose,
4. dano vascular,
5. microvasculatura.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Maynara Santana Gonçalves

Avaliação da integridade endotelial e fibrose na pele de pacientes com esclerose sistêmica submetidos ao transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientadora: Profa. Dra.: Maria Carolina de Oliveira Rodrigues

Aprovado em: 27/05/2020

Banca examinadora

Profa. Dra. Maria Carolina de Oliveira Rodrigues

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP.

Profa. Dra. Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-FMRP/USP.

Profa. Dra. Cristiane Kayser Veiga da Silva

Instituição: Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES).

À minha querida e amada mãe que sempre me incentivou a ser uma mulher livre pela minha
independência e realização profissional.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela benção da vida com saúde para realização dos meus propósitos em busca da minha evolução.

À minha amada mãe por não medir esforços para que eu chegasse até aqui e por me apoiar a ser uma profissional realizada. Aos meus queridos irmãos Matheus e Lucas, obrigada pelo afeto que me abastasse. Ao meu querido pai, por me proporcionar condições de seguir minha caminhada.

À minha madrinha Jovânia pela fonte de inspiração e aprendizado.

À minha prima Cícera pela amorosa torcida.

Aos meus tios queridos Sidney e Fátima, por carinhosamente se preocuparem com meu futuro e torcerem genuinamente por mim.

À minha orientadora Profa. Maria Carolina que ao longo do tempo se tornou “Carol”, obrigada pela oportunidade de aprender constantemente com você, por confiar no meu trabalho e oportunizar meu crescimento profissional e científico. Você me inspira como mulher e cientista.

À profa. Kelen Cristina por contribuir na minha formação profissional, por carinhosamente se dispor a ajudar sempre que necessário. Obrigada pela confiança.

À profa. Leandra Ramalho pela importante colaboração.

Ao meu colega de trabalho Djúlio Zanin que se tornou um amigo para a vida toda, obrigada pelo apoio integral a realização deste trabalho, pelo seu incentivo e carinho. A todos os amigos do laboratório e do Hemocentro que são fontes de trocas e aprendizados: Nádia Noronha, Rafaela Freitas, Marianna Kawashima, Juçara Cominal, Lucas Rocha, Aline Bomfim, Rafael Biaggio, Amanda Mizukami, Mario Soares. Um agradecimento especial ao João Rodrigues que se tornou meu mentor e que tanto somou ao meu amadurecimento científico.

Aos meus amigos da pós-graduação Carolina Monteleone, Felipe Araújo, Rafael Pontes, e Vitor Floriano pela família que formamos em Ribeirão Preto, por todo suporte e momentos juntos que me proporcionam leveza no dia a dia.

Às minhas amigas Carolina Ferreira, Izadora Ormenezi, Julia Oliveira, Sarah Rodrigues, Grazielle Rodrigues e Juliana Prado por estarem comigo durante minha trajetória.

À técnica do laboratório de Patologia e Medicina legal Deisy Mara da Silva, pela contribuição fundamental a este trabalho e por todo aprendizado. À Marlei Augusto pela receptividade e carinho.

À unidade de Transplante de Medula de Óssea do Hospital das Clínicas pelo cuidado no tratamento dos pacientes e pela presteza na coleta das amostras para pesquisa.

Aos pacientes transplantados por confiar em nossa pesquisa e pela doação de todo material necessário para este estudo.

Ao programa de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada pela contribuição à minha formação.

À Ana, secretária da pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada pelo cuidado e dedicação aos alunos, e em especial por toda ajuda na minha chegada.

À Fundação Hemocentro e ao Centro de Terapia Celular pela assistência, infraestrutura e financiamento para realização deste trabalho.

À bibliotecária da Fundação Hemocentro Marjory Donato pelo carinho e ajuda.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pelo suporte financeiro imprescindível.

A todos que fizeram e fazem parte da minha caminhada e contribuem para minha evolução enquanto ser humano e profissional, minha gratidão.

“Que nada nos limite,
que nada nos defina, que nada nos sujeite.
Que a liberdade seja nossa própria substância, já que viver é ser livre.”
(Simone de Beauvoir)

RESUMO

SANTANA-GONCALVES, M. **Avaliação da integridade endotelial e fibrose na pele de pacientes com esclerose sistêmica submetidos a transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas.** 2020. (102)f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão. 2020

A esclerose sistêmica (ES) é uma doença autoimune caracterizada por dano vascular, desregulação do sistema imunológico e fibrose da pele e órgãos internos. A lesão e a apoptose das células endoteliais são indicadas como eventos iniciais da doença, levando a alterações fisiológicas no endotélio e vasculopatia. O transplante de células-tronco hematopoéticas autólogas (TACTH) promove o *resetting* (do inglês, reprogramação) do sistema imunológico e emergiu como uma opção de tratamento para pacientes com ES grave e progressiva. Embora o TACTH leve à melhora clínica, os mecanismos ainda não são completamente compreendidos. Neste estudo, objetivamos avaliar a expressão de marcadores de integridade, dano e ativação endotelial e aspectos de fibrose na pele de pacientes com esclerose sistêmica tratados com TACTH e correlacioná-los com dados clínicos. Dados clínicos e amostras de pele do antebraço de 35 pacientes com ES foram avaliados por imuno-histoquímica (IHC) antes e aos 6 e 12 meses após o TACTH. Amostras de soro de 15 pacientes encontravam-se disponíveis para análise por técnica de multiplex para marcadores endoteliais (E-SELECTINA, ENDOTELINA-1 e VEGFA). As biópsias foram marcadas com anticorpos anti-CD31, -VEGF, -VEGFR2, -ANGIOPOIETINA 1, -ANGIOPOIETINA 2, -TIE, -ENDOTELINA-1, E-SELECTINA, VE-CADERINA e coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e Picrosirius red. As imagens foram analisadas pelo programa ImageJ. A maioria dos participantes era do sexo feminino (80%), com idade média (desvio padrão, DP) de 36 (9,4) anos. O tempo médio (DP) entre o diagnóstico da doença e o transplante foi de 3,2 (3,1) anos. A avaliação clínica da fibrose, avaliada pelo escore de Rodnan (mRSS), melhorou aos 6 e 12 meses em comparação ao período PRÉ. ($p < 0,0001$). A análise histológica da fibrose, avaliada por HE e picrosirius red, mostrou redução da espessura da pele ($p < 0,0001$) e da densidade de colágeno ($p < 0,0001$) após o TACTH. Na microvasculatura, observamos, através da capilaroscopia, alterações morfológicas, com aumento do número de capilares e uma redução nos mega-capilares. Os únicos marcadores endoteliais histológicos que mudaram após o TACTH foram ANG1 ($p < 0,0001$) e E-selectina ($p < 0,0001$), que diminuíram. Todos os demais marcadores avaliados não apresentaram alterações ($p > 0,05$). A expressão de e-selectina se associou com o comprometimento da pele (mRSS) e se correlacionou com a expressão de VEGF. Não houve alterações dos marcadores séricos endoteliais antes e após o TACTH. Nossos dados sugerem que a reversibilidade do dano endotelial associado à doença não é alcançada integralmente após o TACTH. Entretanto, pontuais melhoras são observadas clínica e histologicamente. Acreditamos que o efeito terapêutico do TACTH possa estar mais associado à melhora da fibrose do que a efeitos sobre o compartimento microvascular.

Palavras-chaves: Esclerose sistêmica, transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas, fibrose, dano vascular, microvasculatura.

ABSTRACT

SANTANA-GONCALVES, M. **Assessment of endothelial integrity and fibrosis in the skin of systemic sclerosis patients treated with autologous hematopoietic stem cell transplantation.** 2020. (102) p. Master's dissertation. Ribeirão Preto Medical School - University of São Paulo, Ribeirão Preto. 2020

Systemic sclerosis (SSc) is an autoimmune disease characterized by vascular damage, deregulation of the immune system and fibrosis of the skin and internal organs. Injury and apoptosis of endothelial cells are indicated as initial events of the disease, leading to physiological changes in the endothelium and subsequent vasculopathy. Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation (AHSCT) promotes resetting of the immune system and has emerged as a treatment option for patients with severe and progressive SSc. Although AHSCT leads to clinical improvement, the mechanistic effects are still not completely understood. In this study, we aimed to evaluate the expression of markers of integrity, damage and endothelial activation, as well as aspects of fibrosis in the skin of SSc patients treated with AHSCT and correlate them with clinical data. Skin samples from the forearms of 35 SSc patients were evaluated by immunohistochemistry (IHC) before and at 6 and 12 months after AHSCT. Serum samples from 15 patients were available for analysis using the multiplex technique for endothelial markers (E-SELECTIN, ENDOTHELIN-1, and VEGFA). Biopsies were marked with anti-CD31, -VEGF, -VEGFR2, -ANGIOPOIETIN 1, -ANGIOPOIETIN 2, -TIE, -ENDOTHELIN-1, E-SELECTIN and -VE-CADHERIN antibodies and stained with Hematoxylin and Eosin (HE) and Picrosirius Red. Images were analyzed by ImageJ software. Most participants were female (80%) with a mean (standard deviation, SD) age of 36 (9.4) years. The mean (SD) time between diagnosis of disease and transplantation was 3.2 (3.1) years. Clinical evaluation of fibrosis, assessed by the modified Rodnan's Skin Score (mRSS) improved at 6 and 12 months, compared to baseline ($p < 0.0001$). Histological analysis of fibrosis evaluated by HE and picrosirius red showed reduction of skin thickness ($p < 0.0001$) and collagen density ($p = 0.0193$) after AHSCT. Capillaroscopic analyses of the microvasculature showed morphological changes, with an increased number of capillaries and a reduction in mega-capillaries after AHSCT. The only histological endothelial markers that decreased after AHSCT were ANG1 ($p < 0.0001$) and E-selectin ($p < 0.0001$). All the other evaluated markers remained stable ($p > 0.05$) after AHSCT, when compared to baseline. E-selectin expression in the skin was associated with skin involvement (mRSS) and correlated with VEGF expression. Our data suggest that the reversibility of endothelial damage associated with the disease is not fully achieved after AHSCT. However, occasional improvements are observed clinically and histologically. We believe that the therapeutic effects of AHSCT may be more associated with the improvement of fibrosis than with effects on the microvascular compartment.

Keywords: Systemic sclerosis, autologous hematopoietic stem cell transplantation, fibrosis, vascular damage, microvasculature.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AECA: do inglês, *anti-endothelial cells antibodies* ou anticorpos anti-células endoteliais

ACR/EULAR: do inglês, American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism ou, Colégio Americano de Reumatologia/ Liga Europeia Contra o Reumatismo

ADCC: do inglês, *antibody-dependent cellular cytotoxicity* ou citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos

ANAs: do inglês, *antinuclear antibody* ou, anticorpos anti-nucleares

ANG: Angiopietina

CE: Célula endotelial

CDR3: do inglês, Complementarity-determining region 3, ou região determinante de complementariedade 3

CTH: célula-tronco hematopoética

CVF: Capacidade Vital Forçada

DAMPs: do inglês, *damage-associated molecular pattern* ou, padrões moleculares associados a danos

DLCO: do inglês, *Diffusing capacity for carbon monoxide* ou difusão de monóxido de carbono

EBMT: do inglês, *European Society for Blood and Marrow Transplantation* ou, Registro Europeu de transplante de medula óssea

ECM: do inglês, *extracellular matrix*, ou matriz extracelular.

ES: Esclerose sistêmica

EScSG: do inglês, *European Scleroderma Study Group* ou Grupo Europeu de estudo de Esclerodermia

EUSTAR: do inglês, *European Scleroderma Trials and Research group* ou Grupo Europeu de Estudos e Pesquisas sobre Esclerodermia

ETR: do inglês, *recent thymic emigrants*, ou emigrantes tímicos recentes

G-CSF: do inglês, *Granulocyte-colony stimulating* ou fator estimulante de colônia

HAQ-DI: do inglês, Health Assessment Questionnaire Disability Index ou, Índice de Incapacidade do Questionário de Avaliação de Saúde

LPS - lipopolissacarídeo

mRRS: do inglês, *Modified Rodnan skin score* ou, escore modificado de Rodnan

pDCs: do inglês, *plasmacytoid dendritic cells*, ou células dendríticas plasmócitoides.

PECAM-1: do inglês, *Platelet endothelial cell adhesion molecule* ou molécula de adesão celular endotelial plaquetária

TACTH: Transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas

TGF- β – do inglês *transforming growth* fator beta ou fator de crescimento transformante beta

TLR: do inglês, *Toll like receptor*, ou receptor toll like.

TREG: do inglês, *regulatory T cells*, ou células T reguladoras.

VEGF: do inglês, *Vascular Endothelial Grow Factor* ou fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	2
1.1	Esclerose sistêmica	2
1.2	Anormalidades imunológicas	3
1.3	Disfunções vasculares	4
1.4	Fibrose tecidual	8
1.5	Transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas no tratamento da esclerose sistêmica	9
2	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	15
3.	OBJETIVOS	17
3.1	Objetivo geral	17
3.2	Objetivos específicos	17
4.	CASUÍSTICA, PACIENTES E MÉTODOS	19
4.1	Delineamento do estudo	19
4.2	Pacientes do estudo e Procedimento do TACTH	20
4.3	Biópsias de pele	20
4.4	Dados clínicos	20
4.5	Imunohistoquímica	22
4.6	Coloração com Picrosirius red	23
4.7	Coloração com Hematoxilina e Eosina	23
4.8	Análise das imagens histológicas	24
4.9	Dosagem de marcadores vasculares no soro	24
4.10	Análise estatística	25
5	RESULTADOS	27
5.1	Avaliação clínica dos pacientes com ES antes e pós TACTH	27
5.2	Avaliação histológica da fibrose em biópsias de pele de pacientes com ES submetidos ao tratamento do TACTH	30
5.3	Avaliação histológica do endotélio em biópsias de pele de pacientes com ES submetidos ao tratamento do TACTH	33
5.4	Expressão dos marcadores histológicos pelo escore de comprometimento cutâneo (escore de Rodnan)	44
5.5	Correlação dos marcadores vasculares na pele dos pacientes com ES	55
5.6	Avaliação dos níveis séricos dos marcadores vasculares	56

5.7	Correlação dos marcadores vasculares na pele correspondentes no soro	57
5.8	Correlação dos marcadores vasculares na pele e soro dos pacientes com ES.....	58
5.9	Correlação entre os achados histológicos com o escore de comprometimento cutâneo (mRSS)	59
6.	DISCUSSÃO	61
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
8.	CONCLUSÃO	77
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Esclerose sistêmica

A esclerose sistêmica (ES) é uma doença autoimune multissistêmica, caracterizada por uma tríade patológica envolvendo: vasculopatia, desregulação imunológica e fibrose da pele e órgãos internos. (HO et al., 2014). A ES acomete majoritariamente o sexo feminino (4 mulheres:1 homem), com idade entre 30 e 45 anos, tendo prevalência de 150-300 casos por milhão de habitantes (RANQUE E MOUTHON, 2010). Clinicamente a ES é subcategorizada em dois tipos, de acordo com a extensão do acometimento cutâneo: esclerose limitada e difusa. A ES limitada é caracterizada por um espessamento da pele nas mãos, dedos e face, enquanto a difusa tem um envolvimento mais generalizado. A etiologia da doença não é totalmente elucidada, mas acredita-se que seja desencadeada em indivíduos predispostos geneticamente pela associação de fatores ambientais. (ALLANORE *et al.*, 2015).

O escore de pele modificado de Rodnan (mRSS) é a técnica utilizada para avaliação clínica do grau de comprometimento cutâneo, através da palpação. Divide-se o corpo em 17 áreas anatômicas e um escore de 0 a 3 é dado para cada área, dependendo da espessura da pele (0 = normal, 1 = espessamento leve, 2 = espessamento moderado e 3 = espessamento intenso). (Kumánovics et al., 2017). Um estudo de coorte recente mostrou que a fibrose progressiva da pele acometida nos pacientes com ES difusa está associada com a piora da função pulmonar e da sobrevida. (Wu et al., 2019).

A mortalidade da doença deve-se principalmente às complicações por disfunções dos órgãos internos. Um estudo de coorte retrospectivo avaliou pacientes acompanhados pelo Grupo Europeu de Ensaios Clínicos e Investigação em Esclerodermia (EUSTAR) a fim de determinar causas e preditores de morte na ES. Dentre os óbitos de pacientes, 55% foram causas diretamente relacionadas à doença, tais como: fibrose pulmonar, hipertensão arterial pulmonar e comprometimento cardíaco. (TYNDALL *et al.*, 2010).

O acometimento visceral inclui o comprometimento gastrointestinal, podendo levar a formas graves com atrofia da musculatura lisa e fibrose da mucosa do tubo gastrointestinal, provocando alterações na motilidade e danos funcionais. Os pacientes podem apresentar disfagia, má absorção dos alimentos, desnutrição e refluxo gastro-esofágico. O acometimento cardíaco pode-se manifestar com derrame pericárdico, inflamação e anormalidades na condução e/ou fibrose miocárdica. O envolvimento pulmonar pode levar a hipertensão arterial pulmonar e pneumopatia intersticial, os maiores responsáveis pela mortalidade da doença. Os

rins também podem ser afetados pelo processo patológico da doença e levar a crise renal esclerodérmica nos pacientes. (DENTON *et al.*, 2006; DENTON e KHANNA, 2017).

A presença de autoanticorpos é comum em pacientes com ES, permitindo sua classificação como doença autoimune. Anticorpos anti-nucleares (ANAs) estão presentes em aproximadamente 90% dos pacientes (KATSUMOTO *et al.*, 2011). As três principais subclasses de autoanticorpos específicos na ES são: anticorpos anti-centrômero, anticorpos anti-topoisomerase 1 (anti-Scl-70) e anticorpos anti-RNA polimerase III (MEYER *et al.*, 2007).

1.2 Anormalidades imunológicas

A etiologia da ES não é totalmente elucidada, mas sugere-se que a combinação de fatores genéticos e influência ambiental leva à ativação do sistema imunológico, que resulta nos danos iniciais da doença. (DENTON e KHANNA, 2017). A presença de autoanticorpos no soro dos pacientes, antes mesmos da aparição dos primeiros sintomas, revela importante papel da ativação imunológica na etiopatogênese da doença. (ASANO, 2018).

Os mecanismos que levam à quebra de tolerância imunológica e que se incluem na patogênese da esclerose sistêmica permanecem desconhecidos. Porém, alterações na resposta imune inata e adaptativa são descritas com importante função na fisiopatologia inicial da doença. (CUTOLO *et al.*, 2019). Infiltrados inflamatórios perivasculares são vistos precocemente na doença, indicando uma inflamação crônica e persistente, traduzida clinicamente pelo edema dos dedos (LANG *et al.*, 2013). Prescott *et al.* (1992) demonstraram infiltrados de células mononucleares na pele precedendo qualquer evidência histológica de fibrose cutânea.

Na ES há um aumento de monócitos/macrófagos no sangue periférico e na pele, comparado a indivíduos saudáveis. (DOWSON *et al.*, 2017). Macrófagos com fenótipo M2 foram detectados entre as fibras de colágeno de amostras de pele dos pacientes com ES. (HIGASHI-KUWATA *et al.*, 2009). Sabe-se que estas células liberam importantes mediadores pró-fibróticos, como fator de crescimento transformador (TGF)- β , que contribuem para a fibrose tecidual. (LESCOAT *et al.*, 2019).

Evidências sugerem que as células T são importantes na patogênese da ES e compõem predominantemente os infiltrados inflamatórios da pele (SAKKAS *et al.*, 2002); (LANG *et al.*, 2013). A resposta imune de perfil Th2 possui relevância na patogênese da ES, produzindo citocinas como interleucina (IL)-4, IL- 5, IL-13, IL-10, TGF β , que estimulam a fibrose nos pacientes. (CHIZZOLI *et al.*, 2011); (HUANG *et al.*, 2015); (WYNN *et al.*, 2008). Aoudjehane *et al.*, (2008) mostraram que IL-4 induz a ativação e produção de colágeno de culturas de

fibroblastos humanos, aumentando a expressão de mRNA colágeno tipo I, III e IV. Além disso, também induz a produção de TGF- β e aumenta a expressão de molécula de adesão celular vascular (VCAM-1), contribuindo para o infiltrado mononuclear. Portanto, a IL-4 promove a proliferação de fibroblastos e produção de componentes da matriz extracelular (ECMs), sendo um importante indutor de fibrose, enquanto IL-13 induz síntese de TGF- β em macrófagos (KATSUMOTO; WHITFIELD; CONNOLLY, 2011). Células T CD8⁺ citotóxicas da pele de pacientes esclerodérmicos sintetizam e expressam altos níveis de IL-13 (FUSCHIOTTI, 2018).

A assinatura elevada de IFN-1 em algumas células imunes circulantes ou presentes no infiltrado tecidual, como monócitos e pDCs, é outra característica que evidencia a desregulação da imunidade na ES (ALLANORE et al., 2015). O aumento da expressão de genes regulados por IFN I reflete a ativação e sinalização por Toll-like receptors (TLRs). Sugere-se que a ativação de TLRs aconteça por ligantes endógenos, e.g. ácidos nucleicos, ou por padrões moleculares associados aos danos (DAMPs), como variações nos componentes da matriz extracelular gerados pela injúria tecidual (YORK et al., 2007); (ASSASSI et al., 2010); (PARK et al., 2018).

Embora citocinas do perfil Th2 sejam mais presentes na ES, a IL-6 tem recebido especial interesse por sua participação na doença. Produzida por linfócitos B e T, fibroblastos, fibrócitos e células endoteliais, esta citocina é encontrada em altos níveis nos pacientes com ES, e se associa à gravidade do acometimento cutâneo (KHAN et al., 2012). Células T reguladoras (Treg) compõem outro subtipo celular desregulado em pacientes esclerodérmicos. Há, na doença, diminuição do potencial supressor destas células, com deficiência na produção de IL-10 (ANTIGA et al., 2010); (BARAUT et al., 2013); (FENOGLIO et al., 2011); (PAPP et al., 2011).

Células B autorreativas mostram papel relevante na patogenia da ES com a produção de autoanticorpos. Em mais de 90% dos pacientes, detectam-se anticorpos antinucleares (ANAs), tais como: anticorpos anti-DNA-topoisomerase 1 (anti-Scl70), anticentrômeros, anti-fibroblastos, anti-células endoteliais, anti-receptores do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), entre outros. (SAKKAS, 2006); (MIHAI e TERVAERT, 2010).

1.3 Disfunções vasculares

Os primeiros danos evidenciados na doença são injúria e apoptose das células endoteliais. Embora os mecanismos exatos que levam a essa disfunção ainda não sejam elucidados, a presença de autoanticorpos anti-células endoteliais (AECA), injúria por isquemia e reperfusão, apoptose induzida por infecção e citotoxicidade mediada por células dependente

de anticorpos (ADCC) estão envolvidos com o dano endotelial. (CORALLO et al., 2015); (MOSTMANS et al., 2017); (SCHNIERING et al., 2019).

Diante deste cenário, diversas funções fisiológicas se alteram no endotélio de pacientes com ES, levando a um quadro de vasculopatia difusa. (MATUCCI-CERINIC et al., 2013). Sob condições normais, o endotélio desempenha diversas funções metabólicas: regulação do tônus vascular, adesão leucocitária, crescimento de células musculares lisas vasculares, agregação plaquetária, entre outras, além de funcionar como barreira física e interface entre o sistema sanguíneo e os tecidos. Diante desses efeitos pleiotrópicos, disfunções endoteliais podem gerar graves doenças. (CIPRIANI et al., 2011).

As alterações fisiológicas das células endoteliais são os eventos centrais responsáveis pela microvasculopatia. Em um estado quiescente, as células endoteliais produzem, espontaneamente, fatores vasoconstritores e vasodilatadores, garantindo a homeostase dos vasos. (BRUNI et al., 2018). Em pacientes com ES, há uma desregulação do tônus vascular pelo aumento de fatores vasoconstritores como a endotelina-1, um importante mitógeno de células musculares lisas vasculares e fibroblastos, levando a um remodelamento vascular. (TROJANOWSKA, 2010); (NICOLSI et al., 2016).

Concomitantemente, as células endoteliais têm uma diminuição na produção de óxido nítrico (NO) e sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS), que são importantes vasodilatadores. Portanto, o endotélio dos pacientes sofre uma alteração de perfil protetivo vasodilatador para vasoconstritor, contribuindo para o estabelecimento de hipóxia e eventos isquêmicos. (KAHALEH, 2008); (MATUCCI-CERINIC et al., 2013).

As plaquetas podem ser ativadas diante da injúria endotelial e, consequentemente, liberam moléculas bioativas contidas em seus grânulos, como TGF β , importante mediador pró-fibrótico envolvido no processo de transdiferenciação endotélio-mesenquimal. (NTELIS et al., 2017); (NICOLSI et al., 2016). A ativação plaquetária já foi descrita na ES, tendo um papel importante na disfunção endotelial (KAHALEH, 1982). Além disso, revelou-se uma forte correlação entre as contagens plaquetárias médias e marcadores de inflamação e disfunção endotelial nos pacientes com ES. (IBRAHIM et al., 2018).

Com a ativação endotelial, há também um aumento da expressão de moléculas de adesão, como: proteína de adesão celular vascular (VCAM1), molécula de adesão intracelular (ICAM), E-selectina e quimiocinas, principalmente CCL2, resultando no recrutamento de células inflamatórias. (ALLANORE et al., 2015).

Alguns estudos têm mostrando a participação do estresse oxidativo na patogênese da disfunção vascular e da fibrose na ES. Os fatores pro-oxidantes são radicais livres que possuem

um ou mais elétrons, de oxigênio ou nitrogênio, desemparelhado na sua camada de valência. Esses elétrons tendem a se ligar a outras moléculas, assim formando espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN). EROs podem induzir a proliferação e ativação de fibroblastos, aumentar a síntese de colágeno tipo 1 e promover uma disfunção endotelial. (VONA et al., 2018). Os resultados destes estudos mostram que pacientes ES apresentam altos níveis de biomarcadores de estresse oxidativo no sangue circulante, como malonaldeído (MDA) e hidroperóxidos lipídicos. (RICCIERI et al., 2008); (LUO et al., 2017).

Neste contexto de dano vascular, espera-se que o próprio organismo ative mecanismos de reparo. Fisiologicamente, a angiogênese e vasculogênese são os processos que promoveriam efeito compensatório. Entretanto, nos pacientes com ES, estes mecanismos são falhos, impossibilitando uma reversão do dano. (KUWANA et al., 2004); (RABQUER e KOCH, 2012); (MANETTI et al., 2010). A angiogênese é o processo de formação de novos capilares a partir de outros pré-existentes, pela formação de brotos e ramificações (CARMELIET, 2005). Fatores de crescimento ativam a angiogênese, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que induz a proliferação e migração das células endoteliais, levando a formação de novos vasos e sua estabilização. (FERRARA et al, 2003). Os pacientes com ES apresentam uma superprodução de VEGF, levando a uma formação caótica da arquitetura do vaso. (DISTLER et al., 2006); (SHENAVANDEH., 2017). Um outro sistema importante na indução da angiogênese está desequilibrado (sistema angiopoietina/ e receptor Tie) favorecendo um perfil de desestabilização dos vasos. (MICHALSKA-JAKUBU et al., 2010). Já a vasculogênese, é a formação de novos vasos a partir de células progenitoras endoteliais (EPCs), que nos pacientes com ES aparentam estar em número diminuído e com função comprometida. (DEL PAPA e PIGNATARO, 2018).

Morfologicamente, a disfunção endotelial na ES se apresenta com progressiva redução da densidade capilar, associada a formação de uma arquitetura desorganizada e irregular dos capilares, decorrente de uma angiogênese superativada. Uma consequente remodelação vascular se estabelece, com ativação e proliferação de células mesenquimais perivasculares, levando ao aumento da produção de matriz extracelular, que pode levar a uma hiperplasia da íntima, estreitamento luminal e possível oclusão dos vasos. Todo esse quadro patológico desencadeia um estado de isquemia crônica. (SCHNIERING, MAURER e DISTLER, 2019); (DENTON, BLACK e ABRAHAM, 2006).

A avaliação clínica não-invasiva da morfologia microvascular é feita pelo exame de capilaroscopia ungueal, que permite a visualização da integridade dos vasos.(CUTOLO, SULLI, e SMITH, 2010a). Há 3 padrões de classificação: precoce, com presença de capilares

gigantes sem área avascular; ativo, com perda de capilares com área avascular, capilares gigantes e hemorragia; tardio: capilares ramificados mostrando o processo de angiogênese com áreas avasculares. (SMITH et al., 2013).

As manifestações clínicas das alterações microvasculares são apresentadas nos pacientes pelo fenômeno de Raynaud, processo de vasoespasmos devido aos processos isquêmicos resultantes da desregulação da vasoconstrição e vasodilatação, identificado visualmente por mudanças na coloração das digitais. (LAMBOVA e KUZMANOVA, 2005). Os pacientes também podem apresentar telangiectasias, que são pequenas proliferações de vasos que se tornam visíveis na pele, resultantes de uma tentativa exacerbada de reparo da perda capilar pelo processo de angiogênese. O aparecimento de úlceras digitais é outra manifestação clínica frequente associada a isquemia, podendo evoluir para necrose tecidual. (WIGLEY, 2009). (HUGHES e HERRICK, 2017).

Portanto, o cenário de dano endotelial resulta em duas consequências: Com a injúria e apoptose das células endoteliais não reparadas pelos mecanismos de angiogênese e vasculogênese, há um remodelamento vascular com formação caótica dos vasos. Por outro lado, com a intensa ativação do endotélio e o recrutamento de infiltrado inflamatório, ativação e transdiferenciação de células mesenquimais e perda da homeostase endotelial, um quadro de hipóxia tecidual é apresentado com alterações na arquitetura vascular, resultando em um processo crônico de fibrose tecidual.

Figura 1. Dano vascular na esclerose sistêmica

Fatores ambientais e genéticos estão envolvidos na patogênese da ES. As alterações no ambiente endotelial levam a ativação do sistema imunológico, gerando um quadro inflamatório local. O ambiente endotelial alterado gera disfunções vasculares caracterizado por dano e apoptose das células endoteliais, não reparado por mecanismos compensatórios de angiogênese e vasculogênese. Dessa forma, há um remodelamento vascular pela proliferação intimal e obliteração dos vasos. As disfunções vasculares também se caracterizam por ativação das células endoteliais, com redução da produção de Óxido nítrico (NO), formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e aumento da expressão de moléculas de adesão. Todas essas alterações geram hipóxia tecidual, resultando em fibrose. **FONTE: figura elaborada pela própria autora. (2020)**

1.4 Fibrose tecidual

A fibrose na ES é uma resposta desregulada à tentativa de reparo tecidual frente a injúria vascular e inflamação que levam à liberação de fatores pró-inflamatórios e fibróticos. Em consequência, fibroblastos e outras células mesenquimais são estimuladas a produzirem excessivamente produtos e moléculas da matriz extracelular (ECM, do inglês *extracellular matrix*), como colágeno, elastina, glicosaminoglicanos e fibronectina. (Ho et al., 2014). Este processo crônico de cicatrização tecidual resulta em alterações da arquitetura do órgão, consequentemente desencadeando disfunções e doença. (Cutolo et al., 2019).

Em condições normais, os fibroblastos mantêm a composição da ECM liberando componentes estruturais, como colágeno e fibronectina, e regulando a degradação de ECM pela secreção de proteases (Lang et al., 2013). Pacientes com ES apresentam aumento da síntese de colágeno e de matriz extracelular, impulsionados pela ativação de fibroblastos (T. A. Wynn, 2007). O achado patológico característico da ES é a fibrose generalizada, envolvendo a pele e múltiplos órgãos internos, contribuindo em grande parte para a morbidade e mortalidade associadas à doença. Alguns autores consideram a fibrose como um componente letal da ES (Manetti e Beyer, 2013), (Ho et al., 2014).

Quando ativados, os fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos α -SMA+ à medida que migram ao longo da rede de fibrina para a lesão, promovendo a cicatrização. (Ho et al., 2014). Os miofibroblastos são células especializadas e funcionalmente ativas, com propriedades contráteis, resistência à apoptose, produção de TGF- β , secreção e deposição de grandes quantidades de ECM. (Hinz et al., 2012). Sua ativação também pode acontecer pelo recrutamento de fibrócitos e pelo processo de transição endotelial-mesenquimal (EndoMT). Nesta condição, as células endoteliais (ECs) alteram sua morfologia para fusiforme, modificam a expressão molecular de marcadores como CD31 e VE-caderina, e passam a expressar um fenótipo de miofibroblasto, caracterizado pela presença de α -SMA, principal marcador destas células. (Hu & Phan, 2013); (Piera-Velazquez *et al.*, 2016).

A descoberta da plasticidade parcial das ECs levantou a hipótese de que o processo de transdiferenciação contribua para a disfunção endotelial e fibrose dérmica na ES (Nicolosi et al., 2016). Esta possibilidade foi demonstrada em um estudo de Manetti *et al.* (2017) com amostras de pele de pacientes com ES imunocoradas para CD31, VE-caderina e α -SMA. As células endoteliais vasculares dérmicas (dMVECs) provenientes de pacientes com ES co-expressavam todos os três marcadores, ao contrário daquelas provenientes do controle saudável, que não expressavam o fenótipo mesenquimal α -SMA. Além disso, as dMVECs

saudáveis, quando tratadas com soro de pacientes com ES, adquiriam uma morfologia do tipo miofibroblasto, com fenótipo contrátil.

1.5 Transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas no tratamento da esclerose sistêmica

A complexa fisiopatologia da ES, sua etiologia desconhecida, a heterogeneidade clínica da doença e o grave acometimento de órgãos internos fazem com que a ES seja uma das doenças autoimunes mais desafiadoras para o manejo clínico. Terapias convencionais com drogas imunossupressoras e imunomoduladores, tais como ciclofosfamida, micofenolato de mofetil e metotrexato, e mais recentemente tocilizumab, nintedanib e fresolimumab, entre outros, promovem o controle da doença em parte dos pacientes, porém seus efeitos são modestos e de curta duração (HOST et al., 2017); (DEL PAPA et al., 2017). A taxa de mortalidade para pacientes com as formas mais graves da doença, em que há acometimento cutâneo e/ou envolvimento visceral difuso, varia de 30 a 50% em 5 anos em repostas à imunossupressão convencional. (OLIVEIRA et al., 2013).

Uma meta análise mostrou que a mortalidade da ES não mudou nos últimos 40 anos (1960-2010), sendo o envolvimento cardiopulmonar a principal causa da morte. (ELHAI *et al.*, 2012). Neste contexto, o Transplante Autólogo de Células-Tronco Hematopoéticas (TACTH) tem sido utilizado como uma alternativa terapêutica para os pacientes que são refratários a terapias convencionais. A racionalidade do TACTH para tratar doenças autoimunes (DAI) envolve a ablação da autorreatividade, renovação imunológica e restabelecimento da tolerância aos autoantígenos. (FARGE et al., 2010); (BURT et al., 2011); (ARRUDA et al., 2016).

As DAI são atribuídas a fatores genéticos, ambientais e perda dos mecanismos de tolerância imunológica. Neste contexto, o timo possui um importante papel na prevenção da autoimunidade através da eliminação de células T autorreativas e desenvolvimento de células T reguladoras naturais CD4+ FOXP3+. (nTREGs). O timo passa por um processo de involução com o passar da idade, com mudanças morfológicas e fisiológicas que podem acarretar disfunções nos mecanismos de tolerância, diminuição na saída de células T naíves e reguladoras, aumentando o risco de desenvolver DAI. (CHENG E ANDERSON, 2018); (PASSOS et al., 2019); (THEOFILOPOULOS *et al.*, 2017).

Entretanto, se o timo remanescente em adultos está inativo, como o TACTH consegue promover a renovação imunológica e o restabelecimento da tolerância? Nosso grupo e outros demonstraram que o timo sofre uma reativação, visto pelo aumento funcional e volumétrico que sucede ao transplante. (MURARO et al., 2005); (ARRUDA et al., 2018). A reativação pode

ser constatada após o transplante pela coexpressão de CD45RA/CD31 por células T naíves e pela presença dos anéis de material genético excisados (do inglês, *T-cell receptor excision circles, TRECs*), presentes nos linfócitos recém-exportados pelo timo, como um marcador do processo de maturação tímica que não se transmite às células-filhas (MURARO et al., 2005); (ARRUDA et al., 2018). Tanto os percentuais, quanto os números absolutos de emigrantes tímicos recentes (ETR) e de TRECs aumentaram em 12 meses comparados ao período pré TACTH. Em 1 ano pós transplante também foi visto um significativo aumento da diversidade de TCR, pela avaliação da região determinante de complementariedade 3 (CDR3), demonstrando a geração de um sistema imunológico diverso e mais próximo da normalidade. Este estudo também mostrou que os números absolutos de nTREGs aumentam significativamente aos 12 meses pós TACTH, período no qual é marcada a reativação tímica. (ARRUDA et al., 2019); (MALMEGRIM e LIMA-JÚNIOR, 2018).

O procedimento clínico do TACTH acontece em quatro etapas principais: mobilização de células-tronco hematopoéticas (HSC), coleta de HSC, condicionamento imunoablativo e re-infusão das HSC (MURARO et al., 2017). A mobilização é o período em que as HSC da medula óssea são estimuladas a proliferar e depois direcionadas para o sangue periférico através de baixas doses de ciclofosfamida associada com fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF). Cerca de 7 ou 8 dias após a administração dessas drogas, as HSC são coletadas por aférese, a partir do sangue periférico (VAN LAAR, NARAGHI e TYNDALL, 2015); (SWART et al., 2017).

Após um breve período de descanso de uma a duas semanas, administra-se o regime de condicionamento, usado para erradicar a memória imunológica autorreativa de pacientes (SWART et al., 2017). Para a maioria das doenças autoimunes, a imunoablação é realizada principalmente com a administração de globulina anti-timocítica de coelho e ciclofosfamida em altas doses (SNOWDEN et al., 2012). Alguns centros de transplante incluem irradiação total corporal a esse esquema e outros, combinações diferentes de quimioterápicos. A eliminação do repertório autoimune por altas doses de imunossupressor leva a uma depleção não específica do compartimento das células imunes. (ARRUDA et al., 2016). Após o período de condicionamento, as CTHs são reinfundidas no paciente.

Figura 2. Etapas do procedimento do TACTH

O procedimento começa com a mobilização de CTHs da medula óssea para o sangue periférico através da administração de baixas doses de ciclofosfamida e G-CSF. (2) As CTHs são então colhidas, com ou sem manipulação ex vivo (seleção de CD34 + HSCs), e (3) criopreservadas. (4) Antes do transplante, o sistema imunológico é depletado pela alta dose de imunossupressão (regime de condicionamento), seguido pela (5) reinfusão de CTHs autólogas. Abreviações: Transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas (TACTH); Células-tronco hematopoiéticas (CTHs); fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF). Modificado de LIMA-JUNIOR e colaboradores, Thymus Rejuvenation After Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Patients with Autoimmune Diseases. Capítulo para o Livro: Thymus Transcriptome and Cell Biology (2018).

Burt *et al.* (2003) demonstraram, em um estudo clínico, que pacientes com ES tratados com TACTH obtiveram uma melhora significativa da elasticidade da pele e diminuição de sua espessura. Em 2010, um estudo observacional publicado por Farge *et al.*, (2010) relatou 900 casos de TACTH de pacientes com doenças autoimunes do registro Europeu de transplante de medula óssea (do inglês, *EBMT*) sendo 175 pacientes com ES. Em toda a população, a sobrevida global em cinco anos foi 85% e a sobrevida livre de progressão foi de 43%. Na ES, especificamente, a mortalidade relacionada ao transplante, aos 100 dias, foi de 6%. Os dados deste estudo demonstram o TACTH como uma possibilidade terapêutica válida para tratar doenças autoimunes.

Mais recentemente, três estudos randomizados, que compararam pacientes com ES transplantados com pacientes tratados com medicações convencionais mostraram que o TACTH promove maior sobrevida, maior controle da doença e melhor qualidade de vida a longo prazo (BURT *et al.*, 2011); (VAN LAAR *et al.*, 2014); (SULLIVAN *et al.*, 2018). Esses estudos foram importantes para convencer a comunidade científica da superioridade do

transplante. O TACTH também promove a “correção” de assinaturas moleculares associadas à doença, enquanto mudanças similares não foram observadas em pacientes tratados apenas com ciclofosfamida. (ASSASSI *et al.*, 2019).

O transplante para ES mostra eficácia quanto a melhora da espessura da pele, com diminuição da fibrose avaliada pelo score modificado de Rodnan (mRSS). O estudo de Daikeler e colaboradores, (2015) avaliou 13 pacientes submetidos ao TACTH e a média do mRSS diminuiu de 24 para 10, dados que se correlacionaram com a diminuição da fibrose, avaliada histologicamente.

Outro trabalho demonstrou uma significativa regressão da fibrose da pele sustentada aos 4 anos pós-transplante. Houve diminuição do mRSS, juntamente com diminuição dos níveis de IL-2, TGF β e PDGF aos 6 meses pós TACTH. A proteína quimioatraente de monócitos (MCP)-1 diminuiu subsequentemente ao transplante, com redução significativa aos 48 meses. (MICHEL *et al.*, 2016). Todas as citocinas alteradas após o transplante já foram anteriormente relacionadas à atividade da doença. (HASEGAWA *et al.*, 2011); (BIERNACKA, DOBACZEWSKI e FRANGOIANNIS, 2011).

Recentemente, o nosso grupo de pesquisa publicou um estudo de coorte de 27 pacientes com ES transplantados. Aos 6 e 12 meses após o procedimento, houve redução do espessamento da pele avaliado pelo mRSS, melhora da capacidade física avaliada pelo aumento da mobilidade e força de preensão das mãos, da capacidade funcional dos membros superiores, da abertura da boca e da distância caminhada em seis minutos. Os pacientes também apresentaram melhora na qualidade de vida, tanto física, quanto mental. (COSTA-PEREIRA *et al.*, 2019). A doença leva a limitações de mobilidade e redução da qualidade de vida, estes dados inéditos brasileiros corroboram a eficácia terapêutica do TACTH.

Alguns estudos demonstram melhora parcial da vasculopatia após o TACTH. Miniati *et al.*, (2009) demonstraram essa melhora por videocapilaroscopia em pacientes com ES tratados com TACTH. Os resultados foram uma redução significativa da perda vascular e uma transição entre um padrão capilaroscópico *tardio*, para *ativo*, com presença de capilares gigantes e ramificados, sugerindo fenômeno de neoangiogênese. O transplante foi benéfico em bloquear a deterioração dos microvasos e parcialmente capaz de restaurar a microarquitetura do vaso.

Outro estudo mostrou que o TACTH promove alterações a nível molecular. Fleming e colaboradores (2008) demonstraram que biópsias de pele de pacientes esclerodérmicos, quando comparadas às de indivíduos saudáveis, perdem marcadores endoteliais normais como VE-caderina em algumas populações de vasos, apresentam infiltrados CD123+ na derme e expressão positiva para ACTA2, mRNA de IFN α e RGS5. Além disso os pacientes

apresentavam diminuição do número de capilares. Quando submetidos ao TACTH, houve redução significativa de infiltrados CD123+, da expressão de mRNA *IFN α* e *RGS5*. O aumento do número de capilares se correlacionou com o aumento de VE-caderina e diminuição de IFN α . Em contrapartida, o estudo de Daikeler e colaboradores (2015) não apresentou mudanças de marcadores endoteliais em biópsias de pele como: CD31, VE-caderina e vWF após o tratamento com o TACTH, bem como na densidade dos capilares.

O mecanismo de ação do TACTH sobre os aspectos da fibrose e, principalmente, sobre o compartimento endotelial na ES tem sido pouco investigado. Os estudos existentes sugerem uma melhora da fibrose, avaliada principalmente pela redução do mRSS, e uma melhora parcial do quadro de vasculopatia.

Justificativa e hipótese do estudo

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

As terapias convencionais para ES com drogas imunossupressoras ou imunomoduladores se mostram pouco eficazes na remissão da doença, principalmente em pacientes com rápida progressão do acometimento da pele e órgãos internos. (MALMEGRIM e LIMA-JUNIOR, 2018). O tratamento para ES é dificultado por se tratar de uma doença sistêmica, com acometimento de múltiplos órgãos e causa desconhecida.

O TACTH vem demonstrando eficácia para o tratamento da ES, pela depleção da autorreatividade, renovação imunológica e restabelecimento da tolerância. (ARRUDA et al., 2018). Estudos clínicos vêm demonstrando que esta abordagem terapêutica pode induzir um longo período de remissão da doença, sem uso adicional de imunossupressores, além de mostrar mais eficácia e segurança no procedimento. (BURT et al., 2011); (DEL PAPA et al., 2017). Porém, os mecanismos de ação do transplante ainda não estão completamente elucidados, por isso a importância de estudos que avaliem seu impacto na fisiopatologia da doença e sua ação terapêutica.

Atualmente no Brasil, o programa de transplante para doença autoimune do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP), coordenado inicialmente pelo Prof. Dr. Júlio C. Voltarelli, e atualmente pela Profa. Dra. Maria Carolina Oliveira, é o único centro de pesquisa que realiza o TACTH para esclerose sistêmica no país, sendo assim, referência nacional no tratamento da doença.

Portanto, temos o acesso a materiais biológicos nobres dos pacientes brasileiros com esclerose sistêmica submetidos ao TACTH. Este estudo, irá contribuir com a elucidação de alguns mecanismos terapêuticos na fisiopatologia da doença, além de contribuir para os futuros protocolos clínicos.

A avaliação clínica do transplante mostra melhora importante da fibrose, com redução da espessura da pele e melhora parcial da vasculopatia (melhora do padrão de capilaroscopia, mas persistência do Raynaud e úlceras de polpa digital). A nossa hipótese é a de que marcadores endoteliais e relacionados a fibrose se alterem após o transplante, refletindo uma melhora da vasculopatia e fibrose.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão de marcadores de integridade, dano e ativação endotelial e aspectos da fibrose na pele de pacientes com esclerose sistêmica submetidos ao TACTH e correlaciona-los com dados clínicos.

3.2 Objetivos específicos

1. Quantificar a fibrose em biópsias de pele de pacientes com ES transplantados.
2. Avaliar marcadores endoteliais no soro e biópsias de pele de pacientes com ES transplantados.
3. Recuperar dados clínicos a partir de prontuários médicos de pacientes com ES transplantados e descrever sua evolução.
4. Correlacionar dados histológicos de marcadores endoteliais com dados sorológicos desses marcadores.
5. Correlacionar os achados histológicos de endotélio e fibrose com a gravidade da doença.

Casuística, pacientes e métodos

4. CASUÍSTICA, PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

O estudo é retrospectivo e longitudinal, aprovado pelo comitê de ética da instituição (CAAE: 71204717.6.0000.5440), no qual os pacientes com esclerose sistêmica submetidos ao TACTH assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Foram incluídos neste estudo dados clínicos resgatados de prontuários médicos e amostras de biópsias de pele e soro previamente coletados, entre 2011 a 2016. As coletas foram realizadas no período pré TACTH (N=35) e aos 180 (N=19) e 360 (N=21) dias após o procedimento. Este trabalho foi desenvolvido no Centro de Terapia Celular (CEPID-FAPESP) do Centro Regional de Hemoterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP) em colaboração com a Unidade de Transplante de Medula Óssea (TMO) e o Serviço de Patologia (SERPAT) do HC-FMRP-USP.

Figura 3: Delineamento experimental

Dados clínicos e amostras biológicas foram retrospectivamente coletados. Realizada análises morfométricas, imuno-histoquímica, clínicas, capilaroscópicas e sorológicas antes e após o TACTH. **FONTE: elaborado pela própria autora. (2020)**

4.2 Pacientes do estudo e Procedimento do TACTH

Este estudo incluiu 35 pacientes transplantados. São critérios de indicação para o transplante: diagnóstico de esclerose sistêmica segundo os critérios ACR/ EULAR (VAN DEN HOOGEN et al., 2013) e evidência de progressão de doença nos últimos 6 meses, mesmo em tratamento com imunossuppressores convencionais: piora do envolvimento cutâneo (aumento no score de Rodnan em mais que 25%) e/ou pulmonar através da redução de capacidade vital forçada (CVF) e/ou difusão de monóxido de carbono (DLCO) maior que 10%. Pacientes com acometimento cutâneo isolado (sem envolvimento visceral) podem receber indicação para TACTH, desde que apresentem forma difusa da doença, com escore de Rodnan mínimo de 16.

4.3 Biópsias de pele

As amostras de pele foram obtidas cirurgicamente a partir de biópsias realizadas no terço médio da região ventral do antebraço dos pacientes, através de incisão por ferramenta cortante “punch”, mediante anestesia local. As biópsias subsequentes foram realizadas em áreas adjacentes às primeiras, no mesmo braço. As biópsias de pele foram coletadas em três diferentes períodos: pré transplante e pós transplante (180 e/ou 360 dias). Logo após as coletas, o material foi previamente fixado em formalina tamponada a 10% e incluso em blocos de parafina, devidamente identificado com nome, data e período do transplante. O estudo incluiu um total de 75 biópsias de pele.

4.4 Dados clínicos

Os dados clínicos abaixo listados foram coletados nos prontuários dos pacientes. Esses dados são registrados rotineiramente pela equipe clínica que acompanha o paciente transplantado e encontram-se disponíveis para uso em pesquisa, mediante aprovação em comitê de ética.

- Forma da doença: difusa ou limitada
- Tempo entre o diagnóstico e transplante
- Órgãos acometidos: pele, esôfago e pulmões.
- Resultados de avaliações funcionais: prova de função pulmonar e manometria de esôfago.
- Presença ou ausência de autoanticorpos

- Escore de Rodnan modificado (quantificação clínica de fibrose)
- Capilaroscopia periungueal (avaliação morfológica da microcirculação)

O comprometimento de órgãos foi avaliado quanto ao acometimento dos pulmões, esôfago e pele. A avaliação da função pulmonar incluiu medidas de Capacidade Vital Forçada (CVF), em que se mede o volume forçado de ar expelido pelos pulmões após uma inspiração profunda máxima, e pela capacidade de difusão pulmonar de monóxido de carbono (DLCO), em que se mede a capacidade dos pulmões em transferir o monóxido de carbono do ar inspirado até os glóbulos vermelhos presentes nos capilares pulmonares. O envolvimento esofágico foi avaliado por manometria, um exame médico para medir os movimentos e capacidade da contração muscular do esôfago. Os dados de capilaroscopia periungueal consiste de uma observação microscópica dos capilares da região periungueal, com documentação digital das imagens. Os dados permitem uma avaliação clínica, não-invasiva, da vasculopatia, que se soma aos achados histológicos. A avaliação clínica do grau de comprometimento cutâneo é feita pelo escore de pele modificado de Rodnan (mRSS), através da palpação. Divide-se o corpo em 17 áreas anatômicas e um escore de 0 a 3 é dado para cada área, dependendo da espessura da pele (0 = normal, 1 = espessamento leve, 2 = espessamento moderado e 3 = espessamento intenso

Figura 4: Escore de pele modificado de Rodnan (mRSS)

O mRSS avalia a espessura da pele em 17 partes anatômicas, com escore entre 0 a 3, com pontuação máxima de 51 pontos. FONTE: Disponível em: <<http://reumatorj.com.br/>> Acesso em: 15 de março de 2020.

4.5 Imunohistoquímica

Porções da pele incluídas em parafina foram cortadas no micrótomo (LEICA RM2245) em secções de 4 µm de espessura e depositadas em lâminas de vidro previamente tratadas (STARFROST®) para realização das reações de imunohistoquímica. O material foi mantido em estufa (60°C) *overnight* para adesão deste à lâmina. Em seguida, o material foi submetido a desparafinização em xilol por duas vezes de 10 minutos e em sequência submetido à desidratação em gradiente de álcool (95%, 90%, 80% e 70%) por três minutos. A recuperação antigênica foi realizada através da fervura dos cortes, em tampão citrato 0,1M pH 6.0, por 40 minutos na panela à vapor (90°C). Após recuperação, as lâminas foram deixadas em temperatura ambiente por 20 minutos e em sequência foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (Hydrogen Peroxidase Block, DHP-125, *Spring Bioscience*, USA). Posteriormente, as lâminas foram lavadas em TBST (*TRIS-Buffered Saline 0.05 with Tween 20*) por três vezes. Para bloqueio das ligações inespecíficas o material foi incubado com *Protein Block* (DPB-125, *Spring Bioscience*, USA). Em seguida foi realizada a incubação com o anticorpo primário *anti-human* diluídos em BSA 0,1% (albumina de soro bovino), para os seguintes marcadores (tabela abaixo) em câmara úmida por 1 hora.

Tabela 1: Anticorpos utilizados na imuno-histoquímica

Anticorpo	Marca	Clone	Diluição
Anti- Angiopoetina-1	ABCAM/UK	ab102015	1:100
Anti- Angiopoetina-2	ABCAM/UK	ab153934	1:100
Anti-TIE-2	ABCAM/UK	ab24859	1:100
Anti-Ve-caderina	Novus Biologicals/USA	NB600-1409	1:50
Anti-VEGFA	ABNOVA/USA	MAB0294	1:100
Anti-VEGFR2	Novus Biologicals/USA	NBP-36428	1:100
Anti- E-selectina	Novus Biologicals/USA	NB100-65601	1:100
Anti-CD31	ABCAM/UK	ab2836	1:100
Anti-Endotelina	ABNOVA/USA	PAB31178	1:200

Após a incubação com anticorpo primário, feita a lavagem com TBST e adição de *REVEAL Complement* (DCMT-15, *Spring Bioscience*, USA) - anticorpo secundário - por 10 minutos. Em seguida o material foi incubado por 15 minutos em *HRP Conjugate* (*Horseradish peroxidase*, DHRR-125, *Spring Bioscience*, USA). A reação foi revelada com crômogênio NOVARED™ (VECTOR®, SK-4800, USA). As lâminas foram contracoradas com Hematoxilina de Harris durante 40 segundos e lavadas em água destiladaa. Os cortes foram então hidratados em gradientes crescentes de álcool e diafinizados em xilol, e montados em meio permanente para observação ao microscópio

4.6 Coloração com Picrosirius red

Porções da pele incluídas em parafina foram cortadas no micrótomo (LEICA RM2245) em secções de 5 µm e depositadas em lâminas para realização das reações de coloração *Sirius Red*, que permite a visualização histológica das fibras de colágeno I e III no tecido. O material foi mantido em estufa (60°C) *overnight* para adesão deste à lâmina. Em seguida, o material foi submetido a desparafinização em xilol por duas vezes de 10 minutos e em sequência à desidratação em gradiente de álcool (95%, 90%, 80% e 70%) por três minutos. Após a desparafinização e desidratação, os cortes foram incubados com a solução do *PicroSirius Red Stain Kit* (ABCAM®, ab150681) por 1 hora. Em seguida, realizaram-se lavagens com água destilada e ácido acético (0.5%) por duas vezes. Ao final, os cortes foram hidratados em gradientes crescentes de álcool e diafinizados em xilol.

4.7 Coloração com Hematoxilina e Eosina

Porções da pele incluídas em parafina foram cortadas no micrótomo (LEICA RM2245) em secções de 5 µm e depositadas em lâminas para realização das reações de coloração com Hematoxilina e Eosina. O material foi mantido em estufa (60°C) *overnight* para adesão deste à lâmina. Em seguida, o material foi submetido a desparafinização em xilol por duas vezes de 10 minutos e em sequência submetido à desidratação em gradiente de álcool (95%, 90%, 80% e 70%) por três minutos e lavado em água corrente. Em seguida, os cortes foram incubados com Hematoxilina por 1 minuto e lavados novamente em água corrente. Adicionou-se amoníaco na água para obter coloração azulada e incubou-se com Eosina de 1 a 2 minutos. Ao final, os cortes foram hidratados em gradientes crescentes de álcool e diafinizados em xilol. Para a montagem da lâmina, usou-se *Permout/USA*.

4.8 Análise das imagens histológicas

Para a análise quantitativa dos resultados obtidos, utilizou-se a ferramenta de software Image J (National Institutes of Health, EUA), com o pacote de plug-ins desenvolvido pela Universidade McMaster (<http://www.macbiophotonics.ca/imagej>, Ontario, Canadá). O programa possui um modelo estatístico desenvolvido para detecção da coloração positiva em imagens de tecidos corados por DAB. Shu e colaboradores (2013) demonstraram que o modelo estatístico construído é baseado em histogramas que quantificam os pixels exibidos nas imagens reveladas e contracoradas.

4.9 Dosagem de marcadores vasculares no soro

A dosagem dos marcadores vasculares (e-selectina, VEGFA e endotelina) foi feita utilizando a técnica de multiplex (Magnetic Luminex Assay, R&D System Inc., Minnesota, EUA). Inicialmente, as proteínas de cada curva foram reconstituídas em 250 μL de calibrator diluent RD6-52 e incubadas por 15 minutos sob agitação leve. Após a incubação, foram adicionados 100 μL de cada curva padrão e 100 μL de calibrator diluent RD6-52 (volume final de 1000 μL), estabelecendo o ponto inicial da curva, a partir do qual foi realizada a diluição seriada (1:3). As micropartículas de captura foram diluídas em diluent RD2-1 (500 μL de micropartícula e 5000 μL de diluente), os anticorpos biotinilados também foram diluídos em diluent RD2-1 (500 μL de anticorpos e 5000 μL de diluente) e a estreptavidina-PE em wash buffer (220 μL de estreptavidina e 5035 μL de tampão). As amostras foram diluídas 2 vezes em calibrator diluent RD6-52 (30 μL de amostra e 30 μL de tampão). Em seguida, em uma placa de 96 poços, foram pipetados 50 μL das micropartículas, 50 μL da curva padrão ou 50 μL de cada amostra e a placa foi incubada por 2 horas à 850 rpm, temperatura ambiente e protegida da luz. Após a incubação, a placa foi colocada em um magneto (permitindo que as micropartículas magnéticas ficassem presas) para a realização de 3 lavagens com 100 μL de wash buffer. A placa foi retirada do magneto, 50 μL de anticorpos biotinilados foram adicionados em cada poço e novamente a placa foi incubada por 1 hora à 850 rpm, temperatura ambiente e protegida da luz. A placa foi lavada 3 vezes com 100 μL de wash buffer, 50 μL de estreptavidina-PE foram adicionados em cada poço e a placa foi incubada por 30 minutos à 850 rpm, temperatura ambiente e protegida da luz. Por fim, a placa foi lavada 3 vezes com 100 μL

de wash buffer, 100 μ L wash buffer foram adicionados em cada poço, a placa foi incubada por 2 minutos à 850 rpm e colocada no aparelho (Bio-Plex 200) para a leitura.

4.10 Análise estatística

As variáveis encontram-se descritas como média e desvio-padrão e mediana e variabilidade. Todos os conjuntos de dados foram testados para distribuição gaussiana ou não-gaussiana antes da escolha do teste estatístico. Para comparação dos resultados clínicos e histológicos foram utilizados os testes paramétricos, *One-way* ANOVA e t de *Student*, e não-paramétricos, Wilcoxon e Kruskal-Wallis. As correlações foram calculadas pelo teste de Friedman. A análise estatística foi realizada com o programa GraphPad Prism, versão 8.2 (GraphPad Software, San Diego, EUA).

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação clínica dos pacientes com ES antes e pós TACTH

Dados clínicos dos pacientes incluídos neste estudo foram coletados dos prontuários clínicos registrados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP/USP) nos períodos PRÉ, D180+, D360+ pós TACTH. Os dados estão detalhados na **tabela 1**.

A idade média e desvio padrão ($\pm$ SD) dos pacientes presentes neste estudo foi de 36 ($\pm$ 9,4) anos. O tempo médio entre o diagnóstico e a realização do transplante foi de 3,2 ($\pm$ 3,1) anos, sendo 80% dos pacientes do sexo feminino.

Tabela 2: Características clínico-demográficas dos pacientes com esclerose sistêmica

Pacientes	Sexo/Idade	Tempo entre Dx e Tx	Data do transplante
1	F/41	6	03/2013
2	F/44	1	01/2015
3	F/54	5	02/2016
4	F/32	0,5	04/2016
5	F/36	5	01/2013
6	M/44	2	12/2011
7	F/59	7	07/2013
8	F/41	2	12/2014
9	F/28	1	03/2013
10	F/30	2	11/2014
11	F/40	1	06/2013
12	F/39	2,5	01/2016
13	M/29	0,5	06/2012
14	F/29	1	05/2014
15	F/27	2	09/2015
16	F/53	7,5	11/2015
17	M/27	2	11/2011
18	F/43	2	09/2015
19	F/30	4	06/2012
20	F/35	2	09/2014
21	F/50	1,2	10/2015
22	F/16	2	09/2016
23	F/29	5,5	04/2013

24	F/45	5	01/2016
25	M/45	1	06/2012
26	F/29	1,5	07/2015
27	M/45	2	07/2012
28	F/33	0,5	10/2014
29	F/49	14	08/2014
30	F/28	11	03/2012
31	F/28	1	08/2014
32	F/29	3,5	01/2015
33	F/28	7	08/2016
34	M/24	3	11/2015
35	M/21	2	10/2012
<hr/>			
Média (DP)	36 (9,4)	3,2 (3,1)	

No grupo de pacientes avaliados, a função pulmonar não se alterou após o tratamento com o TACTH.

Figura 5: Avaliação da função pulmonar dos pacientes com ES tratados com TACTH

A) Capacidade vital forçada (CVF). B) Difusão de monóxido de carbono (DLCO), ajustada para níveis de hemoglobina. Os dados estão mostrados como média e desvio-padrão ($\pm$ SD). Os grupos foram comparados de forma não-pareada, através do teste paramétrico *one-way* ANOVA. PRÉ: período pré-transplante; D+: corresponde ao período pós-transplante, em dias.

Os pacientes obtiveram melhora clínica da pele apresentando redução significativa do mRSS, nos períodos 180 e 360 dias após o transplante.

Figura 6: Avaliação clínica do comprometimento cutâneo pelo escore modificado de Rodnan (mRSS).

Os dados estão mostrados como média e desvio-padrão ($\pm$ SD). Os grupos foram comparados de forma não-pareada, através do teste paramétrico *one-way* ANOVA, com múltiplas comparações pelo teste de *Turkey's*. PRÉ: período pré-transplante; D+: corresponde ao período pós-transplante, em dias. * $p < 0.05$ **** $p < 0.0001$.

As titulações de autoanticorpos para o fator antinúcleo (FAN) e anticorpos anti-DNA topoisomerase I (anti-Scl70) séricos também foram coletados a partir dos prontuários clínicos dos pacientes. 94% dos pacientes apresentavam presença de FAN no período pré transplante. Os títulos de anti-Scl70 não se alteraram nos diferentes períodos analisados

Figura 7: Titulação de anti-DNA topoisomerase I (anti-Scl70) em pacientes com ES antes e após TACTH.

Os dados estão mostrados como média e desvio-padrão ($\pm$ SD). Os grupos foram comparados de forma não-pareada, através do teste paramétrico *one-way* ANOVA. PRÉ: período pré-transplante; D+: corresponde ao período pós-transplante, em dias.

Os dados de capilaroscopia periungueal foram coletados de um subgrupo de dez pacientes presentes neste estudo

Figura 8: Alterações estruturais da microcirculação periférica quantificadas pelo exame de Capilaroscopia Periungueal em pacientes com ES tratados com TACTH.

A) Número de deleções de capilares representando áreas avasculares. B) Número de alças de novos capilares. C) Número de enovelados representando a desorganização dos capilares. D) Número de megacapilares representando o alargamento capilar. E) Área caracterizada por hemorragia dos capilares. E) Número de capilares ectasiados representando o alargamento capilar. A comparação entre os diferentes grupos pareados se deu pelos testes: paramétrico; *one-way* ANOVA com múltiplas comparações por *Turkey's test* e não paramétrico; Friedman com múltiplas comparações por *Dunn's test*. Os dados estão mostrados como média e ($\pm$ SD). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

5.2 Avaliação histológica da fibrose em biópsias de pele de pacientes com ES submetidos ao tratamento do TACTH

A Espessura da pele (μ m) avaliada por coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) apresentou redução principalmente observada aos 360 dias após o transplante.

Figura 9: Espessura da pele (μm) por coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) em biópsias de pele de pacientes com ES antes e pós-TACTH

A) Mediana da análise pareada entre o período pré-transplante (PRÉ) vs período pós-transplante. Para o período pós-transplante, considerou-se a amostra de pele colhida no D+180 ou D+360. Quando um mesmo paciente apresentava amostras em ambos os períodos (D+180 e D+360), calculou-se o valor médio. B) Mediana da análise não-pareada entre os períodos PRÉ vs D+180 vs D+360. *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. Para análise pareada entre períodos pré e pós-transplante, utilizou-se o teste t de *Student* (paramétrico). Para comparações entre os três grupos, não-pareados, utilizou-se o teste *one-way* ANOVA (paramétrico).

Figura 10: Histologia da espessura da pele em biópsias de pele de pacientes com ES antes e pós-TACTH

Imagem representativa da espessura da pele por coloração HE em amostra de pele de um paciente (A) antes do transplante e (B) 180 dias após o transplante.

Observamos uma diminuição da densidade de colágeno nos períodos pós transplante utilizando a técnica histoquímica *picrosirius red stain* capaz de seletivamente destacar as redes de colágeno, tipos I e III.

Figura 11: Densidade de colágeno por coloração *picrosirius red* em biópsias de pele de pacientes com ES antes e pós-TACTH

A) Mediana da análise pareada entre o período pré-transplante (PRÉ) vs período pós-transplante. Para o período pós-transplante, considerou-se a amostra de pele colhida no D+180 ou D+360. Quando um mesmo paciente apresentava amostras em ambos os períodos (D+180 e D+360), calculou-se o valor médio. B) Mediana da análise não-pareada entre os períodos PRÉ vs D+180 vs D+360. * $p < 0,05$. Para análise pareada entre períodos pré e pós-transplante, utilizou-se o teste t de *Student* (paramétrico). Para comparações entre os três grupos, não-pareados, utilizou-se o teste *one-way ANOVA* (paramétrico).

Figura 12: Histologia da coloração de fibras de colágeno em biópsias de pele de pacientes com ES antes e pós-TACTH

Imagem representativa da densidade de colágeno por coloração *picrosirius* red em amostra de pele de um paciente (A) antes do transplante e (B) 180 dias após o transplante.

5.3 Avaliação histológica do endotélio em biópsias de pele de pacientes com ES submetidos ao tratamento do TACTH

Os resultados a seguir avaliam marcadores endoteliais que podem refletir alterações vasculares na doença. A molécula de adesão celular endotelial plaquetária (PECAM-1) também conhecida como *cluster* de diferenciação CD31, é encontrada nas junções intercelulares, possuindo importante função no tráfico de leucócitos e permeabilidade vascular. (CERRUTI e RIDLEY, 2017). Observamos que não houve mudanças de expressão desta molécula após o TACTH.

Figura 13: Expressão de CD31 em biópsias de pele de pacientes com ES por imunohistoquímica antes e pós TACTH

A) Mediana da análise pareada entre o período pré-transplante (PRÉ) vs período pós-transplante. Para o período pós-transplante, considerou-se a amostra de pele colhida no D+180 ou D+360. Quando um mesmo paciente apresentava amostras em ambos os períodos (D+180 e D+360), calculou-se o valor médio. B) Mediana da análise não-pareada entre os períodos PRÉ vs D+180 vs D+360. Para análises pareadas entre períodos pré e pós-transplante, utilizou-se o teste de Wilcoxon (não-paramétrico). Para comparações entre os três grupos, não-pareados, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis (não-paramétrico).

Figura 14: Histologia da expressão de CD31 em biópsias de pele de pacientes com ES antes e pós TACTH

Imagem representativa da expressão de CD31 por imunohistoquímica em amostra de pele de um paciente (A) antes do transplante e (B) 180 dias após o transplante.

Outra importante molécula de adesão é a VE-caderina, localizada entre as junções das células endoteliais. Estritamente endotelial, esta molécula também possui importante função no controle da permeabilidade vascular e extravasamento leucocitário. (LAMPUGNANI *et al.*,

2018). O Tratamento com o transplante não alterou a expressão de VE-caderina nos períodos analisados.

Figura 15: Expressão de VE-caderina em biópsias de pele de pacientes com ES por imunohistoquímica antes e pós-TACTH

A) Mediana da análise pareada entre o período pré-transplante (PRÉ) vs período pós-transplante. Para o período pós-transplante, considerou-se a amostra de pele colhida no D+180 ou D+360. Quando um mesmo paciente apresentava amostras em ambos os períodos (D+180 e D+360), calculou-se o valor médio. B) Mediana da análise não-pareada entre os períodos PRÉ vs D+180 vs D+360. Para análises pareadas entre períodos pré e pós-transplante, utilizou-se o teste de Wilcoxon (não-paramétrico). Para comparações entre os três grupos, não-pareados, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis (não-paramétrico).

Figura 16: Histologia da expressão de VE-caderina em biópsias de pele de pacientes com ES antes e pós TACTH

A Imagem representativa da expressão de VE-caderina por imunohistoquímica em amostra de pele de um paciente (A) antes do transplante e (B) 180 dias após o transplante.

As selectinas medeiam o “*rolling*” leucocitário ao longo do endotélio e participam do processo inicial do trânsito dos leucócitos para os sítios inflamatórios. (SILVA et al., 2018). Observamos uma redução significativa da expressão deste marcador de ativação endotelial aos 180 e 360 dias após o transplante, quando comparada com o período pré-TACTH

Figura 17: Expressão de E-selectina em biópsias de pele de pacientes com ES por imunohistoquímica antes e pós-TACTH

A) Mediana da análise pareada entre o período pré-transplante (PRÉ) vs período pós-transplante. Para o período pós-transplante, considerou-se a amostra de pele colhida no D+180 ou D+360. Quando um mesmo paciente apresentava amostras em ambos os períodos (D+180 e D+360), calculou-se o valor médio. $^{**}p < 0.001$; $^{***}p < 0.0001$. B) Mediana da análise não-pareada entre os períodos PRÉ vs D+180 vs D+360. Para análises pareadas entre períodos pré e pós-transplante, utilizou-se o teste de Wilcoxon (não-paramétrico). Para comparações entre os três grupos, não-pareados, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis (não-paramétrico).

Figura 18: Histologia da expressão de E-selectina em biópsias de pele de pacientes com ES antes e pós TACTH

Imagem representativa da expressão de e-selectina por imunohistoquímica em amostra de pele de um paciente (A) antes do transplante e (B) 360 dias após o transplante.

O fator de crescimento endotelial vascular é um regulador chave de crescimento de vasos sanguíneos, portanto importante fator na angiogênese. (FERRARA et al., 2003). A expressão de VEGFA e VEGFR2 não se alterou após o TACTH.

Figura 19: Expressão de VEGFA em biópsias de pele de pacientes com ES por imunohistoquímica antes e pós TACTH

A) Mediana da análise pareada entre o período pré-transplante (PRÉ) vs período pós-transplante. Para o período pós-transplante, considerou-se a amostra de pele colhida no D+180 ou D+360. Quando um mesmo paciente apresentava amostras em ambos os períodos (D+180 e D+360), calculou-se o valor médio. B) Mediana da análise não-pareada entre os períodos PRÉ vs D+180 vs D+360. Para análises pareadas entre períodos pré e pós-transplante, utilizou-se o teste de Wilcoxon (não-paramétrico). Para comparações entre os três grupos, não-pareados, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis (não-paramétrico).

Figura 20: Histologia da expressão de VEGFA em biópsias de pele de pacientes com ES antes e pós TACTH

Imagem representativa da expressão de VEGFA por imunohistoquímica em amostra de pele de um paciente (A) antes do transplante e (B) 360 dias após o transplante.

Figura 21: Expressão de VEGFR2 em biópsias de pele de pacientes com ES por imunohistoquímica antes e pós TACTH

A) Mediana da análise pareada entre o período pré-transplante (PRÉ) vs período pós-transplante. Para o período pós-transplante, considerou-se a amostra de pele colhida no D+180 ou D+360. Quando um mesmo paciente apresentava amostras em ambos os períodos (D+180 e D+360), calculou-se o valor médio. B) Mediana da análise não-pareada entre os períodos PRÉ vs D+180 vs D+360. Para análises pareadas entre períodos pré e pós-transplante, utilizou-se o teste de Wilcoxon (não-paramétrico). Para comparações entre os três grupos, não-pareados, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis (não-paramétrico).

Figura 22: Histologia da expressão de VEGFR2 em biópsias de pele de pacientes com ES antes e pós TACTH

Imagem representativa da expressão de VEGFR2 por imunohistoquímica em amostra de pele de um paciente (A) antes do transplante e (B) 180 dias após o transplante.

A expressão de endotelina não se alterou após o TATCH.

Figura 23: Expressão de Endotelina em biópsias de pele de pacientes com ES por imunohistoquímica antes e pós TATCH

A) Mediana da análise pareada entre o período pré-transplante (PRÉ) vs período pós-transplante. Para o período pós-transplante, considerou-se a amostra de pele colhida no D+180 ou D+360. Quando um mesmo paciente apresentava amostras em ambos os períodos (D+180 e D+360), calculou-se o valor médio. B) Mediana da análise não-pareada entre os períodos PRÉ vs D+180 vs D+360. Para análises pareadas entre períodos pré e pós-transplante, utilizaram-se os testes de Wilcoxon (não-paramétrico) e t de *Student* (paramétrico). Para análises pareadas entre períodos pré e pós-transplante, utilizou-se o teste de Wilcoxon (não-paramétrico). Para comparações entre os três grupos, não-pareados, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis (não-paramétrico).

Figura 24: Histologia da expressão de Endotelina em biópsias de pele de pacientes com ES antes e pós TATCH

Imagem representativa da expressão de endotelina por imunohistoquímica em amostra de pele de um paciente (A) antes do transplante e (B) 180 dias após o transplante.

Os resultados abaixo mostram a expressão do sistema angiopoietina e receptor. ANG1 reduziu aos 180 e 360 dias pós transplante, enquanto ANG2 e TIE2 não se alteraram.

Figura 25: Expressão de ANG1 em biópsias de pele de pacientes com ES por imunohistoquímica antes e pós TACTH

A) Mediana da análise pareada entre o período pré-transplante (PRÉ) vs período pós-transplante. Para o período pós-transplante, considerou-se a amostra de pele colhida no D+180 ou D+360. Quando um mesmo paciente apresentava amostras em ambos os períodos (D+180 e D+360), calculou-se o valor médio. B) Mediana da análise não-pareada entre os períodos PRÉ vs D+180 vs D+360. Para análises pareadas entre períodos pré e pós-transplante, utilizaram-se os testes de Wilcoxon (não-paramétrico) e t de *Student* (paramétrico). Para análises pareadas entre períodos pré e pós-transplante, utilizou-se o teste de Wilcoxon (não-paramétrico). Para comparações entre os três grupos, não-pareados, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis (não-paramétrico).

Figura 26: Histologia da expressão de ANG1 em biópsias de pele de pacientes com ES antes e pós TACTH

Imagem representativa da expressão de ANG1 por imunohistoquímica em amostra de pele de um paciente (A) antes do transplante e (B) 180 dias após o transplante.

Figura 27: Expressão de ANG2 em biópsias de pele de pacientes com ES por imunohistoquímica antes e pós TACTH

A) Mediana da análise pareada entre o período pré-transplante (PRÉ) vs período pós-transplante. Para o período pós-transplante, considerou-se a amostra de pele colhida no D+180 ou D+360. Quando um mesmo paciente apresentava amostras em ambos os períodos (D+180 e D+360), calculou-se o valor médio. B) Mediana da análise não-pareada entre os períodos PRÉ vs D+180 vs D+360. Para análises pareadas entre períodos pré e pós-transplante, utilizaram-se os testes de Wilcoxon (não-paramétrico) e t de *Student* (paramétrico). Para análises pareadas entre períodos pré e pós-transplante, utilizou-se o teste de Wilcoxon (não-paramétrico). Para comparações entre os três grupos, não-pareados, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis (não-paramétrico).

Figura 28: Histologia da expressão de ANG2 em biópsias de pele de pacientes com ES antes e pós TACTH

Imagem representativa da expressão de ANG2 por imunohistoquímica em amostra de pele de um paciente (A) antes do transplante e (B) 180 dias após o transplante.

Figura 29: Expressão de TIE2 em biópsias de pele de pacientes com ES por imunohistoquímica antes e pós TACTH

A) Mediana da análise pareada entre o período pré-transplante (PRÉ) vs período pós-transplante. Para o período pós-transplante, considerou-se a amostra de pele colhida no D+180 ou D+360. Quando um mesmo paciente apresentava amostras em ambos os períodos (D+180 e D+360), calculou-se o valor médio. B) Mediana da análise não-pareada entre os períodos PRÉ vs D+180 vs D+360. Para análises pareadas entre períodos pré e pós-transplante, utilizaram-se os testes de Wilcoxon (não-paramétrico) e t de *Student* (paramétrico). Para análises pareadas entre períodos pré e pós-transplante, utilizou-se o teste de Wilcoxon (não-paramétrico). Para comparações entre os três grupos, não-pareados, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis (não-paramétrico).

Figura 30: Histologia da expressão de TIE2 em biópsias de pele de pacientes com ES antes e pós TACTH

Imagem representativa da expressão de TIE2 por imunohistoquímica em amostra de pele de um paciente (A) antes do transplante e (B) 180 dias após o transplante.

5.4 Expressão dos marcadores histológicos pelo escore de comprometimento cutâneo (escore de Rodnan)

O valor mínimo e máximo do escore de Rodnan dos pacientes neste estudo foi de 8 e 36 respectivamente, com a mediana igual a 25. Para determinar se os marcadores histológicos se associavam com a gravidade do envolvimento cutâneo, dividimos os pacientes em dois grupos, delimitados pela mediana do escore de Rodnan no período pré-TACTH. Formaram-se os seguintes grupos: escore de Rodnan ≤ 25 (n=14) e >25 (n=15).

Assim, estudamos a dinâmica de expressão dos marcadores ao longo do período de tratamento nos dois grupos de pacientes: com maior ou menor envolvimento cutâneo, comparando-os. Entre todos os marcadores estudados, somente a molécula de ativação endotelial E-selectina mostrou-se mais expressa no grupo de pacientes com escore de Rodnan >25 . Os demais marcadores não se distinguiram entre os grupos.

Figura 31: Avaliação da espessura da pele por coloração com Hematoxilina-Eosina (HE) nos grupos de pacientes com escore de Rodnan $>$ ou ≤ 25

A) Média e desvio padrão da espessura medida por coloração com HE no grupo de pacientes com escore de Rodnan ≤ 25 , nos períodos PRÉ vs D+180 vs D+360 pós-transplante. B) Média e desvio padrão da espessura medida por coloração com HE no grupo de pacientes com escore de Rodnan >25 , nos períodos PRÉ vs D+180 vs D+360 pós-transplante. C) Valores da área sob a curva (AUC) entre os dois grupos de pacientes (escore de Rodnan >25 ou ≤ 25). Para representação da AUC calculou-se a área total do pico (*total peak area*) média de cada grupo. Para comparar os resultados utilizou-se o teste *t* não pareado (paramétrico)

Figura 32: Avaliação da densidade de colágeno por coloração com picrosirius red nos grupos de pacientes com escore de Rodnan $\geq$ ou $\leq$ 25

A) Média e desvio padrão da densidade do tecido corado com picrosirius red no grupo de pacientes com escore de Rodnan $\leq$ 25, nos períodos PRÉ vs D+180 vs D+360 pós transplante. B) Média e desvio padrão da densidade do tecido corado com picrosirius red no grupo de pacientes com escore de Rodnan $>$ 25, nos períodos PRÉ vs D+180 vs D+360 pós transplante. C) Valores de área sob a curva (AUC) entre os dois grupos de pacientes (escore de Rodnan $>$ 25 ou $\leq$ 25). Para representação da AUC calculou-se a área total do pico (*total peak area*) média de cada grupo. Para comparar resultados utilizou-se o teste *t* não pareado (paramétrico).

Figura 33: Avaliação da expressão de CD31 nos grupos de pacientes com escore de Rodnan $>$ ou ≤ 25 .

A) Média e desvio padrão de áreas marcadas com anti-CD31 no grupo de pacientes com escore de Rodnan ≤ 25 , nos períodos PRÉ vs D+180 vs D+360 pós transplante. B) Média e desvio padrão de áreas marcadas com anti-CD31 no grupo de pacientes com escore de Rodnan > 25 , nos períodos PRÉ vs D+180 vs D+360 pós-transplante. C) Valores da área sob a curva (AUC) entre os dois grupos de pacientes (escore de Rodnan > 25 ou ≤ 25). Para representação da AUC calculou-se a área total do pico (*total peak area*) média de cada grupo. Para comparar resultados utilizou-se o teste *t* não pareado (paramétrico).

Figura 34: Avaliação da expressão de VE-caderina nos grupos de pacientes com escore de Rodnan $>$ ou ≤ 25 .

A) Média e desvio padrão de áreas marcadas com anti-VE-caderina no grupo de pacientes com escore de Rodnan ≤ 25 , nos períodos PRÉ vs D+180 vs D+360 pós-transplante. B) Média e desvio padrão de áreas marcadas com anti-VE-caderina no grupo de pacientes com escore de Rodnan > 25 , nos períodos PRÉ vs D+180 vs D+360 pós transplante. C) Valores da área sob a curva (AUC) entre os dois grupos de pacientes (escore de Rodnan > 25 ou ≤ 25). Para representação da AUC calculou-se a área total do pico (*total peak area*) média de cada grupo. Para comparar resultados utilizou-se o teste *t* não pareado (paramétrico).

Figura 35: Avaliação da expressão de E-selectina nos grupos de pacientes com escore de Rodnan $>$ ou ≤ 25 .

A) Média e desvio padrão de áreas marcadas com anti-E-selectina no grupo de pacientes com escore de Rodnan ≤ 25 , nos períodos PRÉ vs D+180 vs D+360 pós-transplante. B) Média e desvio padrão de áreas marcadas com anti-E-selectina no grupo de pacientes com escore de Rodnan > 25 , nos períodos PRÉ vs D+180 vs D+360 pós transplante. C) Valores da área sob a curva (AUC) entre os dois grupos de pacientes (escore de Rodnan > 25 ou ≤ 25). Para representação da AUC calculou-se a área total do pico (*total peak area*) média de cada grupo. Para comparar resultados utilizou-se o teste *t* não pareado (paramétrico). * $p < 0,05$.

Figura 36: Avaliação da expressão de VEGFA nos grupos de pacientes com escore de Rodnan $>$ ou ≤ 25 .

A) Média e desvio padrão de áreas marcadas por anti-VEGFA no grupo de pacientes com escore de Rodnan $\leq$ a 25, nos períodos PRÉ vs D+180 vs D+360 pós-transplante. B) Média e desvio padrão de áreas marcadas por anti-VEGFA no grupo de pacientes com escore de Rodnan > 25 , nos períodos PRÉ vs D+180 vs D+360 pós-transplante. C) Valores da área sob a curva (AUC) entre os dois grupos de pacientes (escore de Rodnan > 25 ou ≤ 25). Para representação da AUC calculou-se a área total do pico (*total peak area*) média de cada grupo. Para comparar resultados utilizou-se o teste *t* não pareado (paramétrico).

Figura 37: Avaliação da expressão de VEGFR2 nos grupos de pacientes com escore de Rodnan $>$ ou ≤ 25 .

. A) Média e desvio padrão de áreas marcadas por anti-VEGFR2 no grupo de pacientes com escore de Rodnan ≤ 25 , nos períodos PRÉ vs D+180 vs D+360 pós-transplante. B) Média e desvio padrão de áreas marcadas por anti-VEGFR2 no grupo de pacientes com escore de Rodnan > 25 , nos períodos PRÉ vs D+180 vs D+360 pós-transplante. C) Valores da área sob a curva (AUC) entre os dois grupos de pacientes (escore de Rodnan > 25 ou ≤ 25). Para representação da AUC calculou-se a área total do pico (*total peak area*) média de cada grupo. Para comparar resultados utilizou-se o teste *t* não pareado (paramétrico).

Figura 38: Avaliação da expressão de endotelina nos grupos de pacientes com escore de Rodnan $\geq$ ou $\leq$ 25.

A) Média e desvio padrão de áreas marcadas por anti-Endotelina no grupo de pacientes com escore de Rodnan $\leq$ a 25, nos períodos PRÉ vs D+180 vs D+360 pós-transplante. B) Média e desvio padrão de áreas marcadas por anti-Endotelina no grupo de pacientes com escore de Rodnan $>$ 25, nos períodos PRÉ vs D+180 vs D+360 pós-transplante. C) Valores da área sob a curva (AUC) entre os dois grupos de pacientes (escore de Rodnan $>$ 25 ou $\leq$ 25). Para representação da AUC calculou-se a área total do pico (*total peak area*) média de cada grupo. Para comparar resultados utilizou-se o teste *t* não pareado (paramétrico).

Figura 39: Avaliação da expressão de ANG1 nos grupos de pacientes com escore de Rodnan $\geq$ ou $\leq$ 25.

A) Média e desvio padrão de áreas marcadas por anti-ANG1 no grupo de pacientes com escore de Rodnan $\leq$ 25, nos períodos PRÉ vs D+180 vs D+360 pós-transplante. B) Média e desvio padrão de áreas marcadas por anti-ANG1 no grupo de pacientes com escore de Rodnan $>$ 25, nos períodos PRÉ vs D+180 vs D+360 pós-transplante. C) Valores da área sob a curva (AUC) entre os dois grupos de pacientes (escore de Rodnan $>$ 25 ou $\leq$ 25). Para representação da AUC calculou-se a área total do pico (*total peak area*) média de cada grupo. Para comparar resultados utilizou-se o teste *t* não pareado (paramétrico).

Figura 40: Avaliação da expressão de ANG2 nos grupos de pacientes com escore de Rodnan $>$ ou ≤ 25 .

A) Média e desvio padrão de áreas marcadas por anti-ANG2 no grupo de pacientes com escore de Rodnan ≤ 25 , nos períodos PRÉ vs D+180 vs D+360 pós-transplante. B) Média e desvio padrão de áreas marcadas por anti-ANG2 no grupo de pacientes com escore de Rodnan > 25 , nos períodos PRÉ vs D+180 vs D+360 pós-transplante. C) Valores da área sob a curva (AUC) entre os dois grupos de pacientes (escore de Rodnan > 25 ou ≤ 25). Para representação da AUC calculou-se a área total do pico (*total peak area*) média de cada grupo. Para comparar resultados utilizou-se o teste *t* não pareado (paramétrico).

Figura 41: Avaliação da expressão de TIE2 nos grupos de pacientes com escore de Rodnan $>$ ou ≤ 25 .

A) Média e desvio padrão de áreas marcadas por anti-TIE2 no grupo de pacientes com escore de Rodnan $\leq$ a 25, nos períodos PRÉ vs D+180 vs D+360 pós-transplante. B) Média e desvio padrão de áreas marcadas por anti-TIE2 no grupo de pacientes com escore de Rodnan > 25 , nos períodos PRÉ vs D+180 vs D+360 pós-transplante. C) Valores da área sob a curva (AUC) entre os dois grupos de pacientes (escore de Rodnan > 25 ou ≤ 25). Para representação da AUC calculou-se a área total do pico (*total peak area*) média de cada grupo. Para comparar resultados utilizou-se o teste *t* não pareado (paramétrico).

5.5 Correlação dos marcadores vasculares na pele dos pacientes com ES

Além de avaliarmos a dinâmica de expressão dos marcadores vasculares na pele dos pacientes ao longo dos períodos pós transplante, avaliamos como esses marcadores se correlacionavam entre si. Apenas ANG2 teve correlações significativas, com endotelina e e-selectina analisadas conjuntamente nos períodos PRE, D180+ e D360+.

Figura 42: Correlação da ANG2 com endotelina e e-selectina na pele dos pacientes com ES

Correlação da expressão dos marcadores vasculares na pele de pacientes com ES em todos os períodos do TACTH. (A) ANG2 x endotelina (n=30), (B) ANG2 x e-selectina (n=30). Para as correlações utilizou-se o teste não-paramétrico de *Spearman*.

5.6 Avaliação dos níveis séricos dos marcadores vasculares

Os níveis séricos de e-selectina, endotelina e VEGFA avaliados por multiplex, encontravam-se disponíveis de 15 pacientes incluídos neste estudo. Os marcadores avaliados no soro não se alteram pós transplante.

Figura 43: Níveis séricos dos marcadores vasculares em pacientes com ES

Mediana da análise não pareada dos níveis séricos de marcadores vasculares em pacientes com ES antes, 180 e 360 dias após o TACTH. (A) e-selectina, (B) endotelina e (C) VEGFA (n=15). foram avaliados por multiplex. Para comparação dos três grupos, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis (não-paramétrico).

5.7 Correlação dos marcadores vasculares na pele correspondentes no soro

Investigamos se os níveis séricos de VEGFA, e-selectina e endotelina se correlacionavam com suas expressões na pele, em 15 pacientes que possuíam ambos os dados. Apenas VEGFA teve correlação em seus níveis séricos e na pele.

Figura 44: Correlação de VEGFA, e-selectina e endotelina na pele e soro de pacientes com ES

Correlação dos níveis séricos e expressão na pele dos marcadores vasculares em pacientes com ES ao longo dos períodos do TACTH. (A) e-selectina (n=15), (B) endotelina (n=15) e (C) VEGFA (n=15). Para as correlações utilizou-se o teste não-paramétrico de *Spearman*.

5.8 Correlação dos marcadores vasculares na pele e soro dos pacientes com ES

Figura 45: Matrizes de correlação de marcadores vasculares no soro e pele de pacientes com ES

A) Matriz de correlação em todos os períodos do transplante (PRÉ, D+180 e D+360). B) Matriz de correlação do período PRÉ-transplante. C) Matriz de correlação do período D+180 pós-transplante. D) Matriz de correlação do período D+360 pós-transplante. Para as correlações utilizou-se o teste não-paramétrico de *Spearman*.

Discussão

6. DISCUSSÃO

O TACTH tem demonstrado ser uma terapia promissora para esclerose sistêmica, com bons resultados clínicos para os pacientes, possibilitando remissões clínicas prolongadas, livres de tratamentos adicionais (BURT e FARGE, 2018). Estudos mostram que o TACTH promove maior sobrevida, maior controle da doença e melhor qualidade de vida a longo prazo. (BURT et al., 2011); (VAN LAAR et al., 2014) e (SULLIVAN et al., 2018). Porém, os mecanismos de ação do transplante que levam à remissão da doença não estão completamente estabelecidos e, por isso, estudos que avaliem o impacto do TACTH na fisiopatologia da doença são importantes.

Diversos estudos revelaram os mecanismos de reconstituição imunológica desses pacientes após o tratamento, a fim de investigar o alcance do TACTH no *resetting* e na reconstituição imunológica de pacientes com doenças autoimunes. (VOLTARELLI et al., 2005); (MURARO et al., 2017); (FARGE et al., 2017); (DEL PAPA et al., 2018); (MALMEGRIM et al., 2020). Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa vem demonstrando a atuação do transplante sobre a tríade patológica da esclerose sistêmica: anormalidades imunológicas, vasculares e fibrose. (ARRUDA et al., 2016, 2018, 2019); (MALMEGRIM e LIMA-JUNIOR, 2018). O transplante promove a ontogênese de um novo sistema imunológico, pela recuperação tímica e medular com a geração de um repertório imunológico auto tolerante. O presente trabalho visa contribuir para o conjunto de evidências, investigando o impacto do TACTH nos aspectos da fibrose e no compartimento endotelial na doença.

Estudos randomizados mostram que o efeito terapêutico do transplante é superior aos tratamentos convencionais. (BURT et al., 2011); (VAN LAAR et al., 2014); (DEL PAPA et al., 2017); (BURT e FARGE, 2018). No presente estudo, os pacientes também apresentaram resposta clínica, com melhora do envolvimento cutâneo e estabilização do quadro pulmonar. Entretanto, os títulos de anti-Sc170 não se alteraram nos diferentes períodos analisados, embora nosso grupo já tenha demonstrado redução em outra coorte de pacientes. (MALMEGRIM et al., 2017).

Todos os pacientes incluídos neste estudo possuíam ES cutânea difusa, quando o acometimento fibrótico da pele afeta áreas proximais, como o tronco e, muitas vezes, toda a extensão do corpo. Este subtipo da doença está relacionado a um pior prognóstico, progressão mais rápida e menor qualidade de vida, quando comparado à ES cutânea limitada. (MAURER et al., 2015); (SKAUG et al., 2019); (FRANTZ et al., 2020).

Uma associação entre a gravidade do comprometimento cutâneo com o envolvimento

visceral foi mostrada em pacientes com ES difusa precoce (classificada como *early* em inglês), com duração da doença menor ou a igual a 5 anos. Valores de mRSS mais altos se correlacionaram com piora da função pulmonar, envolvimento cardíaco e dano vascular periférico. (ZHENG et al., 2019). O risco de desenvolver úlceras digitais também foi aumentado nos pacientes que apresentavam fibrose difusa. (SUNDERKOTTER et al., 2009). Há, portanto, importante associação entre a gravidade do comprometimento cutâneo e presença de complicações viscerais.

Um recente estudo objetivou compreender a gravidade da ES difusa pela perspectiva dos próprios pacientes, através de entrevistas. A perda de autoestima e independência foram as principais queixas em decorrência das mudanças na pele. “*Apenas completamente restrito, fisicamente, emocionalmente e de qualquer outra maneira*” foi o depoimento de um dos pacientes entrevistados. (KHANNA et al., 2019). Um aumento da incapacidade associada à doença, avaliada pelo Índice de Incapacidade do Questionário de Avaliação de Saúde (do inglês HAQ-DI) se correlacionou com piora do mRSS nos pacientes com ES difusa precoce. (HERRICK et al., 2018).

No presente estudo, demonstramos que o TACTH promoveu redução significativa do mRSS nos períodos D180+ e D360+. (Figura 6). Outros estudos na literatura corroboram a ação do transplante em promover melhora do escore clínico cutâneo. (BURT et al., 2011); (DAIKELER et al., 2015); (MICHEL et al., 2016); (DEL PAPA et al., 2017); (PAWLAK-BUŚ et al., 2019), (COSTA-PEREIRA et al., 2019); (HENES et al., 2020).

O trabalho do nosso grupo, desenvolvido por Costa-Pereira e colaboradores (2019), demonstrou melhora do mRSS após o TACTH, além de aumento da mobilidade física, da força de preensão das mãos, da capacidade funcional dos membros superiores e da abertura da boca. Estes resultados impactam diretamente sobre a qualidade de vida dos pacientes e validam o tratamento através de melhoras funcionais, além de fisiopatológicas na doença.

A superioridade do TACTH em promover melhora clínica da pele, quando comparado às terapias convencionais, é validada em alguns estudos. Del Papa e colaboradores (2017) avaliaram parâmetros como atividade e gravidade do envolvimento cutâneo, capacidade de difusão pulmonar e mortalidade relacionada à doença. O grupo de pacientes transplantados obteve melhora significativa em todas essas avaliações, comparado ao grupo de pacientes clinicamente semelhantes, porém tratados com doses imunossupressoras de ciclofosfamida endovenosa. Em concordância com estes resultados, um estudo clínico de fase 2 (ASSIST) objetivando avaliar a eficácia e segurança do TACTH, mostrou que o grupo controle de pacientes, tratados com ciclofosfamida durante seis meses, apresentou declínio contínuo da

função pulmonar, piora do escore da pele e menor qualidade de vida, quando comparados aos transplantados. (BURT et al., 2011).

Além da melhora clínica da fibrose, vista pela redução do mRSS, o presente estudo identificou alterações histológicas na redução da espessura da epiderme e alterações da expressão de fibras de colágeno avaliadas pelas técnicas de coloração HE e picrosirius red. (Figura 9 e 11). A epiderme é a camada mais externa da pele, formada por um epitélio estratificado contendo uma camada de células proliferativas e várias camadas de células diferenciadas. (SOTIROPOULOU e BLANPAIN, 2012). Os queratinócitos compõem 95% das células epidérmicas e contribuem para o processo fibrótico. (GANTWERKER e HOM, 2011).

Alguns estudos vêm demonstrando o papel da epiderme e suas alterações na ES. Uma análise proteômica da pele mostrou uma alteração abundante de proteínas específicas da epiderme e envolvidas na diferenciação dos queratinócitos. Estes achados mostram que a epiderme na ES está ativada e pode contribuir para o processo fibrótico pela liberação de citocinas e fatores de crescimento que regulam os fibroblastos dérmicos. (ADEN et al., 2008). Estes dados são confirmados pelo trabalho de Nikitorowicz-Buniak e colaboradores (2014), que demonstraram uma epiderme hipertrófica, com aumento do número e tamanho dos queratinócitos na ES, quando comparados ao grupo controle saudável. Além disso, confirmaram que há maior proliferação celular epidérmica na ES avaliada pelo marcador Ki67. Portanto, observamos uma epiderme hipertrófica, ativada e proliferativa em pacientes com ES. Este estudo mostrou que o TACTH é capaz de promover uma diminuição da espessura da epiderme em um ano após o tratamento. Embora não tenhamos analisado os queratinócitos neste estudo, isso é planejado para estudos futuros.

Alterações na derme dos pacientes esclerodérmicos também já foram descritas, caracterizando-se pelo acúmulo exacerbado de colágeno, principalmente tipos I e II, produzido por fibroblastos ativados. (LEROY et al., 1974); (KRIEG et al., 1985); (PELTONEN et al., 1985); (VARGA e BASHEY, 1995). Um trabalho mostrou correlação entre os escores de colágeno hialinizado e de miofibroblastos presentes na derme de pacientes ES difusa. (KISSIN et al., 2006). Recentemente, Cao e colaboradores (2017) mostraram aumento significativo da quantidade de colágeno dérmico total e aumento dos feixes de colágeno em pacientes com ES difusa, quando comparados tanto àqueles com ES limitada quanto a indivíduos saudáveis.

Mostramos neste estudo que o TACTH foi capaz de reduzir a expressão de fibras de colágeno tipo I e III avaliada pela coloração por picrosirius red. (Figura 11). Este resultado é corroborado por outros estudos na literatura. Verrecchia e colaboradores (2007) mostraram regressão do grau de fibrose em biópsias de pele de pacientes com ES difusa pós transplante.

Primeiramente, a melhora foi vista na derme papilar e, em seguida, na derme profunda, avaliada histologicamente por HE. Daikeler e colaboradores (2015) também demonstraram melhora da fibrose pós-transplante nas camadas da derme de pacientes com ES difusa. Diferentemente do presente estudo, as biópsias foram coletadas em diferentes regiões como abdômen, e antebraços direito e esquerdo, e com grande variabilidade nos seguimentos pós-transplante, desde pré até 96 meses pós-transplante.

Os mecanismos que levam a redução da espessura epidérmica e melhora da fibrose na derme após o TACTH não estão completamente elucidados. Um trabalho do nosso grupo, em andamento, avalia em maior profundidade possíveis mecanismos de ação associados a essa melhora. Embora ainda haja perguntas não respondidas, a melhora da pele após um regime intenso de imunossupressão, seguido por infusão de células-tronco hematopoéticas nos sugere o papel do sistema imunológico em contribuir com o processo fibrótico.

Alguns estudos têm mostrado que a reconstituição do sistema imune proporcionada pelo TACTH altera os níveis de citocinas inflamatórias e de moléculas pró-fibróticas (TSUKAMOTO et al., 2011); (MICHEL et al., 2016); (DEL PAPA et al., 2018). Assim, a melhora da pele após o tratamento com o TACTH, vista neste trabalho através de avaliação clínica e histológica, poderia ser proveniente da capacidade do transplante em promover condições de homeostase tecidual.

Outra característica patológica da ES é o ambiente endotelial desregulado, promovendo uma série de alterações locais, desencadeando anormalidades funcionais e estruturais. (ASANO e SATO, 2015); (SCHNIERING et al., 2019). Diante deste cenário, os mecanismos de reparo compensatório estão comprometidos na ES com falha na angiogênese e vasculogênese. Há, portanto, um quadro de dano vascular difuso que não é reparado fisiologicamente. (RABQUER e KOCH, 2012). Os resultados apresentados no presente estudo avaliaram aspectos vasculares que podem refletir integridade, dano e ativação endotelial nos pacientes com ES transplantados. Assim, investigamos os efeitos do TACTH sobre o endotélio danificado.

As alterações morfológicas da microvasculatura nos pacientes com ES foram descritas pela primeira vez por Brown e O'Leary (1925) através do exame de capilaroscopia periungueal. O exame consiste em avaliar os capilares próximos às cutículas das unhas com um estereomicroscópio. Eles observaram que as anormalidades microvasculares incluem uma significativa redução de alças capilares, presença de capilares dilatados (ectasiados) e distorcidos (enovelados) além de áreas hemorrágicas. As alterações da capilaroscopia na ES podem ser classificadas em padrão inicial, ativo e tardio, que se correlacionam com alguns aspectos clínicos da doença. (RUARO et al., 2018). De acordo com Cutolo e colaboradores

(2019) o padrão inicial é caracterizado por pequenos capilares gigantes, pouca área hemorrágica, com distribuição e densidade preservada dos capilares. O ativo apresenta-se com maior número de megacapilares e áreas de microhemorragia, com perda moderada de capilares e presença de capilares enovelados/desarranjados. O padrão tardio mostra extensas regiões avasculares, alças capilares neoangiogênicas e grande número de capilares desarranjados/enovelados. Todos os pacientes deste estudo apresentavam padrão capilaroscópico tardio, avaliado imediatamente antes do transplante.

Além de um importante método para avaliar a microvasculatura, a capilaroscopia periungueal também representa um importante meio para avaliar a gravidade da doença, prevendo envolvimento visceral e com valor prognóstico. (SOUZA e KAYSER, 2015). O padrão tardio da capilaroscopia foi associado com a forma difusa da doença, e a progressão do envolvimento da pele, pulmão, coração e vascular periférico se correlacionaram com agravamento da microangiopatia. (CARAMASCHI, 2007). Outro estudo mostrou que os padrões de gravidade da capilaroscopia podem ter valor preditivo, identificando os pacientes que poderão apresentar envolvimento grave de órgãos no futuro. (SMITH et al., 2013).

Em 2009, Miniati e colaboradores avaliaram a capilaroscopia de pacientes tratados com o TACTH versus pacientes tratados convencionalmente com altas doses de ciclofosfamida. Inicialmente, todos apresentavam padrão tardio, e somente os pacientes transplantados mudaram para perfil “ativo”, enquanto que os pacientes com tratamento convencional permaneceram com o padrão tardio. No presente estudo, observamos um aumento do número de capilares no D360+ e redução de megacapilares aos D180+ e D360+ pós-transplante. (Figura 8). Assim, observamos que o regime de imunossupressão, seguido de infusão de células-tronco pode afetar o remodelamento vascular.

As células endoteliais revestem o lúmen dos vasos sanguíneos, funcionando como barreira física entre o sangue e tecidos pelo corpo. Assim, as moléculas de adesão celulares possuem importante função na vedação das CEs na parede do vaso, promovendo assim a integridade endotelial. (REGLERO-REAL et al., 2016). Considera-se que as moléculas de adesão tenham papel importante nas alterações endoteliais que compõem a patogênese da ES, consideradas potenciais biomarcadores na vasculopatia. (CHORA et al., 2015).

Além de promoverem a integridade do endotélio, as moléculas de adesão regulam o recrutamento leucocitário para os sítios de injúria e inflamação, a permeabilidade vascular e o processo de angiogênese. (REGLERO-REAL et al., 2016). As moléculas CD31 e VE-caderina são expressas uniformemente nas junções celulares, mesmo quando as CEs não estão ativadas. Ambas mantêm as CEs unidas para fornecer suporte mecânico ao endotélio, proporcionando

estabilidade e integridade. (CERRUTI e RIDLEY, 2017). Através da técnica de microscopia eletrônica, os capilares dérmicos de pacientes com ES mostraram lacunas intercelulares, vacuolização e destruição de CEs. (BRUNI et al., 2018).

Estudos mostram que moléculas de adesão, tanto solúveis quanto na pele, estão aumentadas em pacientes com ES, em comparação com indivíduos saudáveis, além de correlacionarem-se com a gravidade da doença e envolvimento visceral. (HOU et al., 2010); (ALZAWAWY et al., 2011); (HASEGAWA et al., 2014). Estes estudos mostram que a expressão das moléculas de adesão está aumentada nos estágios iniciais da doença. Manetti e colaboradores (2013) mostraram, em culturas de células endoteliais microvasculares de pacientes com ES, que a expressão de moléculas de adesão juncional estava notadamente reduzida nos estágios mais tardios da doença. Em concordância com estes achados, Fleming e colaboradores (2008) encontraram redução da expressão de marcadores vasculares como VE-caderina e fator de von Willebrand, exceto CD31 comparados a indivíduos saudáveis avaliado por IHC. Neste mesmo trabalho, os pesquisadores avaliaram com contagem de CD31+, se a perda de capilares era diferente nos pacientes com duração da doença menor que dois anos, em comparação àqueles com mais de cinco anos. Não houve diferença estatística entre os grupos, embora quando comparados aos controles observou-se que a redução dos capilares ocorreu globalmente na esclerodermia.

O presente estudo investigou se a expressão de moléculas de adesão presentes nas células endoteliais dérmicas dos pacientes com ES se alterava após o TACTH. Observamos que a molécula de adesão celular endotelial plaquetária (do inglês *Platelet endothelial cell adhesion molecule*, PECAM-1) também conhecido como cluster de diferenciação CD31 e a VE-caderina não tiveram suas expressões alteradas nos períodos analisados pós-transplante. (Figura 13 a 16). No estudo de Fleming et al. (2008), o marcador VE-caderina, avaliado por IHC, aumentou em 5 de 7 biópsias de pele em pacientes transplantados, e o CD31 manteve-se superexpresso antes e após tratamento, não se alterando com o procedimento. Diferente do nosso estudo, que avaliou amostras de pele até um ano pós TACTH, estes resultados foram vistos em média 5 anos após o transplante. Além disso, o regime de condicionamento para o TACTH incluiu irradiação corporal total e seleção CD34+ no enxerto, diferenciando-se dos pacientes transplantados em nosso centro. Em contrapartida, o trabalho de Daikeler et al. (2015) não encontrou alterações na densidade de capilares dérmicos após o TACTH, vistos por 3 diferentes marcadores vasculares: CD31, vWF e VE-caderina. Neste estudo, o protocolo clínico também foi diferente, com seleção positiva de CD34 no enxerto, e ausência de padronização da coleta de amostras de pele, com biópsias realizadas em períodos que variavam de 6 a 96 meses pós-TACTH.

Os dados na literatura, que avaliam moléculas de adesão vascular em amostras de pele de pacientes com ES transplantados, variam entre períodos analisados, protocolos clínicos e sítio anatômico da coleta. Assim, ressaltamos a importância deste estudo em avaliar o perfil dos pacientes do centro de transplante do HCFMRP/USP para entendermos como nosso protocolo clínico pode agir sobre o compartimento endotelial. Acreditamos que seja importante analisarmos a expressão destes marcadores em períodos mais prolongados pós-transplante, para investigar se não encontramos alterações devido ao curto tempo avaliado ou se, de fato, o TACTH não é eficaz em promover tais mudanças no compartimento endotelial.

Nosso trabalho mostrou que houve redução significativa da e-selectina na pele aos 180 e 360 dias pós transplante. (Figura 17 e 18). Esta molécula de adesão não é constitutivamente presente nas células endoteliais, sendo expressa apenas quando ativadas por interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral α (TNF α) ou lipopolissacarídeos bacterianos (LPS). (SILVA et al., 2018).

Estudos na literatura mostram que os níveis séricos da e-selectina estão aumentados nos pacientes com ES. (IHN et al., 1998); (VALIM et al., 2004); (KINIKLI, 2004); (KURLISZYN-MOSKAL, et al., 2005); (HASEGAWA et al., 2014). Outros trabalhos mostram correlação entre os níveis séricos da molécula e piora da capacidade pulmonar, avaliada pela prova de função pulmonar (ATES et al., 2003); (IVERSEN et al., 2015). Também foi encontrada uma correlação entre a e-selectina sérica e deleção dos capilares avaliados pelo exame de capilaroscopia periungueal. (VALIM et al., 2004). Entretanto, a literatura carece de estudos recentes que avaliem a expressão da e-selectina na pele dos pacientes esclerodérmicos. Em 1995, Gruschwitz e colaboradores mostraram que os níveis séricos de moléculas de adesão como e-selectina, ICAM-1 e V-CAM-1 se correlacionaram positivamente com a expressão dessas moléculas nas células endoteliais da pele.

Em nosso estudo, mostramos uma correlação positiva entre o mRSS e valores de e-selectina, (Tabela 3) além de encontrarmos expressão aumentada nos pacientes com valor do mRSS mais alto (>25). (Figura 35). Moskal et al. (2005) mostraram que os marcadores de ativação endotelial e-selectina, VEGF e endotelina-1 estavam notavelmente presentes no soro de pacientes com ES com envolvimento visceral em comparação àqueles com doença restrita à pele. Cossu et al. (2016) mostraram diversos aspectos da vasculopatia associados com gravidade e estágios da doença, incluindo defeitos na angiogênese (Ang-2, VEGF) e ativação de células endoteliais (e-selectina). Os resultados desse grupo mostram, através da análise destes marcadores séricos, que a vasculopatia piora proporcionalmente à gravidade da doença.

Assim, ao detectarmos redução da expressão de e-selectina da pele, podemos inferir que o TACTH promoveu mudanças benéficas aos pacientes.

Analizamos as correlações entre os marcadores da pele e seus marcadores sorológicos correspondentes (figura 45). Embora os resultados tenham sido muito variáveis, encontramos algumas associações relevantes envolvendo o marcador de ativação endotelial e-selectina. No período D180+ (matriz C) identificamos correlação positiva entre os valores da e-selectina e VEGFA expressos na pele, negativa entre e-selectina da pele e VEGFA do soro, e negativa entre ambos marcadores no soro. As diferentes correlações da e-selectina com VEGFA, tanto séricos quanto na pele, pode nos indicar um efeito anti-inflamatório do TACTH sobre o endotélio no período D180+. Mais tarde, no período D360+ (matriz D), observamos correlação negativa da e-selectina sérica com VEGFA da pele. Assim, percebemos que em diferentes períodos do transplante, esses marcadores se associam de formas diferentes, tanto no soro quanto na pele. Essa dinâmica de associações entre marcador de ativação endotelial e angiogênese, no pós-transplante, indica que o tratamento é capaz de promover mudanças no compartimento endotelial, além dos efeitos sobre o compartimento imunológico, já conhecidos.

Embora a expressão da e-selectina seja transitória após um estímulo inflamatório, com expressão máxima da superfície durante 3-6 horas e retorno aos níveis basais dentro de 24 horas, nosso estudo mostra uma redução significativa da e-selectina em pacientes com ES transplantados. Este achado nos indica que o endotélio dos pacientes em estágios mais graves também está ativado antes do transplante. A imunoablação, seguida pela infusão de células-tronco no transplante, leva ao *resetting* imunológico e, possivelmente, à desinflamação do endotélio, com consequente redução da sua ativação.

Nosso estudo também objetivou investigar o impacto do TACTH sobre fatores angiogênicos da doença. Assim, analisamos a expressão do sistema angiopoietina e seu receptor, bem como do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFA) e seu receptor. (Figura 19 a 22). O VEGF é um regulador chave de crescimento de vasos sanguíneos, portanto importante fator na angiogênese. (FERRARA et al., 2003). Diversos trabalhos têm demonstrado a presença aumentada nos níveis séricos de VEGF e seu receptor (VEGFR) na esclerose sistêmica. (DISTLER et al., 2002); (CHOI et al., 2003); (KURYLISZYN-MOSKAL et al., 2005), (SHENAVANDEH et al., 2017); (CHORA et al., 2017).

Percebe-se, entretanto, que apesar de diversos fatores pró-angiogênicos estarem aumentados na doença, o mecanismo é ineficiente para reparar o dano endotelial e a disfunção vascular na ES. O aumento da expressão de VEGF e seu receptor já seria esperado nesses pacientes, visto que o quadro apresentado de dano endotelial, progredindo para injúria e

isquemia, desencadeia um ambiente de hipóxia. Sob tais condições, o fator induzível por hipóxia (HIF) é ativado e tem como principal gene alvo, o *VEGF*. (RAMAKRISHNAN *et al.* 2014). Ioannou *et al.* (2013) demonstraram um aumento da expressão de HIF-1 α na pele de pacientes com esclerodermia, correlacionando-se com aumento de VEGF, evidenciando uma importante relação entre hipóxia e vasculopatia.

Distler *et al.* (2004) mostraram a expressão de RNA mensageiro deste marcador também aumentado na pele dos pacientes com ES. Assim, percebemos que pacientes com ES apresentam estes marcadores pró-angiogênicos altamente expressos, mas acompanhados por uma insuficiência angiogênica. Quando a expressão do VEGF foi correlacionada com as alterações morfológicas da microvasculatura, avaliadas por capilaroscopia, observou-se que altos níveis de VEGF associaram-se com menor densidade de capilares. (MICHALSKA-JAKUBUS, 2019).

Para verificar se a falha na angiogênese estava relacionada com polimorfismos do *VEGF*, Allanore *et al.* (2007) analisaram uma grande coorte de pacientes europeus caucasianos. O estudo contou com 416 pacientes do consórcio EUSTAR (do inglês, *European Scleroderma Trials and Research group*) e 249 indivíduos saudáveis. Os resultados não mostraram associação significativa entre polimorfismos do *VEGF* e manifestações vasculares, em pacientes e grupo controle. Contrastando com esses dados, Manetti e colaboradores (2011) mostraram aumento da isoforma antiangiogênica VEGF(165)b no soro e na pele de pacientes com ES. A expressão aumentada de VEGF também é encontrada no ambiente da medula óssea dos pacientes com ES, associada a uma redução do número de microvasos locais. (CARRAI *et al.*, 2012).

Nosso estudo mostrou que o TACTH não foi capaz de alterar a expressão de VEGFA e de seu receptor VEGFR2 na pele de pacientes com ES. Entretanto, embora nossos dados não mostrem uma redução pós-transplante deste fator angiogênico, observamos uma correlação positiva entre VEGF e e-selectina na pele dos pacientes no período D180+ pós-TACTH. (Figura 45, matriz C). Correlação positiva indica que duas variáveis aumentam ou diminuem simultaneamente. Dessa forma, a redução da expressão da e-selectina, observada neste mesmo período, poderia indicar uma tendência do VEGF em também ter seus níveis de expressão reduzidos em períodos mais tardios pós transplante. Outro achado que sugere esta futura redução é a mudança da morfologia dos vasos, avaliada pela capilaroscopia de leito ungueal. Os estágios iniciais de dano vascular na ES são caracterizados por um perfil pró-angiogênico, com regeneração microvascular aberrante refletida pelos capilares gigantes à capilaroscopia (MATUCCI-CERINIC *et al.*, 2017). No entanto, nosso estudo mostrou redução de

megacapilares pós-transplante, possivelmente indicando restabelecimento do equilíbrio do processo de angiogênese. (Figura 8).

O sistema de angiopoietinas (ANG) e seus receptores Tie compõem outra importante via de sinalização para o sistema vascular, sendo responsáveis pela maturação dos vasos e sobrevivência das células endoteliais. A proteína ANG1 atua na estabilização dos vasos, enquanto que a ANG2 está envolvida com a remodelação vascular. (THOMAS e AUGUSTIN, 2009); (EKLUND et al., 2017).

O trabalho original de Michalska-Jakubus et al (2010) demonstrou, pela primeira vez, diferenças de expressão da ANG1 e ANG2 séricas nos pacientes com ES e correlações com as manifestações clínicas. Os resultados mostraram que a ANG1 estava notavelmente menos expressa do que a ANG2 nos pacientes com ES, quando comparados ao grupo controle. A presença da ANG2 se correlacionou diretamente com o escore de Rodnan, com o escore de atividade da doença definido pelo Grupo Europeu de Estudo de Esclerodermia - EScSG (do inglês, *European Scleroderma Study Group*) e com os níveis séricos de proteína C reativa (CRP), e inversamente com os níveis de difusão de CO pulmonar. Além disso, a ANG2 estava aumentada nos pacientes com maior avanço do dano capilar avaliado pelo padrão de capilaroscopia. Um trabalho posterior de Michalska-Jabukus et al (2019) mostrou que o padrão de capilares gigantes, visto pela capilaroscopia, está associado com aumento de VEGF e diminuição de ANG1, enquanto que o aumento concomitante de VEGF e ANG2 podem prever o dano capilar mais avançado com desertificação capilar.

O estudo de Noda et al (2011) mostrou que os níveis séricos do receptor Tie2 solúvel (sTie2) não são diferentes entre pacientes com ES e controles saudáveis. Apesar disso, a frequência do sTie2 é maior nos pacientes que apresentam áreas de hemorragias à capilaroscopia e hipertensão arterial pulmonar (PAH). Gerlicz et al. (2014), além de demonstrarem aumento dos níveis séricos de ANG2 nos pacientes com ES, observaram correlação negativa entre a ANG1 e a duração do fenômeno de Raynaud, que é causado pela diminuição temporária do fluxo sanguíneo nas mãos.

Quando analisada na pele, a ANG2 estava mais expressa nos pacientes com ES do que nos controles saudáveis, ao contrário da ANG1. (MORITZ et al., 2017). Neste mesmo trabalho, o receptor diminuiu consideravelmente na pele, enquanto os níveis séricos já estavam aumentados no início da doença. A proporção soro/pele de ANG1 e ANG2 estava reduzida nos pacientes, principalmente naqueles que apresentavam úlceras digitais, indicando um quadro de desestabilização vascular. Nosso estudo mostrou que a ANG1 teve sua expressão reduzida após o transplante, enquanto a ANG2 e TIE2 não se alteraram. (Figura 25 a 29). Embora o estudo de

Moritz e colaboradores (2017) tenha mostrado que a ANG1 não estava mais expressa na pele, sua redução após o transplante pode indicar uma falha do tratamento em promover estabilização dos vasos. Apesar da ANG2 não ter alterado sua expressão, observamos uma correlação positiva com a endotelina e e-selectina expressos na pele avaliado em todos os períodos do TACTH. (figura 42).

O endotélio é um tecido metabolicamente ativo com importantes funções fisiológicas, incluindo produção de moléculas vasodilatadoras e vasoconstritoras, que controlam o tônus vascular. (SHIHOYA et al., 2016). Na ES, a injúria das células endoteliais leva a um aumento da produção de endotelina-1 que, além da ação vasoconstritora, é um importante mitógeno de células musculares lisas vasculares e fibroblastos. Esse fenômeno favorece a hiperplasia da íntima, com estreitamento luminal e, finalmente, obliteração do vaso. (AGHAEI *et al.*, 2012); (JING et al., 2015). O aumento de endotelina-1 foi encontrado em diversos órgãos acometidos pela ES e nos níveis séricos. (ABRAHAM et al., 1995); (MORELLI et al., 1995); (VANCHEESWARAN et al., 1997).

Embora os trabalhos presentes na literatura que avaliam a endotelina na doença sejam mais antigos, estudo recentes têm demonstrado a ação do antagonista de seu receptor (Bosentana) na melhora da função endotelial. (SFIKAKIS et al., 2007); (ABDULLE et al., 2019); (REZUS et al., 2019). Em nosso estudo, mostramos que não houve alterações na expressão da endotelina-1 presente na pele dos pacientes transplantados. (Figura 23 e 24). Observamos, entretanto, uma correlação negativa entre a endotelina da pele com a e-selectina sérica e endotelina sérica com e-selectina da pele aos 180 dias pós transplante. (figura 45 C). Estes dados nos sugerem que o TACTH possa agir de forma incompleta no compartimento endotelial, melhorando o estado de ativação, porém, permanecendo um perfil mais vasoconstritor que vasodilatador protetivo. Entretanto, no período mais tardio, em D360+ pós transplante observamos uma correlação positiva da endotelina e e-selectina expressas na pele, podendo nos indicar que o efeito de reparo mais global do TACTH no compartimento endotelial seja a longo prazo, já que há uma diminuição da expressão de e-selectina da pele em D360+.

Nosso estudo apresentou algumas limitações. Por ser um estudo retrospectivo, não tivemos acesso a todas as informações clínicas necessárias dos prontuários médicos, o material biológico foi coletado e processado por outras pessoas, e assim não pudemos ter controle absoluto sobre o processamento. Houve falhas de coleta de amostras: soro não disponível para todos, no período D180+ havia menos disponibilidade de amostras de pele, impossibilitando a análise pareada de todos os 35 pacientes incluídos neste estudo. Os pacientes do estudo são selecionados de um centro único de transplante, com possível viés de perfil clínico dos

transplantados (viés de seleção). Além disso, como foram somente incluídos pacientes com ES difusa, não podemos estender nossos achados para pacientes com a forma limitada da doença, que frequentemente tem envolvimento vascular mais evidente. (ALLANORE et al, 2015). Também não incluimos grupo controle para fins comparativos.

Para o futuro, pretendemos ampliar este estudo, avaliando a expressão gênica dos marcadores vasculares no sangue e na pele, investigar os tipos celulares envolvidos no dano e reparo vascular, avaliar o estresse oxidativo e o nicho da medula óssea.

Considerações finais

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nosso grupo de pesquisa investiga como o TACTH promove seu efeito terapêutico em pacientes com esclerose sistêmica. Resultados anteriores mostram que a ablação imunológica, acompanhada pela infusão de células-tronco hematopoéticas promove a ontogênese de um novo sistema imunológico com restabelecimento da autolerância. Um ano após o transplante, começamos a observar reativação da função tímica (compartimento de células T) e aumento da função medular (compartimento de células B), gerando maior diversidade do repertório imunológico. O transplante também diminui o nível sérico de citocinas inflamatórias e pró-fibróticas, achados que se associam à eficácia terapêutica do procedimento. (ARRUDA et al., 2016, 2017a, 2017b).

Mais recentemente, mostramos que o TACTH promove melhora da capacidade física avaliada pelo aumento da força de preensão das mãos, da capacidade funcional dos membros superiores e da abertura da boca, bem como melhora na qualidade de vida. (COSTA-PEREIRA et al., 2019). O presente estudo mostrou como o TACTH afeta a fibrose e a microvasculatura por avaliações clínicas e histológicas. Clinicamente, observamos importante melhora da fibrose pela diminuição significativa do escore de Rodnan. Histologicamente, evidenciamos redução da espessura da pele e diminuição da densidade de colágeno. Na microvasculatura, observamos, através da capilaroscopia, mudanças morfológicas, com aumento do número de capilares e redução de megacapilares. Dos marcadores vasculares avaliados na pele houve redução da expressão da e-selectina, que se associou ao envolvimento cutâneo mais grave e diminuição da ANG1 pós-transplante.

Nossos dados sugerem que a reversibilidade do dano endotelial associado à doença não é alcançada integralmente após o TACTH. Entretanto, pontuais melhoras são observadas clínica e histologicamente. Acreditamos que o efeito terapêutico do TACTH possa estar mais associado à melhora da fibrose do que a efeitos sobre o compartimento microvascular. Estudos futuros são necessários para que possamos entender que o transplante não gera melhora completa da injúria vascular, indicando que terapias adicionais poderão ser necessárias para tratar de maneira mais eficaz a lesão endotelial.

SÍNTESE DOS RESULTADOS

- O TACTH promoveu melhora da fibrose, avaliada histologicamente pela redução da espessura da pele e diminuição da densidade de colágeno.
- Dos marcadores vasculares avaliados na pele, somente e-selectina e ANG1 se alteraram pós TACTH, com diminuição em suas expressões.
- Dos marcadores vasculares séricos disponíveis, e-selectina, endotelina e VEGFA, nenhum apresentou alterações pós TACTH.
- Os dados clínicos avaliados a partir de prontuários médicos, mostraram importante melhora da fibrose clínica visto pelo escore de Rodnan, aumento do número de capilares e redução de megacapilares avaliado pelo exame de capilaroscopia, estabilização da função pulmonar e não alteração dos níveis de auto anticorpos pós TACTH.
- A expressão de VEGFA na pele e soro se correlacionaram nos pacientes com ES.
- A expressão de ANG2 na pele se correlacionou positivamente com a expressão de endotelina e e-selectina também na pele.
- O marcador de ativação e-selectina se correlacionou com VEGFA e endotelina em níveis séricos e na pele, nos períodos D180+ e D360+.
- A expressão de e-selectina se associou com o envolvimento cutâneo, e estava mais expressa naqueles pacientes com escore de Rodnan maior que 25 pontos.

Conclusão

8. CONCLUSÃO

Figura 46: Resumo gráfico do estudo

FONTE: elaborado pela própria autora.

O presente estudo conclui que o TACTH melhora a fibrose e promove alterações parciais sobre o compartimento endotelial da pele. Estudos futuros serão necessários para investigar os mecanismos exatos associados a essas alterações e para identificar potenciais alvos terapêuticos.

Referências bibliográficas

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDULLE, A. E. et al. Rapid free thiol rebound is a physiological response following cold-induced vasoconstriction in healthy humans, primary Raynaud and systemic sclerosis. **Physiological Reports**, v. 7, n. 6, p. 1–12, 2019.
2. ABRAHAM, D. J. et al. Increased levels of endothelin-1 and differential endothelin type A and B receptor expression in scleroderma-associated fibrotic lung disease. **American Journal of Pathology**, v. 151, n. 3, p. 831–841, 1997.
3. ADEN, N. et al. Proteomic analysis of scleroderma lesional skin reveals activated wound healing phenotype of epidermal cell layer. **Rheumatology**, v. 47, n. 12, p. 1754–1760, 2008.
4. ALLANORE, Y. et al. Lack of association between three vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and systemic sclerosis: Results from a multicenter EUSTAR study of European Caucasian patients. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 66, n. 2, p. 257–259, 2007.
5. ALLANORE, Y. et al. Systemic sclerosis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. April, 2015.
6. ALZAWAWY, A. I. et al. Serum soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1) in scleroderma patients and its relation to pulmonary involvement and disease activity. **Egyptian Rheumatologist**, v. 33, n. 1, p. 21–26, 2011.
7. 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.
8. AOUDJEHANE, L. et al. Interleukin-4 induces the activation and collagen production of cultured human intrahepatic fibroblasts via the STAT-6 pathway. **Laboratory Investigation**, v. 88, n. 9, p. 973–985, 14 set. 2008.
9. ARRUDA, L. C. M. et al. Resetting the immune response after autologous hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases. **Current Research in Translational Medicine**, v. 64, n. 2, p. 107–113, 2016.
10. ARRUDA, L. C. M. et al. Immune rebound associates with a favorable clinical response to autologous HSCT in systemic sclerosis patients. **Blood Advances**, v. 2, n. 2, p. 126–141, 2018a.
11. ARRUDA, L. C. M. et al. Homeostatic proliferation leads to telomere attrition and increased PD-1 expression after autologous hematopoietic SCT for systemic sclerosis. **Bone Marrow Transplantation**, v. 53, n. 10, p. 1319–1327, 2018b.
12. ARRUDA, L. C. M. et al. Immune rebound associates with a favorable clinical response to autologous HSCT in systemic sclerosis patients. v. 2, n. 2, 2019.
13. ASANO, Y. Systemic sclerosis. **Journal of Dermatology**, v. 45, n. 2, p. 128–138, 2018.
14. ASANO, Y.; SATO, S. Vasculopathy in scleroderma. **Seminars in Immunopathology**, v. 37, n. 5, p. 489–500, 2015.
15. ASSASSI, S. et al. Myeloablation followed by autologous stem cell transplantation normalises systemic sclerosis molecular signatures. **Annals of the Rheumatic Diseases**, p. annrheumdis-2019-215770, 2019.
16. BARAUT, J. et al. Peripheral blood regulatory T cells in patients with diffuse systemic sclerosis (SSc) before and after autologous hematopoietic SCT: a pilot study. **Bone Marrow Transplantation**, v. 49, n. 3, p. 349–354, 2013.

17. BIERNACKA, A.; DOBACZEWSKI, M.; FRANGOIANNIS, N. G. TGF- β signaling in fibrosis. **Growth Factors**, v. 29, n. 5, p. 196–202, 2011.
18. BRUNI, C. et al. Vascular Leaking, a Pivotal and Early Pathogenetic Event in Systemic Sclerosis: Should the Door Be Closed? **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. September, p. 1–9, 2018.
19. BURT, R. K. et al. Hematopoietic stem cell transplantation for systemic sclerosis with rapid improvement in skin scores: Is neoangiogenesis occurring? **Bone Marrow Transplantation**, v. 32, p. S65–S67, 2003.
20. BURT, R. K. et al. Autologous non-myeloablative haemopoietic stem-cell transplantation compared with pulse cyclophosphamide once per month for systemic sclerosis (ASSIST): An open-label, randomised phase 2 trial. **The Lancet**, v. 378, n. 9790, p. 498–506, 2011.
21. BURT, R. K.; FARGE, D. News & views: Autologous HSCT is efficacious, but can we make it safer? **Nature Reviews Rheumatology**, v. 14, n. 4, p. 189–191, 2018.
22. CAO, L.; LAFYATIS, R.; BURKLY, L. C. Increased dermal collagen bundle alignment in systemic sclerosis is associated with a cell migration signature and role of Arhgdib in directed fibroblast migration on aligned ECMs. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, p. 1–15, 2017.
23. CARAMASCHI, P. et al. Scleroderma patients nailfold videocapillaroscopic patterns are associated with disease subset and disease severity. **Rheumatology**, v. 46, n. 10, p. 1566–1569, 2007.
24. CARMELIET, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. **Nature**, v. 438, n. 7070, p. 932–936, 2005.
25. CAROLINA, M.; RODRIGUES, D. O. Guidelines of the Brazilian Society of Bone Marrow Transplantation on hematopoietic stem cell transplantation as a treatment for the autoimmune diseases systemic sclerosis and multiple sclerosis. 2013.
26. CARRAI, V. et al. Evidence for reduced angiogenesis in bone marrow in SSc: Immunohistochemistry and multiparametric computerized imaging analysis. **Rheumatology (United Kingdom)**, v. 51, n. 6, p. 1042–1048, 2012.
27. CERUTTI, C.; RIDLEY, A. J. Endothelial cell-cell adhesion and signaling. **Experimental Cell Research**, v. 358, n. 1, p. 31–38, 2017.
28. CHENG, M.; ANDERSON, M. S. Thymic tolerance as a key brake on autoimmunity. **Nature Immunology**, v. 19, n. 7, p. 659–664, 2018.
29. CHIZZOLINI, C. et al. Fibrosis and immune dysregulation in systemic sclerosis. **Autoimmunity Reviews**, v. 10, n. 5, p. 276–281, 2011.
30. CHOI, J.-J. et al. Elevated vascular endothelial growth factor in systemic sclerosis. **Journal of Rheumatology**, v. 30, n. 7, p. 1529–1533, 2003.
31. CHORA, I. et al. Vascular biomarkers and correlation with peripheral vasculopathy in systemic sclerosis. **Autoimmunity Reviews**, v. 14, n. 4, p. 314–322, 2015.
32. CHORA, I. et al. Evidence for a derangement of the microvascular system in patients with a very early diagnosis of systemic sclerosis. **Journal of Rheumatology**, v. 44, n. 8, p. 1190–1197, 2017.
33. CIPRIANI, P. et al. Autoimmunity Reviews Cellular players in angiogenesis during the course of systemic sclerosis. **Autoimmunity Reviews**, v. 10, n. 10, p. 641–646, 2011.
34. CORALLO, C. et al. From microvasculature to fibroblasts: Contribution of anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 28, n. 1, p. 93–103, 2015.
35. COSSU, M. et al. Serum levels of vascular dysfunction markers reflect disease severity and stage in systemic sclerosis patients. **Rheumatology (United Kingdom)**, v. 55, n. 6, p. 1112–1116, 2016.

36. COSTA-PEREIRA, K. R. et al. Hematopoietic Stem Cell Transplantation Improves Functional Outcomes of Systemic Sclerosis Patients. **JCR: Journal of Clinical Rheumatology**, v. 00, n. 00, p. 1, 2019.
37. CRISTINA, K.; MALMEGRIM, R.; LIMA-JÚNIOR, J. R. Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Autoimmune Diseases : From Mechanistic Insights to Biomarkers. v. 9, n. November, 2018.
38. CUTOLO, M.; SOLDANO, S.; SMITH, V. Pathophysiology of systemic sclerosis: current understanding and new insights. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 15, n. 7, p. 753–764, 2019.
39. CUTOLO, M.; SULLI, A.; SMITH, V. Assessing microvascular changes in systemic sclerosis diagnosis and management. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 6, n. 10, p. 578–587, 2010.
40. DAIKELER, T. et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation reverses skin fibrosis but does not change skin vessel density in patients with systemic sclerosis. **Pathologie Biologie**, v. 63, n. 4–5, p. 164–168, 2015.
41. DEL PAPA, N. et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation has better outcomes than conventional therapies in patients with rapidly progressive systemic sclerosis. **Bone Marrow Transplantation**, v. 52, n. 1, p. 53–58, 2017.
42. DEL PAPA, N.; PIGNATARO, F. The Role of endothelial progenitors in the repair of vascular damage in systemic sclerosis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. JUN, p. 1–10, 2018.
43. 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. 134–144, 2006.
44. DENTON, C. P.; KHANNA, D. Systemic sclerosis. **The Lancet**, v. 390, n. 10103, p. 1685–1699, 2017.
45. DISTLER, J. H. W.; GAY, S.; DISTLER, O. Angiogenesis and vasculogenesis in systemic sclerosis. **Rheumatology**, v. 45, n. SUPPL. 3, p. 26–27, 2006.
46. DISTLER, O. et al. Angiogenic and angiostatic factors in systemic sclerosis: increased levels of vascular endothelial growth factor are a feature of the earliest disease stages and are associated with the absence of fingertip ulcers. **Arthritis research**, v. 4, n. 6, p. R11, 2002.
47. DISTLER, O. et al. Uncontrolled Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptors Leads to Insufficient Skin Angiogenesis in Patients With Systemic Sclerosis. p. 109–116, 2004.
48. DOWSON, C. et al. Innate Immunity in Systemic Sclerosis. **Current Rheumatology Reports**, v. 19, n. 1, 2017.
49. EKLUND, L.; KANGAS, J.; SAHARINEN, P. Angiopoietin-Tie signalling in the cardiovascular and lymphatic systems. **Clinical Science**, v. 131, n. 1, p. 87–103, 2017.
50. ELHAI, M. et al. Trends in mortality in patients with systemic sclerosis over 40 years: A systematic review and meta-analysis of cohort studies. **Rheumatology (United Kingdom)**, v. 51, n. 6, p. 1017–1026, 2012.
51. FARGE, D. et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases: an observational study on 12 years' experience from the European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party on Autoimmune Diseases. **Haematologica**, v. 95, n. 2, p. 284–292, 1 fev. 2010.
52. FARGE, D. et al. Long-term immune reconstitution and T cell repertoire analysis after autologous hematopoietic stem cell transplantation in systemic sclerosis patients. **Journal of Hematology and Oncology**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2017.
53. FENOGLIO, D. et al. Alteration of Th17 and Treg cell subpopulations co-exist in

- patients affected with systemic sclerosis. **Clinical Immunology**, v. 139, n. 3, p. 249–257, 2011.
54. FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nature Medicine**, v. 9, n. 6, p. 669–676, 2003.
 55. FLEMING, J. N. et al. Capillary regeneration in scleroderma: Stem cell therapy reverses phenotype? **PLoS ONE**, v. 3, n. 1, 2008.
 56. FRANTZ, C. et al. Outcomes of limited cutaneous systemic sclerosis patients: Results on more than 12,000 patients from the EUSTAR database. **Autoimmunity Reviews**, v. 19, n. 2, p. 102452, 2020.
 57. FUSCHIOTTI, P. Current perspectives on the role of CD8+ T cells in systemic sclerosis. **Immunology Letters**, v. 195, n. July 2017, p. 55–60, 2018.
 58. GANTWERKER, E. A.; HOM, D. B. Skin: Histology and Physiology of Wound Healing. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 19, n. 3, p. 441–453, 2011.
 59. GRUSCHWITZ, M. S.; HORNSTEIN, O. P.; DRIESCH, P. V. DEN. Correlation of soluble adhesion molecules in the peripheral blood of scleroderma patients with their in situ expression and with disease activity. **Arthritis & Rheumatism**, v. 38, n. 2, p. 184–189, 1995.
 60. HASEGAWA, M. et al. Serum chemokine and cytokine levels as indicators of disease activity in patients with systemic sclerosis. **Clinical Rheumatology**, v. 30, n. 2, p. 231–237, 2011.
 61. HASEGAWA, M. et al. Serum Adhesion Molecule Levels as Prognostic Markers in Patients with Early Systemic Sclerosis : A Multicentre , Prospective , Observational Study. v. 9, n. 2, 2014.
 62. HENES, J. et al. Autologous stem cell transplantation for progressive systemic sclerosis: a prospective non-interventional study from the European Society for Blood and Marrow Transplantation Autoimmune Disease Working Party. **Haematologica**, p. haematol.2019.230128, 2020.
 63. HERRICK, A. L. et al. Patterns and predictors of skin score change in early diffuse systemic sclerosis from the European Scleroderma Observational Study. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 77, n. 4, p. 563–570, 2018.
 64. HIGASHI-KUWATA, N. et al. Alternatively activated macrophages (M2 macrophages) in the skin of patient with localized scleroderma. **Experimental Dermatology**, v. 18, n. 8, p. 727–729, 2009.
 65. HO, Y. Y. et al. Fibrosis - A lethal component of systemic sclerosis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 10, n. 7, p. 390–402, 2014.
 66. HOST, L. et al. Autologous stem cell transplantation in systemic sclerosis: A systematic review. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 35, n. 10, p. S198–S207, 2017.
 67. HOU, Y. et al. Junctional adhesion molecule-A is abnormally expressed in diffuse cutaneous systemic sclerosis skin and mediates myeloid cell adhesion. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 69, n. 1, p. 249–254, 2010.
 68. 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.
 69. HUGHES, M.; HERRICK, A. L. Digital ulcers in systemic sclerosis. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 56, n. 1, p. 14–25, 2017.
 70. IBRAHIM, S. E. et al. Platelet indices as markers of inflammation in systemic sclerosis patients: Relation to vascular endothelial growth factor and flow mediated dilatation. **Egyptian Rheumatologist**, v. 40, n. 4, p. 239–242, 2018.
 71. IHN, H. et al. Molecule-1 and E-Selectin in Patients With Systemic Sclerosis. p. 1188–1192, 1998.

72. IVERSEN, L. V et al. Cross-sectional study of soluble selectins , fractions of circulating microparticles and their relationship to lung and skin involvement in systemic sclerosis. **BMC Musculoskeletal Disorders**, p. 1–9, 2015.
73. KAHALEH, B. Vascular Disease in Scleroderma: Mechanisms of Vascular Injury. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 34, n. 1, p. 57–71, 2008.
74. KATSUMOTO, T. R.; WHITFIELD, M. L.; CONNOLLY, M. K. The Pathogenesis of Systemic Sclerosis. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 6, n. 1, p. 509–537, 2011.
75. KHAN, K. et al. Clinical and pathological significance of interleukin 6 overexpression in systemic sclerosis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 71, n. 7, p. 1235–1242, 2012.
76. KHANNA, D. et al. Patient perception of disease burden in diffuse cutaneous systemic sclerosis. **Journal of Scleroderma and Related Disorders**, 2019.
77. KIM, I. et al. **VEGF stimulates expression of ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin through nuclear factor-kappaB activation in endothelial cells.** [s.l: s.n.].
78. KINIKLI, G. et al. Serum-Soluble Selectin Levels in Patients with Rheumatoid Arthritis and Systemic Sclerosis. p. 315–320, 2004.
79. KISSIN, E. Y.; MERKEL, P. A.; LAFYATIS, R. Myofibroblasts and hyalinized collagen as markers of skin disease in systemic sclerosis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 54, n. 11, p. 3655–3660, 2006.
80. KURLISZYN-MOSKAL, A.; KLIMIUK, P. A.; SIERAKOWSKI, S. Soluble adhesion molecules (sVCAM-1, sE-selectin), vascular endothelial growth factor (VEGF) and endothelin-1 in patients with systemic sclerosis: Relationship to organ systemic involvement. **Clinical Rheumatology**, v. 24, n. 2, p. 111–116, 2005.
81. KUWANA, M. et al. Defective vasculogenesis in systemic sclerosis. **Lancet**, v. 364, n. 9434, p. 603–610, 2004.
82. LAMBOVA, S.; KUZMANOVA, S. Pathogenesis of Raynaud's phenomenon. **Reumatologija**, v. 13, n. 3, p. 62–65, 2005.
83. LEROY, E. C. Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts in vitro. A possible defect in the regulation or activation of the scleroderma fibroblast. **Journal of Clinical Investigation**, v. 54, n. 4, p. 880–889, 1974.
84. LESCOAT, A. et al. M1/M2 polarisation state of M-CSF blood-derived macrophages in systemic sclerosis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 78, n. 11, p. 5–6, 2019.
85. LUO, J. Y. et al. Oxidative stress markers in blood in systemic sclerosis: A meta-analysis. **Modern Rheumatology**, v. 27, n. 2, p. 306–314, 2017.
86. MALMEGRIM, K. C. R. et al. Immunological balance is associated with clinical outcome after autologous hematopoietic stem cell transplantation in type 1 diabetes. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. FEB, 2017.
87. MALMEGRIM, K. C. R. et al. Editorial: Immune Profile After Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Autoimmune Diseases: Where Do We Stand? **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. January, p. 2019–2021, 2020.
88. MANETTI, M. et al. Mechanisms in the loss of capillaries in systemic sclerosis: Angiogenesis versus vasculogenesis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 6 A, p. 1241–1254, 2010.
89. MANETTI, M. et al. Impaired Angiogenesis in Systemic Sclerosis: The Emerging Role of the Antiangiogenic VEGF165b Splice Variant. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 21, n. 7, p. 204–210, 2011.
90. MANETTI, M. et al. Differential expression of junctional adhesion molecules in different stages of systemic sclerosis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 65, n. 1, p. 247–257, 2013.

91. MATUCCI-CERINIC, M. et al. The “myth” of loss of angiogenesis in systemic sclerosis: A pivotal early pathogenetic process or just a late unavoidable event? **Arthritis Research and Therapy**, v. 19, n. 1, p. 17–20, 2017.
92. MATUCCI-CERINIC, M.; KAHALEH, B.; WIGLEY, F. M. Review: Evidence that systemic sclerosis is a vascular disease. **Arthritis and Rheumatism**, v. 65, n. 8, p. 1953–1962, 2013.
93. MAURER, B. et al. Prediction of worsening of skin fibrosis in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis using the EUSTAR database. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 74, n. 6, p. 1124–1131, 2015.
94. MEYER, O. C. et al. Disease subsets, antinuclear antibody profile, and clinical features in 127 French and 247 US adult patients with systemic sclerosis. **Journal of Rheumatology**, v. 34, n. 1, p. 104–109, 2007.
95. MICHALSKA-JAKUBUS, M. et al. Imbalanced serum levels of Ang1, Ang2 and VEGF in systemic sclerosis: Integrated effects on microvascular reactivity. **Microvascular Research**, v. 125, n. November 2018, 2019.
96. MICHALSKA-JAKUBUS, M.; KOWAL-BIELECKA, O.; CHODOROWSKA, G. Original article Angiopoietins-1 and -2 are differentially expressed in the sera of patients with systemic sclerosis : high angiopoietin-2 levels are associated with greater severity and higher activity of the disease. n. January 2018, 2010.
97. MICHEL, L. et al. Evolution of serum cytokine profile after hematopoietic stem cell transplantation in systemic sclerosis patients. **Bone Marrow Transplantation**, v. 51, n. 8, p. 1146–1149, 2016.
98. MIHAI, C.; TERVAERT, J. W. C. Anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 69, n. 2, p. 319–324, 2010.
99. MINIATI, I. et al. Autologous stem cell transplantation improves microcirculation in systemic sclerosis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 68, n. 1, p. 94–98, 2009.
100. MORELLI, S. et al. Erratum: Plasma endothelin-1 levels in patients with systemic sclerosis: Influence of pulmonary or systemic arterial hypertension (Annals of the Rheumatic Diseases). **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 54, n. 9, p. 730–734, 1995.
101. MORITZ, F. et al. Tie2 as a novel key factor of microangiopathy in systemic sclerosis. **Arthritis Research and Therapy**, v. 19, n. 1, p. 1–11, 2017.
102. MOSTMANS, Y. et al. The role of endothelial cells in the vasculopathy of systemic sclerosis: A systematic review. **Autoimmunity Reviews**, v. 16, n. 8, p. 774–786, 2017.
103. MURARO, P. A. et al. Thymic output generates a new and diverse TCR repertoire after autologous stem cell transplantation in multiple sclerosis patients. v. 201, n. 5, p. 805–816, 2005.
104. MURARO, P. A. et al. Autologous haematopoietic stem cell transplantation for treatment of multiple sclerosis. **Nature Reviews Neurology**, v. 13, n. 7, p. 391–405, 2017.
105. NICOLOSI, P. A. et al. Vascular Remodelling and Mesenchymal Transition in Systemic Sclerosis. **Stem Cells International**, v. 2016, 2016.
106. NIKITOROWICZ-BUNIAK, J. et al. Abnormally differentiating keratinocytes in the epidermis of systemic sclerosis patients show enhanced secretion of CCN2 and S100A9. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 11, p. 2693–2702, 2014.
107. NODA, S. et al. Serum Tie2 levels : clinical association with microangiopathies in patients with systemic sclerosis. v. 2, p. 1476–1479, 2011.
108. NTELIS, K. et al. The role of platelets in autoimmunity, vasculopathy, and fibrosis: Implications for systemic sclerosis. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**,

- v. 47, n. 3, p. 409–417, 2017.
109. 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. 205–210, 2011.
 110. PARK, M. J. et al. IL-1-IL-17 signaling axis contributes to fibrosis and inflammation in two different murine models of systemic sclerosis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. JUL, p. 1–12, 2018.
 111. PASSOS, G. A. **Thymus Transcriptome and Cell Biology**. [s.l: s.n.].
 112. PAWLAK-BUŚ, K. et al. Autologous hematopoietic stem cell transplant for progressive diffuse systemic sclerosis: Procedural success and clinical outcome in 5-year follow-up. **Reumatologia**, v. 57, n. 1, p. 50–54, 2019.
 113. PELTONEN, L. et al. Collagen biosynthesis in systemic scleroderma: Regulation of posttranslational modifications and synthesis of procollagen in cultured fibroblasts. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 84, n. 1, p. 14–18, 1985.
 114. PRESCOTT, R. J. et al. Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. **The Journal of Pathology**, v. 166, n. 3, p. 255–263, 1 mar. 1992.
 115. RABQUER, B. J.; KOCH, A. E. Angiogenesis and vasculopathy in systemic sclerosis: Evolving concepts. **Current Rheumatology Reports**, v. 14, n. 1, p. 56–63, 2012.
 116. RAMAKRISHNAN, S.; ANAND, V.; ROY, S. Vascular endothelial growth factor signaling in hypoxia and inflammation. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 9, n. 2, p. 142–160, 2014.
 117. RANQUE, B.; MOUTHON, L. Geoepidemiology of systemic sclerosis. **Autoimmunity Reviews**, v. 9, n. 5, p. A311–A318, 2010.
 118. REGLERO-REAL, N. et al. Endothelial cell junctional adhesion molecules. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 36, n. 10, p. 2048–2057, 2016.
 119. REZUS, E. et al. A patient-centered approach to the burden of symptoms in patients with scleroderma treated with Bosentan: A prospective single-center observational study. **Experimental and Therapeutic Medicine**, p. 1739–1746, 2019.
 120. RICCIERI, V. et al. Specific oxidative stress parameters differently correlate with nailfold capillaroscopy changes and organ involvement in systemic sclerosis. **Clinical rheumatology**, v. 27, n. 2, p. 225–230, 2008.
 121. RUARO, B. et al. Advances in nailfold capillaroscopic analysis in systemic sclerosis. **Journal of Scleroderma and Related Disorders**, v. 3, n. 2, p. 122–131, 2018.
 122. SAKKAS, L. I. et al. Oligoclonal T Cell Expansion in the Skin of Patients with Systemic Sclerosis. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 7, p. 3649–3659, 2002.
 123. SAKKAS, L. I.; CHIKANZA, I. C.; PLATSOUKAS, C. D. Mechanisms of disease: The role of immune cells in the pathogenesis of systemic sclerosis. **Nature Clinical Practice Rheumatology**, v. 2, n. 12, p. 679–685, 2006.
 124. SCHNIERING, J.; MAURER, B.; DISTLER, O. Vascular Mechanisms of Systemic Sclerosis. p. 27–37, 2019.
 125. SFIKAKIS, P. P. et al. Improvement of Vascular Endothelial Function Using the Oral Endothelin Receptor Antagonist Bosentan in Patients With Systemic Sclerosis. v. 56, n. 6, p. 1985–1993, 2007.
 126. SHENAVANDEH, S. et al. Serum vascular endothelial growth factor (VEGF), soluble VEGF receptor-1 (sVEGFR-1) and sVEGFR-2 in systemic sclerosis patients: Relation to clinical manifestations and capillaroscopy findings. **Egyptian**

- Rheumatologist**, v. 39, n. 1, p. 19–24, 2017.
127. SHIHOYA, W. et al. Activation mechanism of endothelin ET B receptor by endothelin-1. **Nature**, v. 537, n. 7620, p. 363–368, 2016.
 128. SHU, J.; QIU, G.; MOHAMMAD, I. A semi-automatic image analysis tool for biomarker detection in immunohistochemistry analysis. **Proceedings - 2013 7th International Conference on Image and Graphics, ICIG 2013**, p. 937–942, 2013.
 129. SILVA, M.; VIDEIRA, P. A.; SACKSTEIN, R. E-selectin ligands in the human mononuclear phagocyte system: Implications for infection, inflammation, and immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. JAN, 2018.
 130. SKAUG, B. et al. Global skin gene expression analysis of early diffuse cutaneous systemic sclerosis shows a prominent innate and adaptive inflammatory profile. **Annals of the Rheumatic Diseases**, p. 1–8, 2019.
 131. SMITH, V. et al. Nailfold capillaroscopy for prediction of novel future severe organ involvement in systemic sclerosis. **Journal of Rheumatology**, v. 40, n. 12, p. 2023–2028, 2013.
 132. SNOWDEN, J. A. et al. Haematopoietic SCT in severe autoimmune diseases: Updated guidelines of the European group for blood and marrow transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, v. 47, n. 6, p. 770–790, 2012.
 133. SOTIROPOULOU, P. A.; BLANPAIN, C. Development and homeostasis of the skin epidermis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 7, p. 1–9, 2012.
 134. SOUZA, E. J. DO R. E.; KAYSER, C. Nailfold capillaroscopy: relevance to the practice of rheumatology. **Revista Brasileira de Reumatologia (English Edition)**, v. 55, n. 3, p. 264–271, 2015.
 135. SUNDERKÖTTER, C. et al. Comparison of patients with and without digital ulcers in systemic sclerosis: Detection of possible risk factors. **British Journal of Dermatology**, v. 160, n. 4, p. 835–843, 2009.
 136. SWART, J. F. et al. Haematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 13, n. 4, p. 244–256, 2017.
 137. THEOFILOPOULOS, A. N.; KONO, D. H.; BACCALA, R. The multiple pathways to autoimmunity. **Nature Immunology**, v. 18, n. 7, p. 716–724, 2017.
 138. THOMAS, M.; AUGUSTIN, H. G. The role of the angiopoietins in vascular morphogenesis. **Angiogenesis**, v. 12, n. 2, p. 125–137, 2009.
 139. TROJANOWSKA, M. Cellular and molecular aspects of vascular dysfunction in systemic sclerosis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 6, n. 8, p. 453–460, 2010.
 140. TYNDALL, A. J. et al. Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: A study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 69, n. 10, p. 1809–1815, 2010.
 141. VALIM, V.; MEDICINA, E. P. DE. Correlation between serum E-selectin levels and panoramic nailfold capillaroscopy in systemic sclerosis. v. 37, p. 1423–1427, 2004.
 142. VAN DEN HOOGEN, F. et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: An American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 72, n. 11, p. 1747–1755, 2013.
 143. VAN LAAR, J. M. et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation vs intravenous pulse cyclophosphamide in diffuse cutaneous systemic sclerosis: A randomized clinical trial. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 311, n. 24, p. 2490–2498, 2014.
 144. VAN LAAR, J. M.; NARAGHI, K.; TYNDALL, A. Haematopoietic stem cell transplantation for poor-prognosis systemic sclerosis. **Rheumatology**, v. 54, n. 12, p. 2126–2133, 2015.

145. VARGA, J.; BASHEY, R. I. Regulation of connective tissue synthesis in systemic sclerosis. **International Reviews of Immunology**, v. 12, n. 2–4, p. 187–199, 1995.
146. VERRECCHIA, F. et al. Skin involvement in scleroderma - Where histological and clinical scores meet. **Rheumatology**, v. 46, n. 5, p. 833–841, 2007.
147. VOLTARELLI, J. C. et al. Transplante de células-tronco hematopoéticas em doenças reumáticas parte 1: experiência internacional. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 45, n. 4, p. 229–241, 2005.
148. VONA, R. et al. Oxidative stress in the pathogenesis of systemic scleroderma: An overview. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 22, n. 7, p. 3308–3314, 2018.
149. WIGLEY, F. M. Vascular disease in scleroderma. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 36, n. 2–3, p. 150–175, 2009.
150. WYNN, T. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. **The Journal of Pathology**, v. 214, n. 2, p. 199–210, jan. 2008.
151. YORK, M. R. et al. A macrophage marker, siglec-1, is increased on circulating monocytes in patients with systemic sclerosis and induced by type I interferons and toll-like receptor agonists. **Arthritis and Rheumatism**, v. 56, n. 3, p. 1010–1020, 2007.