THIAGO COSTA PAMPLONA DA SILVA

**Perfil de citocinas angiogênicas séricas
em pacientes com dermatomiosite**

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

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Processos Imunes e
Infecciosos

Orientador: Prof. Dr. Samuel Katsuyuki Shinjo

SÃO PAULO

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Thiago Costa Pamplona da
Perfil de citocinas angiogênicas séricas em pacientes com dermatomiosite /
Thiago Costa Pamplona da Silva -- São Paulo, 2017.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Processos Imunes e
Infecciosos.
Orientador: Samuel Katsuyuki Shinjo.

Descritores: 1.Citocinas 2.Doenças musculares 3.Dermatomiosite 4.Estudos
transversais 5.Miosites. 6.Vasos sanguíneos

USP/FM/DBD-332/17

Nome: Silva, Thiago Costa Pamplona da

Título: Perfil de citocinas angiogênicas séricas em pacientes com dermatomiosite

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Maria de Nazaré e Adair,
que regaram suas sementes com amor e hoje colhem os frutos mais doces.

Aos meus irmãos, Amanda Natália e André Luiz,
que germinaram ao meu lado e hoje nutrem minhas raízes com suas flores.

Obrigado por me permitir realizar mais um sonho de vocês.

AGRADECIMENTOS

"Nada é por acaso" alguém disse um dia. Mas a verdade é que o acaso só encontra quem sabe se aproveitar dele. A esses "acazos" que surgiram em fatos e pessoas, agradeço utilizando a maior expressão que o português me permite, mesmo querendo que ela expressasse bem mais: MUITO OBRIGADO!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Samuel Katsuyuki Shinjo, que nesses conturbados anos, foi o pai que me acolheu, apoiou e em mim acreditou. Posso ter ficado longe da perfeição prometida, mas como um bom filho, humildemente reconheço toda a dedicação despendida na minha criação acadêmica e serei ETERNAMENTE grato por tudo que fez por mim. A tudo o que isto significou para mim e minha família, MUITO OBRIGADO!

À Ms. Marilda Guimarães Silva, a menina-mulher mais incrível que já conheci nesta vida e cientista exemplar. Companheira de trabalho e parceira de vida. Seu exemplo profissional só perde para o pessoal. Sem você nesta jornada eu não teria ido tão longe. A sua maneira contagiante de fazer acontecer, MUITO OBRIGADO!

À Dra. Sueli Mieko Oba Shinjo, que como uma rainha ensinando um plebeu a se portar na corte, me instruiu o básico da tão complexa biologia molecular. A todo precioso tempo e dedicação prestados, MUITO OBRIGADO!

À Dra. Roseli da Silva, pela inestimável ajuda no aprimoramento de técnicas e protocolos tão valiosos e ao companheirismo, sorrisos e abraços trocados. Ao seu aconchegante jeito de viver, MUITO OBRIGADO!

À Maria Aurora Gomes e Maria de Fátima de Almeida pelo suporte técnico na análise das citocinas.

A todo grupo da Divisão de Reumatologia, em especial aos Drs. Fernando e Eduardo Borba, pelo apoio e considerações construtivas no aprimoramento dos resultados apresentados.

As minhas avós Guilhermina e Raimunda (em memória), pelo exemplo de perseverança e amor passado a gerações.

À minha tia Ângela, por quando dizia para mim, ainda criança, que eu era o seu "cientista maluco". Pois bem... Acho que agora concorda que acertou a premonição, só errou a ordem das palavras! MUITO OBRIGADO!

Ao meu sobrinho Rafael, que nasceu com essa tese e contagiou a toda uma família com sua alegria e inocência.

Aos meus amados e preciosos, Renata Miossi, Rodrigo Toledo, Raquel Loiola e Vinícius Guerra por serem olhos, boca e ouvidos a qualquer momento de necessidade (ou não). Por serem meus irmãos e me terem como um. Por colocarem seu nome como sinônimo de amor no meu dicionário de vida. Por tudo, MUITO OBRIGADO!

Aos meus amigos de infância André, Bruno, Gabriel, Samila e Thaís, por serem para mim o exemplo mais fiel de que uma amizade pode ser para a vida toda. Amo vocês. Pelo apoio e torcida, MUITO OBRIGADO!

Aos meus queridos amigos, Andrison Ribeiro, Fábio Brito e Lorena da

Paixão pelo apoio incondicional, até mesmo quando fui ausente.
Anatomicamente, MUITO OBRIGADO!

Às musas Ana Paula Luppino, Ketty Lysie e Valquiria Garcia, que não me deixaram enlouquecer (só um pouco), estando sempre do meu lado quando precisei. "I'd like to say... that... I amo vocês"! MUITO OBRIGADO!

Aos companheiros e amigos Leonardo Hoff, Michel Amorim, Luiz Adsuara, Pedro Luiz, Roberto Bento e Tatiana Pelaes pelos momentos de desabafo mútuo tão importantes para nossas descobertas e evolução como seres humanos. À toda nossa filosofia de bar, MUITO OBRIGADO!

Aos amigos Diogo Domiciano, Frederico Mendonça e Karina Bonfiglioli, que muitas vezes foram as melhores distrações que eu poderia pedir, mesmo sem desconfiar. Pelo apoio e amizade, MUITO OBRIGADO!

À minhas doces Amanda Lagreca e Manuela Torres, que me fizeram "respirar e não pirar". Pelo carinho e preocupação de vocês, MUITO OBRIGADO!

Ao meu querido Emerson Basso, por todo carinho, companheirismo e apoio "da vida (!)" que recebi todo esse tempo. MUITO OBRIGADO!

Ao grande time Andrea, Otávio, Gabriela, Eduardo e Maria Paula que fortaleceram minha alma com os treinos de carinho e torcida, além de matarem minha fome em churrascos. MUITO OBRIGADO!

À quadrilha do funk, Carol, Gabrielle, Graça, Laila e Marcela, pelas

impagáveis diversões noturnas. Hoje! É hoje! MUITO OBRIGADO!

Às trigêmes Ana Lúcia, Ana Maria e Luzeni, por todo amor, carinho e bom humor que deram sem pedir nada em troca. À toda empatia possível, MUITO OBRIGADO!

Aos queridos Dr. Artur Silva e Dra. Vivian Pellizari, pelo estímulo contínuo à execução e finalização deste projeto que foi o incentivo perfeito para seguir em frente. MUITO OBRIGADO!

Aos companheiros de residência médica Andressa, Carol, Ana Luiza, Eduardo, Geórgia, Flávia, Michelle, Sofia, Andrea, Camila, Carolina, Débora, Emily, Letícia, Mayara e Olga pelo convívio diário em um período muito importante da minha vida, fase essencial para meu aprimoramento técnico, pessoal e humorístico. MUITO OBRIGADO!

Aos companheiros de trabalho e amigos Marcos Sanches, Karina Macedo, Italo Bonatto, Sergio Colenci, Warlindo Torres e Maria Cecília, pelo convívio diário descontraído e apoio mútuo. Pela torcida, MUITO OBRIGADO!

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo suporte financeiro.

Finalmente, aos pacientes, familiares e funcionários que foram o objeto de estudo deste trabalho, por confiarem em compartilhar os dados coletados, na certeza de também colaborar na descoberta de soluções futuras para o bem estar coletivo, mantendo a roda viva da bondade sempre ativa.

RESUMO

Silva TCP. *Perfil de citocinas angiogênicas séricas em pacientes com dermatomiosite* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Introdução: Até o presente momento, há escassez de estudos que avaliem os níveis séricos de citocinas angiogênicas em pacientes com dermatomiosite (DM), uma miosite autoimune sistêmica que tem como fisiopatogênese a vasculopatia. Portanto, os objetivos do presente estudo foram: (a) analisar sistematica e simultaneamente os níveis séricos de *angiogenin* (ANG), *angiopoietin* (ANGPT) -1, *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *fibroblast growth factor* (FGF) -1 e -2 e *platelet derived growth factor* (PDGF) -AA e -BB em pacientes com DM; (b) correlacionar o nível sérico destas citocinas com as características clínico-laboratoriais, alterações metabólicas e atividade da DM. **Pacientes e métodos:** Estudo transversal, único centro, no qual foram incluídos, no período de 2012 a 2014, 48 pacientes consecutivos com DM definida (Bohan e Peter, 1975), entre 18 e 45 anos de idade, e em seguimento regular na nossa Instituição. Foram excluídos pacientes com condições clínicas relacionadas à DM (como sequelas de doença e tratamento prolongado) ou secundárias a outras causas que poderiam influenciar na interpretação dos resultados das citocinas avaliadas, seja por apresentarem variações hormonais ou por estarem relacionados ao mecanismo de inflamação e/ou angiogênese. Os pacientes foram pareados por sexo, idade e etnia com 48 indivíduos saudáveis (grupo controle). A análise das citocinas séricas foi realizada por imunoensaio multiplex. Os parâmetros da atividade da DM foram baseados nos escores estabelecidos por *International Myositis Assessment & Clinical Studies Group* (IMACS). **Resultados:** A distribuição de sexo e a etnia foram comparáveis entre os grupos DM e controle assim como a média de idade ($33,3 \pm 7,6$ vs. $35,8 \pm 8,2$ anos, respectivamente), e a mediana de duração de doença foi de 1 ano. No grupo DM, os níveis séricos de FGF-1 e FGF-2 ($P < 0,001$, $P < 0,001$, respectivamente) estavam elevados, enquanto os níveis de VEGF e PDGF-AA ($P = 0,009$ e $P = 0,022$, respectivamente) estavam reduzidos. Os níveis de ANG, ANGPT-1 e PDGF-BB foram semelhantes em ambos os grupos. Houve uma tendência para correlação positiva entre as citocinas (com exceção de VEGF e PDGF-BB) e os parâmetros de atividade da DM, enquanto FGF-2 apresentou correlação negativa. Além disso, o FGF-1 correlacionou-se fortemente com manifestações cutâneas da dermatomiosite.

Conclusões: Os dados atuais reforçam a importância das citocinas angiogênicas nos mecanismos de vasculopatia da DM, especialmente em condições de atividade cutânea e adequado tratamento medicamentoso. Estudos adicionais serão necessários para validar os dados obtidos no presente trabalho.

Descritores: citocinas; doenças musculares; dermatomiosite; estudos transversais; miosite; vasos sanguíneos.

ABSTRACT

Silva TCP. *Serum angiogenic cytokine features in patients with dermatomyositis* [Tese]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Introduction: Until now, there are few studies evaluating serum levels of angiogenic cytokines in patients with dermatomyositis (DM), a systemic autoimmune myositis that has vasculopathy as its physiopathogenesis. Therefore, the aims of the present study were: (a) to analyze systematically and simultaneously serum levels of angiogenin (ANG), angiopoietin (ANGPT) -1, vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor (FGF) -1 and -2, and platelet derived growth factor (PDGF) -AA and -BB in patients with DM; (b) to correlate the serum level of these cytokines with the clinical and laboratory features, metabolic alterations and DM activity. **Patients and methods:** This is an one-center cross sectional study, in which 48 consecutive patients with defined DM (Bohan and Peter, 1975) aged 18 to 45 years and regularly followed up at our Institution were included from 2012 to 2014. Patients with clinical conditions related to DM (as sequelae of disease and prolonged treatment) or secondary to other causes that could influence the results interpretation of the evaluated cytokines were excluded, either because of hormonal variations or relationship with inflammation mechanism and/or angiogenesis. Patients were gender-, age- and ethnicity-matched with 48 healthy individuals (control group). The serum levels of cytokines analyses were performed by multiplex immunoassay. The parameters of DM activity were based on the scores established by the International Myositis Assessment & Clinical Studies Group (IMACS). **Results:** The gender and ethnicity were comparable between DM and control groups as soon as the mean age (33.3 ± 7.6 vs. 35.8 ± 8.2 years, respectively), and the median disease duration was 1 year. The serum levels of FGF-1 and FGF-2 ($P < 0.001$ and $P < 0.001$, respectively) were higher in DM group, whereas the levels of VEGF and PDGF-AA ($P = 0.009$ and $P = 0.022$, respectively) were lower in DM group. The levels of ANG, ANGPT-1 and PDGF-BB were similar in both groups. There was a tendency for cytokines (with the exceptions of VEGF and PDGF-BB) to correlate positively with DM activity parameters, whereas FGF-2 correlated inversely. Moreover, FGF-1 strongly correlated with the cutaneous manifestations of DM. **Conclusion:** The current data reinforce the importance of angiogenic cytokines in DM vasculopathy mechanisms, especially in conditions of

cutaneous activity and adequate drug treatment. Additional studies will be needed to validate the data obtained in this work.

Descriptors: cytokines; muscle diseases; dermatomyositis; cross-sectional studies; myositis; blood vessels.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Desenho do estudo e seleção dos pacientes e indivíduos saudáveis	11
-------------------	--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características gerais dos pacientes com dermatomiosite e indivíduos saudáveis	17
Tabela 2 -	Nível sérico de citocinas angiogênicas de pacientes com dermatomiosite e indivíduos saudáveis	18
Tabela 3 -	Correlação de Spearman entre as citocinas angiogênicas e diferentes parâmetros de doença	20

LISTA DE SIGLAS

ANG	angiogenin
ANGPT-1	angiopoietin-1
DM	dermatomiosite
eNOS	óxido nítrico sintetase-endotelial
EVA	escala visual analógica
FGF	fibroblast growth factor
HAQ	Healthy Assessment Questionnaire
HGF	hepatocyte growth factor
IFN	interferon
IL	interleukin
IMC	índice de massa corpórea
IPAG	International Physical Activity Questionnaire
KLF2	factor-2 Krüppel-like
MMT	Muscle Manual Testing
MYOACT	Myositis Disease Activity Assessment Visual Analogue Scales
PDGF	platelet derived growth factor
PIGF	placental derived growth factor
PI3K/AKT	fosfatidilinositol-3-quinase
PLC	phosphoinositide phospholipase C
PM	polimiosite
rho	correlação de Spearman
TGF	transforming growth factor
TNF	tumor necrosis factor
VEGF	vascular endothelial growth factor

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	07
3. PACIENTES E MÉTODOS	09
3.1. Desenho do estudo e casuística	10
3.2. Avaliação dos pacientes	11
3.3. Análise das amostras de sangue	13
3.4. Análise estatística	14
4. RESULTADOS	15
5. DISCUSSÃO	22
6. CONCLUSÕES	35
7. REFERÊNCIAS	37
ANEXOS	46

1. Introdução

Dermatomiosite (DM) é uma miopatia inflamatória adquirida que se caracteriza pela presença de fraqueza muscular simétrica, progressiva e predominantemente proximal dos membros, acompanhada de lesões cutâneas típicas, como heliótropo e/ou pápulas de Gottron (Bohan e Peter, 1975a; 1975b; Dalakas, 2004, 2015; Dimachkie *et al.*, 2014; Koller e Montemarano, 2001).

Sob o ponto de vista imunopatológico, sugere-se um papel relevante dos linfócitos B na patogênese da doença, baseado na: presença de autoanticorpos, deposição de imunocomplexos em junção dermoepiderme das lesões cutâneas e presença de linfócitos B em músculos inflamados (Emslie-Smith e Engel, 1990; Engel e Arahata, 1986) e áreas perivasculares (Botet *et al.*, 1988; Dalakas, 2004). Adicionalmente, o depósito de complemento e imunoglobulina nos endotélios perifasciculares resulta na redução da densidade capilar e inflamação perivascular, encontrados tanto nas lesões cutâneas (Arahata e Engel, 1984; Distler *et al.*, 2004; Davies *et al.*, 2006) quanto nas isquemias, necroses e atrofas das fibras musculares (Arahata e Engel, 1984; Noss *et al.*, 2006; Pestronk *et al.*, 2010), o que mostra a importância da imunidade humoral (Noss *et al.*, 2006).

A ativação, quimiotaxia e invasão destas células do sistema imunológico nos tecidos musculares, assim como a amplificação do processo inflamatório, são mediadas pelas diversas citocinas presentes localmente que, por sua vez, são produzidas por células do sistema imunológico, células endoteliais e fibras musculares. Desta forma, além do papel relevante da imunidade celular e humoral, diversas citocinas têm sido caracterizadas e relacionadas à

fisiopatogênese da DM (Koch, 1988).

As citocinas podem ainda exercer ações angiogênicas ou angiostáticas, modulando a expressão de outros fatores de crescimento angiogênico (Mielnik *et al.*, 2012). Em termos práticos, tais citocinas em condições inflamatórias podem, por exemplo, promover alteração do fluxo sanguíneo nos tecidos musculares (Koch, 1988), levando a hipóxia e, clinicamente, a mialgia e fraqueza muscular.

Dentre as citocinas descritas na literatura e que estão envolvidas no mecanismo de angiogênese ou antiangiogênese destacam-se: *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *angiogenin* (ANG), *angiopoietin* (ANGPT) -1, *fibroblast growth factor* (FGF) e *platelet derived growth factor* (PDGF) -AA e -BB.

A VEGF atua como um homodímero e é uma proteína altamente glicosilada de 46-48 kDa, com potente atividade angiogênica, e provoca respostas mitogênicas e quimiotáticas em células endoteliais (Shimizu *et al.*, 2000). A VEGF regula a angiogênese, a vasculogênese e a permeabilidade vascular no adulto, sendo importante no desenvolvimento do esqueleto e na reparação de fraturas ósseas (Bates, 2010; Cui *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2014). O gene do VEGF já foi relacionado a diversas doenças, como a doença de Alzheimer, retinopatia diabética, neoplasias (Wei *et al.*, 2015). Atua na fisiopatogênese de doenças reumatológicas, como lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide, osteoartrite e osteoporose (Kikuchi *et al.*, 1998; Yuan *et al.*, 2014) e níveis aumentados já foram encontrados na esclerose sistêmica, DM e

polimiosite (PM) (Grundtman *et al.*, 2008; Kikuchi *et al.*, 1998; Volpi *et al.*, 2013).

A ANG é um polipeptídeo angiogênico, não glicosilado, classificado como membro da família RIBASE das ribonucleases (Bond *et al.*, 1993; D'Alessio, 1993; Shapiro *et al.*, 1987). Ativa as células endoteliais dos vasos e músculos lisos desencadeando migração, invasão e proliferação celular, além da formação de estruturas musculares tubulares (Gao e Xu, 2008; Hu e Riordan, 1993; Lyons *et al.*, 1990). Células endoteliais vasculares, músculo liso, fibroblastos e linfócitos podem expressar ANG (Moenner *et al.*, 1994; Rybak *et al.*, 1987), e níveis circulantes também foram detectados em soros de indivíduos normais. Há relatos de níveis aumentados no soro de pacientes com linfoma cutâneo de células T, câncer de pâncreas, doença oclusiva arterial, esclerose sistêmica, artrite inflamatória (Burgmann *et al.*, 1996, Lioté *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2008; Shimoyama *et al.*, 1996). Recentemente um estudo relacionou um aumento na expressão de mRNA da ANG na pele pacientes com DM em atividade, porém sem aumento significativo em níveis sanguíneos (Kuwahara, 2012).

ANGPT-1 é uma glicoproteína angiogênica que pertence à família da angiopoietina, sendo essencial para a estabilização e maturação dos vasos sanguíneos, atuando no recrutamento de células mesenquimais e sua diferenciação em células vasculares do músculo liso (Gravallese *et al.*, 2003; Suri *et al.*, 1996). Níveis aumentados, tanto no soro quanto na sinóvia, já foram relatados em pacientes com artrite reumatoide, relacionando o aumento com a doença inicial e maior destruição sinovial (Ishikawa *et al.*, 2011).

A família FGF compreende 23 membros, dos quais FGF-1 e FGF-2 formam a subfamília FGF-1. Ambas tem um papel importante na angiogênese, promovendo a proliferação de células endoteliais e a organização física das células endoteliais em estruturas tubulares, sendo a FGF-2 a mais implicada neste processo, por também atuar na cicatrização da pele e tendões, regeneração muscular e adipogênese. (Yun *et al.*, 2010). Doenças cardíacas, medulares, psiquiátricas e neoplasias (Beenken e Mohammadi, 2009) vêm sendo implicadas a alterações em seus níveis sanguíneos. Níveis elevados também já foram encontrados em sinóvia de pacientes com artrite reumatoide, artrite psoriásica (Butt *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2000) e no sangue de pacientes com esclerose sistêmica e DM (Kadono *et al.*, 1996).

Os PDGFs consistem em fatores de crescimento altamente conservados ligados por pontes dissulfeto formando homo/heterodímeros: PDGF -AA, -AB, -BB, -CC e -DD, que estão estrutural e funcionalmente relacionados com uma grande família de fatores de crescimento a qual inclui o VEGF (Ostendorf *et al.*, 2014). Secretada por diversos tipos celulares, como plaquetas, células endoteliais, fibroblastos macrófagos e músculo liso, (Kameda *et al.*, 2007) atuam na angiogênese, promovendo a maturação dos vasos sanguíneos através do recrutamento e adesão de células murais, estruturas de apoio para os vasos sanguíneos (Tengood *et al.*, 2011). PDGF-AA e PDGF-BB estão implicados na fisiopatogênese de várias neoplasias (gliomas, sarcomas, fígado, pulmão, colorretal, rim, tireoide) doenças vasculares (aterosclerose, hipertensão pulmonar) e fibroses (pulmonar, hepática, cutânea, renal e cardíaca), e já foi documentada também na fisiopatogênese de doenças autoimunes, como

esclerose sistêmica, artrite reumatoide, doença intersticial pulmonar e nefrite lúpica (Andrae *et al.*, 2008; Heldin, 2013; Kameda *et al.*, 2007).

Entretanto, até o presente momento, há escassez da avaliação destas citocinas angiogênicas em pacientes com DM e, quando presente, limita-se a uma ou outra citocina VEGF e ANG). Além disto, uma avaliação sistemática destas citocinas em pacientes com DM é relevante, dentro do contexto de fisiopatogênese da doença.

2. Objetivos

Os objetivos do presente estudo são:

1. Quantificar sistemática e simultaneamente diversas citocinas angiogênicas séricas (ANG, ANGPT-1, FGF-1, FGF-2, VEGF, PDGF-AA e PDGF-BB) em pacientes com DM;
2. Correlacionar o nível sérico destas citocinas com as características clínico-laboratoriais, alterações metabólicas e parâmetros da atividade da doença.

3. Pacientes e Métodos

3.1. Desenho do estudo e casuística

O presente estudo transversal avaliou 48 pacientes consecutivos com DM, entre 18 e 45 anos de idade, que preenchiam todos os critérios classificatórios da doença (Bohan e Peter, 1975a; 1975b), e estavam em seguimento regular na Unidade de Miopatias Inflamatórias - Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina do Estado de São Paulo - São Paulo, no período de 2012 a 2014.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética local (CAAE 01445312.3.0000.0068; número do parecer 1.545.393) e todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Foram excluídos do estudo pacientes com condições clínicas relacionadas à DM (sequelas de doença e tratamento prolongado) ou secundárias a outras causas que poderiam influenciar na interpretação dos resultados das citocinas avaliadas, seja por causarem variações hormonais ou por estarem relacionadas ao mecanismo de inflamação e/ou angiogênese, tais como:

- a) Relacionadas a DM: pacientes com tempo de doença ≥ 10 anos, DM clinicamente amiopática, DM juvenil, miosite associada à neoplasia;
- b) Miosite associada a outras doenças autoimunes sistêmicas: esclerose sistêmica, síndrome de Sjögren, artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico;
- c) Doenças associadas: infecções agudas e/ou crônicas, doenças hepáticas e renais, diabetes mellitus, hipertensão arterial sistêmica não controlada

crônica, infarto do miocárdio, acidente vascular encefálico, sintomas de claudicação vascular;

d) Gerais: idade avançada, menopausa, tabagismo e etilismo.

Como grupo controle, 48 adultos voluntários saudáveis, acompanhantes dos pacientes ou funcionários do presente complexo hospitalar, pareados por sexo, idade e raça foram recrutados durante o mesmo período.

A **Figura 1** mostra o desenho e a seleção dos pacientes e indivíduos saudáveis (grupo controle) para o presente estudo.

FIGURA 1 - Desenho do estudo e seleção dos pacientes e indivíduos saudáveis.

* Critérios de Bohan e Peter (1975).

** Infarto agudo do miocárdio, acidente vascular encefálico, diabetes mellitus, hipertensão arterial sistêmica, doenças hepáticas e/ou renais, sintomas de claudicação vascular periférica.

3.2. Avaliação dos pacientes

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

- a) Dados demográficos: idade atual do paciente, sexo, etnia, condição socioeconômica (Almeida *et al.*, 1991), circunferência abdominal e índice de massa corporal (IMC) [peso/altura² (kg/m²)];
- b) Dados clínicos e laboratoriais: idade no início da doença, duração da doença, manifestações clínicas [cumulativas: articular (artralgia ou artrite), pulmonar (dispneia aos moderados ou aos pequenos esforços), cutânea (pápulas de Gottron, heliótropo, úlceras, vasculites, fotossensibilidade, sinal do "xale", sinal do "V do decote", fenômeno de Raynaud, calcinose)], níveis séricos de creatinofosfoquinase (valor de referência 26 - 308 U/L), aldolase (< 7,6 U/L), alanina aminotransferase (< 41 U/L), aspartato aminotransferase (< 37 U/L), lactato desidrogenase (240 - 480 U/L) - analisados por método cinético automatizado, no Laboratório do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - São Paulo;
- c) Parâmetros de atividade de doença: avaliados através da aplicação de questionários e pontuações através da escala visual analógica (EVA) da avaliação global da doença feita pelo médico e pelo paciente (Rider *et al.*, 1997), *Muscle Manual Testing* (MMT-8) (Harris *et al.*, 2009; Rider *et al.*, 2003; 2010), *Health Assessment Questionnaire* (HAQ) (Bruce e Fries, 2003). *Myositis Disease Activity Assessment Visual Analogue Scales* (MYOACT) (Isenberg *et al.*, 2004). O detalhamento destes questionários encontra-se nos Anexos.

- d) Terapia medicamentosa: imunossupressores, imunomoduladores, glicocorticoide (doses atuais e cumulativas - nos últimos três meses e desde o início dos sintomas);
- e) Comorbidades;
- f) Estilo de vida: sedentarismo, segundo *International Physical Activity Questionnaire* (IPAQ) (Craig *et al.*, 2003) e alterações de hábitos alimentares.

3.3. Análise das amostras de sangue

Para a análise das citocinas, foram coletados 10 mL de sangue venoso dos participantes, após jejum de 12 horas, colhidos no tubo (Vacutainer®) contendo gel ativador de coágulo e imediatamente (< 30 minutos) as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm, por 10 minutos, à 4 °C.

O soro processado foi adicionado ao microtubo e armazenado em freezer à -80 °C para posterior análise das citocinas (ANG, ANGPT-1, FGF-1, VEGF, PDGF-AA e PDGF-BB) no Laboratório de Miopatias Inflamatórias da Disciplina de Reumatologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - São Paulo.

Os ensaios para análise das citocinas foram realizados a partir da amostra de 25 µL de soro de cada paciente, utilizando o kit *Luminex Performance Assay*, fabricado por R&D Systems, que efetua a determinação quantitativa simultânea de diversas citocinas; isto ocorre através de microesferas conjugadas a anticorpos de captura específicos presentes em uma placa, que são corados por

corantes fluoróforos e quando a amostra se liga a estes anticorpos de captura, a detecção final é realizada através de um terceiro marcador fluorescente (estreptavidina-ficoeritrina), formando um complexo (anticorpo de captura - amostra - anticorpo de detecção biotinilado). A análise dos dados é obtida através do Luminex xMAP Technology (Millipore, EUA) que captura e detecta as microesferas através de dois feixes de luz, no qual o primeiro classifica e o segundo quantifica as citocinas através das microesferas detectadas por sinais fluorescentes a partir da estreptavidina.

3.4. Análise estatística

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar a distribuição normal de cada parâmetro contínuo. As características demográficas e clínicas foram expressas como média $\pm$ desvio padrão para variáveis contínuas ou como frequências e porcentagens (%) para variáveis categóricas. A mediana (interquartil 25% - 75%) foi calculada para variáveis contínuas com distribuição não normal. Comparações entre os parâmetros dos pacientes e controles foram realizadas através do teste de *t*-Student ou teste de Mann-Whitney para variáveis contínuas, enquanto o teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher foi utilizado para avaliar variáveis categóricas. A correlação (*rho*) entre os parâmetros foi analisada por correlação de Spearman. Valores de $P < 0,050$ foram considerados significantes. Todas as análises foram realizadas com o software de estatística SPSS 15.0 (Chicago, EUA).

4. Resultados

Foram avaliados 48 pacientes consecutivos com DM e 48 controles. A média de idade, raça e gênero foram similares em ambos os grupos (**Tabela 1**).

A idade no início da doença foi de 30,9 anos, com a mediana de duração entre o diagnóstico e o início dos sintomas de cinco meses, e a duração média da doença de um ano.

O envolvimento articular, pulmonar e cutâneo estava presente, respectivamente, em 29,2%, 35,4% e 100,0% dos casos.

Os parâmetros da atividade de doença também estão mostrados na **Tabela 1**.

Em relação ao tratamento medicamentoso, no momento da coleta de sangue, 70,8% dos pacientes estavam utilizando prednisona, com uma média de 20,0 mg/dia. A dose cumulativa mediana de todos os pacientes foi de 645 mg (nos últimos três meses da coleta de sangue) e de 15,5 g (desde o início dos sintomas da doença). Aproximadamente metade dos pacientes estava em uso de pelo menos um imunossupressor ou imunomodulador: azatioprina (2-3 mg/kg/dia), metotrexato (15-25 mg/semana), ciclosporina (1,5-2,5 mg/kg/dia), micofenolato de mofetila (2-3 g/dia), rituximabe (anti-CD20), ciclofosfamida (0,8 g/m² superfície corpórea), leflunomida (20 mg/dia) e/ou imunoglobulina intravenosa humana (2 g/kg, 1 x/dia, 2 dias consecutivos) (**Tabela 1**).

Os níveis séricos das citocinas angiogênicas estão mostrados na **Tabela 2**. Os níveis séricos de FGF-1 e FGF-2 se apresentaram aumentados na maioria dos pacientes com DM quando comparados aos do grupo controle, enquanto os níveis de VEGF e PDGF-AA se apresentaram diminuídos. Apesar de alguns pacientes individualmente apresentarem valores elevados, os níveis de ANG, ANGPT1 e PDGF-BB não mostraram diferença significativa com os controles.

TABELA 1 - Características gerais dos pacientes com dermatomiosite e indivíduos saudáveis.

Parâmetros	Controle (n=48)	DM (n=48)	P
Idade (anos)	35,8±8,2	33,3±7,6	1,000
Cor branca	32 (66,7)	36 (75,0)	0,501
Gênero feminino	36 (75,0)	36 (75,0)	1,000
Idade no início da doença (anos)	-	30,9±7,4	-
Duração: sintomas - diagnóstico (meses)	-	5,0 (2,3-8,5)	-
Tempo de doença (anos)	-	1 (0-4)	-
Manifestações clínicas cumulativas			
Envolvimento articular	-	14 (29,2)	-
Envolvimento pulmonar	-	17 (35,4)	-
Envolvimento cutâneo	-	48 (100,0)	-
Pápulas de Gottron	-	47 (97,9)	-
Heliótopo	-	40 (83,3)	-
Fotosensibilidade	-	30 (62,5)	-
Fenômeno de Raynaud	-	24 (50,0)	-
Sinal "V do decote"	-	15 (31,3)	-
Úlceras	-	10 (20,8)	-
Vasculite	-	10 (20,8)	-
Sinal do "xale"	-	8 (16,7)	-
Calcinose	-	0	-
MMT-8 (0-80)	-	78 (71-80)	-
HAQ (0,00-3,00)	-	0,36 (0,00-2,00)	-
EVA paciente (0-10 cm)	-	5 (1-6)	-
EVA médico (0-10 cm)	-	4 (1-5)	-
MYOACT (0-60)	-	2,5 (0,0-8,8)	-
Creatinofosfoquinase (U/L)	100 (81-161)	200 (93-960)	0,002
Aldolase (U/L)	3,6 (3,1-4,3)	5,9 (4,1-12,9)	<0,001
Desidrogenase láctica (U/L)	323 (296-381)	412 (347-597)	<0,001
Alanina aminotransferase (U/L)	17 (13-21)	25 (16-60)	<0,001
Aspartato aminotransferase (U/L)	19 (16-22)	25 (19-52)	<0,001
Prednisona			
Uso atual	-	34 (70,8)	-
Dose atual (mg/dia)	-	20,0 (3,1-50,0)	-
Dose cumulativa* (mg)	-	645 (90-2103)	-
Dose cumulativa** (g)	-	15,5 (5,8-27,8)	-
Imunossuppressores/imunomoduladores***			
Nenhum	-	20 (41,7)	-
Um	-	11 (22,9)	-
Dois	-	17 (35,4)	-

Resultados expressos em média ± desvio padrão, mediana (interquartil 25%- 75%) ou porcentagem (%).

DM: dermatomiosite; EVA: escala visual analógica; HAQ: *Health Assessment Questionnaire*; MMT: *Muscle Manual Testing*; MYOACT: *Myositis Disease Activity Assessment Visual Analogue Scales*.

* Últimos 3 meses; ** Desde o início do tratamento; *** Imunossuppressores/imunomoduladores: azatioprina (2-3 mg/kg/dia), metotrexato (15-25 mg/semana), ciclosporina (1,5-2,5 mg/kg/dia), micofenolato de mofetil (2-3 g/dia), rituximabe, ciclofosfamida (0,8 g/m² superfície corpórea), leflunomida (20 mg/dia) e/ou imunoglobulina humana intravenosa (2 g/kg, 1x/dia, dois dias consecutivos).

Tabela 2 - Nível sérico de citocinas angiogênicas de pacientes com dermatomiosite e indivíduos saudáveis.

Parâmetros	DM	Controle	P
------------	----	----------	---

	(n=48)	(n=48)	
Nível sérico			
ANG (ng/mL)	4383 (3588-7251)	3931 (2735-5397)	0,138
ANGPT-1 (ng/mL)	8576 (4964-13060)	8080 (5785-9609)	0,224
VEGF (ng/mL)	28,6 (5,8-49,3)	38,6 (21,3-72,6)	0,009
FGF-1 (ng/mL)	3,1 (1,8-14,9)	0,7 (0,4-1,8)	<0,001
FGF-2 (ng/mL)	1,6 (0,6-3,1)	0,3 (0,0-0,9)	<0,001
PDGF-AA (ng/mL)	545 (304-797)	654 (411-1083)	0,022
PDGF-BB (ng/mL)	2039 (1539-2506)	2107 (1752-2465)	0,358

Resultados expressos em mediana (interquartil 25%- 75%).

DM: dermatomiosite; ANG: *angiogenin*; ANGPT-1: *angiopoietin-1*; VEGF: *vascular endothelial growth factor*; FGF: *fibroblast growth factor*; PDGF: *platelet-derived growth factor*.

A **Tabela 3** mostra as correlações significativas encontradas entre as citocinas angiogênicas e os diversos parâmetros clínicos, laboratoriais e terapêuticos analisados nos pacientes com DM do presente estudo.

Os níveis séricos de FGF-1 apresentaram moderada correlação positiva com manifestações clínicas cutâneas (fotossensibilidade, sinal "V do decote" e sinal "xale"), bem como alguns parâmetros de atividade de doença (EVA paciente e médico, MYOACT e enzimas musculares) e tiveram correlação inversa com o tempo de doença e a dose cumulativa de prednisona utilizada como tratamento. Além disso, os níveis séricos de FGF-1 correlacionaram-se positivamente com os de ANG, ANGPT-1 e PDGF-AA e negativamente com os níveis de FGF-2.

Houve uma tendência de correlação negativa dos níveis de FGF-2 com os parâmetros de atividade de doença (EVA médico, MMT-8 e enzimas musculares) e com os níveis séricos de FGF-1, ANG, ANGPT-1, PDGF-AA e PDGF-BB. Uma correlação positiva foi encontrada entre os níveis de FGF-2 e a dose cumulativa de prednisona.

Os níveis séricos de PDGF-AA e VEGF foram baixos nos pacientes com DM. Não foi encontrada correlação entre os níveis de VEGF e parâmetros de atividade de doença ou dados relacionados ao tratamento. No entanto, os valores de PDGF-AA e FGF-1 apresentaram uma correlação positiva com os parâmetros de atividade de doença (EVA médico, MMT-8, MYOACT, HAQ e enzimas musculares) e correlação negativa com o tempo de doença e a dose cumulativa de prednisona. Também foi observada uma correlação positiva entre PDGF-AA e os níveis séricos de ANG, ANGPT-1 e PDGF-BB e uma correlação negativa com FGF-2.

ANG, ANGPT-1 e PDGF-BB não estavam elevados em DM. No entanto, as correlações entre os níveis séricos dessas citocinas e os demais parâmetros, em geral, seguiram o mesmo perfil observado para FGF-1 e PDGF-AA.

Tabela 3 - Correlação de Spearman entre as citocinas angiogênicas e diferentes parâmetros de doença.

	ANG	ANGPT-1	FGF-1	FGF-2	VEGF	PDGF-AA	PGGF-BB
Idade atual		0,289 0,018				0,399 0,018	
Idade no início da doença		0,401 0,005	0,295 0,042			0,416 0,003	
Tempo de doença		-0,448 0,001	-0,394 0,006			-0,326 0,024	-0,411 0,004
Índice de massa corporal					0,317 0,028		
Envolvimento pulmonar	0,435 0,009						
Fotossensibilidade	0,387 0,021		0,367 0,010				
Sinal "V do decote"			0,338 0,019				
Sinal do "xale"		0,355 0,013	0,343 0,017				
EVA paciente	0,410 0,014	0,326 0,024	0,351 0,014	-0,364 0,012			
EVA médico	0,476 0,004	0,387 0,007	0,341 0,018	-0,385 0,007		0,324 0,025	
MMT-8		-0,470 0,001	-0,245 0,094	-0,413 0,004		-0,457 0,001	-0,0382 0,008
MYOACT	0,545 0,001	0,483 0,001	0,328 0,023			0,356 0,013	
HAQ		0,400 0,005				0,338 0,019	
Creatinofosfoquinase		0,315 0,035					
Aldolase		0,537 <0,001	0,397 0,009	-0,344 0,028		0,469 0,002	0,478 0,002
Desidrogenase láctica			0,339 0,023				
Aspartato aminotransferase			0,429 0,004	-0,398 0,008		0,363 0,016	0,324 0,034
Alanina aminotransferase			0,379 0,010				
Azatioprina							
Ciclosporina		-0,309 0,032					
Prednisona (uso atual)		0,463 0,001	0,342 0,017			0,478 0,001	0,510 <0,001
Prednisona (cumulativa**)		-0,0390 0,006	-0,399 0,005	0,301 0,040		-0,315 0,029	
ANG	1,000	0,366 0,001	0,512 <0,001	-0,594 <0,001		0,408 0,004	
ANGPT-1	0,360 0,034	1,000	0,502 <0,001	-0,453 0,001		0,820 <0,001	0,725 <0,001
FGF-1	0,344 0,034	0,502 <0,001	1,000	-0,376 0,009		0,437 0,002	
FGF-2		-0,543 0,001	-0,0376 0,009	1,000		-0,459 0,001	-0,391 0,007
VEGF					1,000		
PDGF-AA		0,820 <0,001	0,437 0,002	-0,459 0,001		1,000	0,720 <0,001
PDGF-BB		0,725 <0,001		-0,391 0,007		0,720 <0,001	1,000

ANG: *angiogenin*; ANGPT: *angiopoietin*; EVA: escala visual analógica; FGF: *fibroblast growth factor*; HAQ: *Health Assessment Questionnaire*; MMT: *Muscle Manual Testing*; MYOACT: *Myositis Disease Activity Assessment Visual Analogue Scales*; VEGF: *vascular endothelial growth factor*; PDGF: *platelet-derived growth factor-AA and BB*.

** Desde o início do tratamento.

5. Discussão

Este estudo é o primeiro a analisar sistemática e simultaneamente os níveis séricos de várias citocinas angiogênicas em pacientes com DM. Níveis elevados de FGF-1 e FGF-2, reduzidos de VEGF e PDGF-AA, semelhantes de ANG, ANGPT-1 e PDGF-BB foram observados no soro de pacientes com DM em comparação com o grupo controle. Análises adicionais mostraram uma correlação positiva entre os níveis de FGF-1, ANG, ANGPT-1 e PDGF-AA com os parâmetros de atividade da doença, enquanto os níveis de FGF-2 mostraram uma correlação inversa. Além disso, os níveis de FGF-1 correlacionaram-se significativamente com as manifestações cutâneas da DM.

A grande vantagem do presente estudo foi o uso de rigorosos critérios de seleção de pacientes, incluindo expressivas amostras sanguíneas de DM, que foram pareados por idade, gênero e etnia com um grupo controle. Além disso, excluímos fatores de confusão que poderiam interferir na avaliação e interpretação das citocinas angiogênicas (através de variações hormonais, relações com mecanismos inflamatórios e angiogênicos e de tratamento), tais como: idade avançada, menopausa, tabagismo, diabetes, fatores de risco de doença cardiovascular, DM crônica e tratamento a longo prazo.

Foram observados neste estudo níveis séricos elevados de FGF-1 e FGF-2 em pacientes com DM. A FGF-1 apresentou uma correlação positiva com as manifestações clínicas cutâneas e alguns parâmetros de atividade de doença, em contraste com os resultados encontrados com FGF-2. Também observamos menores níveis de FGF-1 nos pacientes com mais tempo de doença e maior dose cumulativa de glicocorticoide, ao contrário de FGF-2.

Vários estudos *in vitro* e *in vivo*, em animais e humanos, têm mostrado os

efeitos de FGF-1 e -2 em diversos processos celulares como proliferação (Dignass *et al.*, 1994; Holland e Varmus, 1998; Murphy *et al.*, 1990), migração (Hossain e Morrest, 2000) e diferenciação (Peters *et al.*, 1992), além do seu papel na angiogênese, através da indução de proliferação celular e organização física das células endoteliais em estruturas tubulares. Ambos são fatores angiogênicos mais potentes que VEGF ou PDGF (Yun *et al.*, 2010).

Tanto FGF-1 quanto FGF-2 são altamente liberados por macrófagos e células endoteliais danificadas em locais de feridas e, quando a atividade de FGF-2 é bloqueada, a angiogênese nas feridas é quase completamente comprometida (Broadley *et al.*, 1989).

A abundante concentração de FGFs encontrada em áreas de músculos em regeneração (Guthridge *et al.*, 1992; Lefaucheur e Seville, 1995), exemplifica a ação dessas citocinas no processo de regeneração muscular. Em modelos de cultura de miofibrilas foi demonstrado que a FGF-2 promove o recrutamento de células satélites do músculo esquelético (Yablonka-Reuveni *et al.*, 1999) e os níveis dessa citocina e seus receptores *in vivo* aumentam após uma semana de lesão tendínea (Chang *et al.*, 1998), o que mostra o papel significativo de FGF-2 no recrutamento de células progenitoras, diferenciação e processo de regeneração.

Devido às suas funções e funções biológicas específicas, os FGFs têm potencial para aplicação na indução de regeneração de um amplo espectro de tecidos, incluindo pele, vasos sanguíneos, músculo, tecido adiposo, tendão / ligamento, cartilagem, osso, dente e tecidos nervosos (Chang *et al.*, 1998).

Ao combinar essas ações conhecidas de FGF com nossos achados, propomos que FGF-1 possa estar envolvida na fisiopatogênese de manifestações cutâneas de

pacientes com DM ativa, pois pacientes com mais lesões cutâneas, menor tempo de doença ou de tratamento apresentam altos níveis de FGF-1 sérico. Estudos adicionais de biópsias cutâneas para avaliar níveis locais de FGF-1 ou sua expressão gênica poderiam corroborar essa hipótese.

Observamos uma correlação negativa entre o nível sérico de FGF-2 e os parâmetros da atividade da doença e uma correlação positiva com a dose cumulativa de glicocorticoide. Uma possibilidade para tal achado dá-se ao fato dos níveis de FGF-1 e FGF-2 estarem continuamente sendo liberados na corrente sanguínea pelo tecido muscular e endotelial devido a necrose miofibrilar que ocorre nos pacientes com DM em atividade e devido a potente ação de cura e regeneração de FGF-2, seus níveis permaneceriam elevados mesmo após o início e manutenção do processo de cicatrização e fibrose muscular que ocorrem durante a evolução da doença ou com seu tratamento, o que tornaria o FGF-2 um marcador do processo de cicatrização muscular nesses pacientes.

Encontramos um padrão inverso de correlação entre FGF-1 e -2 e as outras citocinas angiogênicas avaliadas. O FGF-1 teve uma correlação positiva com a maioria dessas citocinas, enquanto o FGF-2 apresentou em geral uma correlação negativa, incluindo o FGF-1. Como o FGF-2 é um importante agente responsável pela cicatrização muscular em pacientes com DM e o FGF-1 estaria envolvido com a fisiopatogênese da manifestação cutânea aguda, concluímos que existem mecanismos de autorregulação entre FGF-1 e o FGF-2 durante a os diferentes estágios da progressão da doença com uma contra-regulação mais estabelecida em fases crônicas ou adequadamente tratadas.

Em doenças autoimunes, níveis séricos aumentados de FGF-2 foram encontrados em pacientes com esclerose sistêmica, lúpus eritematoso sistêmico e DM (Kadono *et al.*, 1996). Foram avaliados 33 pacientes com DM (incluindo primária, juvenil e associada à neoplasia), com média de idade de 50 anos e virgens de tratamento, tendo sido observado o aumento significativo em 7 pacientes quando comparados ao grupo controle. Também foi encontrado aumento significativo do nível de creatinofosfoquinase nesses pacientes, além de correlação com fibrose pulmonar associada. O presente estudo também encontrou níveis aumentados desta citocina no sangue de pacientes com DM, porém sem correlação significativa com os quadros de atividade pulmonar associada. Apesar de não ter sido encontrada significância estatística com os valores de creatinofosfoquinase, encontramos relevância dos níveis de FGF-2 com outros marcadores de lesão muscular, como aldolase e aspartato aminotransferase.

Nosso estudo observou baixos níveis séricos de PDGF-AA e VEGF em pacientes com DM. Contudo, apenas o nível de PDFG-AA correlacionou-se positivamente com outros parâmetros da doença. Até o presente momento, não há relatos na literatura avaliando os níveis sérico de PDGF-AA e -BB em DM.

PDGF é produzido por plaquetas, monócitos, células endoteliais, células de músculo liso vascular e fibroblastos. Formam homo/heterodímeros: PDGF-AA, -AB, -BB, -CC e -DD que exercem seus efeitos celulares se ligando a receptores tirosina quinases (PDGF-R) α e β . PDGF-AA se liga especificamente a PDGF-R $\alpha\alpha$ enquanto que PDGF-BB se liga a PDGF-R $\alpha\alpha$, -R $\beta\beta$ e -R $\alpha\beta$ (Heldin, 2013). Mais frequentemente, PDGF-R β mediam sinais mitóticos e quimiotáticos positivos enquanto PDGF-R α pode mediar tanto sinais positivos quanto negativos a depender do tipo celular estimulado

e concentrações de citocinas (Heldin, 2013).

Atuando em uma fase mais tardia da angiogênese, essas citocinas promovem a maturação dos vasos sanguíneos através do recrutamento e adesão de células murais, moduladas pela interação com outros fatores de crescimento, bem como pela interação específica com PDGF- $R_{\alpha\alpha}$ e - $R_{\beta\beta}$ (Tengood et al, 2011). Dessa forma, PDGF pode tanto promover quanto inibir a quimiotaxia e crescimento celular.

Considerando que a interação de PDGF-AA com seu receptor pode ter efeitos angiogênicos e angiostáticos e que a família PDGF atua na fase final da angiogênese, tais resultados reforçam que a atuação desta citocina também dependa do contexto no qual está inserida.

Neste estudo, as correlações entre os níveis de PDGF-AA e os parâmetros clínicos e laboratoriais nos casos DM apresentaram o mesmo padrão que as de FGF-1 com a exceção das manifestações cutâneas. Através de mecanismos ainda não conhecidos, FGF-1 induz a expressão de PDGF-AA em células endoteliais (Delbridge e Khachigian, 1997). Assim, na DM ativa, essas citocinas podem interagir de uma forma sinérgica para potencializar suas ações angiogênicas através da interação de seus receptores, como PDGF- $R_{\alpha\alpha}$ e seus sinais mitóticos positivos.

Por ser importante citocina relacionada à angiogênese e inflamação, níveis séricos aumentados de VEGF vêm sendo documentados em várias doenças autoimunes, como esclerose sistêmica, lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide, artrite psoriásica, doença de Behçet, DM e polimiosite (Grundtman *et al.*, 2008; Kikuchi *et al.*, 1998; Yuan *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2015).

A origem do VEGF sérico ainda não está bem definida, podendo provir de plaquetas (Mohle *et al.*, 1997), células inflamatórias (Kimura *et al.*, 2007) ou endoteliais (Cipriani *et al.*, 2007).

A fibra muscular é uma potencial fonte de VEGF como observado pela detecção de mRNA e expressão proteica tanto em pacientes saudáveis (Brutsaert *et al.*, 2002; Gustafsson *et al.*, 2002) quanto com DM (Grundtman *et al.*, 2008; Volpi *et al.*, 2013). A expressão constitutiva de VEGF pelos miócitos se mostra essencial para a regulação da capilaridade e, em pessoas idosas, a redução da densidade de capilares no endomísio está associada com uma redução local de VEGF (Olfert *et al.*, 2009; Ryan *et al.*, 2006). Já foi verificado que em fases iniciais ou tardias crônicas e tratadas da DM pode-se encontrar uma redução do número de capilares no tecido muscular. Em pacientes com diagnóstico precoce e sem infiltrado inflamatório celular abundante em biópsias, foram encontradas muitas fibras musculares expressando VEGF comparadas com indivíduos saudáveis (Grundtman *et al.*, 2008). Acredita-se, portanto, que os níveis elevados de VEGF no músculo nesses casos estejam relacionados com a hipóxia do tecido muscular ocasionada pela diminuição da eficiência capilar e modificações fenotípicas das células endoteliais, ocasionando mudanças metabólicas que contribuiriam para a fadiga muscular nesses pacientes (Grundtman *et al.*, 2008; Olsen e Park, 1995, 1997).

Uma explicação possível para o nível sérico reduzido de VEGF no presente estudo seria a de que a casuísta de pacientes com DM se encontrava na sua maioria em uma fase inicial da doença e com tratamento eficiente já instituído, levando a redução de infiltrados inflamatórios e uma eficiência capilar mais bem estabelecida. Outra provável hipótese seria que a produção desta citocina inicialmente ocorresse e

se concentrasse nos locais de maior inflamação, como músculo e pele sem a necessidade de um transporte sanguíneo. Sendo assim, a mensuração local de VEGF nesses tecidos e a análise da sua expressão gênica são necessárias em estudos futuros.

O estudo de Kikuchi *et al.* (1998) havia identificado níveis de VEGF aumentados em pacientes com DM quando comparados com pessoas saudáveis, nesta ocasião a maioria dos doentes eram mulheres, tinham uma média de idade de 46 anos e não estavam em uso de tratamento específico no momento da coleta de sangue, porém não há registo do tempo de doença e dos tratamentos prévios realizados.

Grundtman *et al.* (2008) avaliaram os níveis séricos e a expressão em tecido muscular de VEGF em pacientes com DM e comparou com controles sadios. Este estudo, mais elaborado, dividiu os pacientes em grupos com pouca atividade inflamatória, muita atividade inflamatória sem e com tratamento após 3 - 6 meses e pacientes crônicos. Os pacientes com DM de todos os grupos apresentaram níveis médios de VEGF significativamente maiores dos que os controles sadios e os pacientes tratados apresentaram redução nos níveis quando comparados aos não tratados.

Os níveis séricos de PDGF-BB, ANG e ANGPT-1 foram similares entre os casos DM e o grupo controle. No entanto, quando analisamos apenas os pacientes com DM e correlacionamos com os parâmetros da doença, encontramos relações semelhantes às de FGF-1.

Como discutido acima, os PDGFs interagem com receptores específicos. A afinidade por todos os heterodímeros de PDGF-R que PDGF-BB apresenta, bem como sua relação de ativação/inibição com outras citocinas, podem explicar a não

alteração nos níveis desta citocina no grupo estudado. Vale ressaltar, que o perfil de citocinas encontrado neste estudo mostra um aumento significativo de FGF-2 nos pacientes, o que pode ter efeitos inibitórios no PDGF (especialmente no PDGF-BB).

Estudos sugerem que a relação entre PDGF e FGF-2 ocorra através da amplificação intracelular de sinais inibitórios dos PDGFR α após uma cascata de eventos ativados pela fosforilação de receptores de FGF-2 (Chaudhary, 1998; Facchiano *et al*, 2000). Estudos realizados *in vitro* e *in vivo* mostram que PDGF-BB pode inibir os efeitos angiogênicos de FGF-2 (De Marchis *et al*, 2002), porém também já foi relatado efeito inibitório de FGF-2 em PDGF-BB em estudos *in vitro* utilizando células de músculo liso de aorta de ratos (Facchiano *et al*, 2000). Ambos os efeitos estariam relacionados com a interação direta (ligação de PDGF) ou indireta (estímulo a amplificação de sinais) dessas duas citocinas com o PDGF-R α e seus sinais inibitórios nas células de músculo liso (Bonner *et al*, 1996; Schollmann *et al*, 1992).

Mesmo não tendo significância estatística com os casos saudáveis, os níveis de PDGF-BB quando comparados com outros parâmetros, epidemiológicos, clínicos e laboratoriais dos pacientes com DM, mostra relações significantes similares àquelas encontradas nas demais citocinas estudadas o que reforça o papel desta citocina no processo de angiogênese na regeneração muscular.

A molécula de ANG primeiro se liga a actina e, em seguida, o complexo actina-angiogenina se dissocia da superfície celular para ativar o fator ativador de plasminogênio tecidual que origina a plasmina. Esta, por sua vez, degrada a matriz da membrana basal que é o pré-requisito para migração celular durante a neovascularização (Hu e Riordan, 1993; Lyons *et al*, 1990). Alterações de injúria

endotelial, aumento de ectasia vascular e redução de densidade de plexos vasculares são descritos em biópsias cutâneas de pacientes com DM ativa (Crowson e Magro, 1996). Alterações histopatológicas de biópsias musculares de pacientes, como dito anteriormente, apresentam em geral infiltrado perivascular de linfócitos T CD4+ e macrófagos, além da redução do tamanho de vasos e perda endotelial (Arahata e Engel, 1984; Pestronk *et al.*, 2010).

Apenas um estudo avaliou os níveis séricos de ANG em pacientes com DM (Kuwahara, 2012) e também não encontrou diferença significativa nos níveis de ANG entre os grupos. No entanto, os autores observaram um aumento de expressão gênica de ANG nas biópsias de pele dos pacientes analisados. Esses resultados podem ser explicados pela ação constante de ANG nos mecanismos que suportam a degradação da matriz e a migração celular durante as fases aguda e crônica da inflamação, localmente no músculo ou na pele, o que sugere um controle *in situ* de atividade inflamatória maior do que um controle sistêmico.

Da mesma forma, a ligação de ANGPT-1 com receptores específicos em células endoteliais promove a sinalização regulatória para a manutenção da quiescência vascular e a promoção da angiogênese. ANGPT-1 é produzida primariamente por células de suporte peri-endotelial como periócitos e células musculares lisas vasculares (Davis *et al.*, 1996). Em um vaso quiescente com células endoteliais em contato, ANGPT-1 induz a trans-associação dos receptores Tie2 de duas células adjacentes que leva a ativação tanto de vias que inibem a inflamação/angiogênese contribuindo para a maturação vascular, quanto promovem apoptose e remodelamento vascular (Fukuhara *et al.*, 2010). ANGPT-1 sofre também o efeito do VEGF na adesão leucocitária ao endotélio por inibir a expressão de algumas

moléculas específicas de adesão celular (Kim *et al.*, 2001).

A ligação de ANGPT-1/Tie2 também favorece a angiogênese. Em processos como o de isquemia tecidual, há uma grande liberação de VEGF que promove a separação das células endoteliais das células murais e o rompimento das células de adesão inter-endoteliais. Na ausência de contato endotelial célula a célula, ANGPT-1 é capaz de se ligar a matriz extracelular, ancorando a célula endotelial neste meio através de seu receptor Tie2. Essa ligação fosforila e ativa as vias intracelulares responsáveis pela migração e proliferação celular (Fukuhara *et al.*, 2010).

Um antagonista importante da ANGPT-1 é a ANGPT-2, que é produzida por células endoteliais em condições de hipóxia desestabilizando os vasos sanguíneos (Fukuhara *et al.*, 2010) e favorecendo angiogênese independente de VEGF.

Como a ANGPT-1 exerce tanto efeitos angiogênicos quanto angiostáticos, a depender do contexto inserido além de sua relação anti-inflamatória relacionada ao VEGF, seus níveis podem ser autorregulados de uma maneira mais harmônica em processos inflamatórios, além do que pode sofrer efeito de fatores inibidores como a ANGPT-2 favorecendo para que seus níveis séricos permanecessem similares ao de pessoas saudáveis, como mostram os nossos resultados.

Ishikawa *et al.* (2011) analisaram o nível sérico de ANGPT-1 em pacientes com artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, esclerose sistêmica, polimiosite e DM, e encontrou aumento significativo desta citocina apenas em pacientes com artrite reumatoide. No presente estudo também não foi observado aumento significativo dos níveis de ANGPT-1 séricos em pacientes com DM.

Não podemos excluir a possibilidade do tratamento imunossupressor de longa data ter algum efeito nos níveis das citocinas estudadas, visto que houve uma

relação negativa entre os pacientes com mais tempo de doença (portanto mais tratados) e os níveis séricos de algumas citocinas, contudo mesmo com essa constatação, quando comparados a pacientes saudáveis, os níveis séricos permanecem elevados e não houve significância estatística entre os valores aumentados em pacientes tratados ou não no momento da coleta do exame.

Considerando que as citocinas com os maiores níveis séricos avaliados neste trabalho foram FGF-1 e FGF-2 (que estão relacionadas à degradação da matriz celular, migração, crescimento, diferenciação celular e cicatrização) e as correlações (negativa e positiva) dos níveis dessas citocinas com o tratamento recebido, não podemos excluir a possibilidade de o tratamento imunossupressor ter influenciado nos resultados ao interferir nos processos inflamatórios e angiogênicos.

Dentre as limitações do estudo, pode-se citar: (a) o estudo foi transversal e a análise do nível sérico das citocinas foi realizada em apenas uma medição, sendo assim o perfil das mesmas pode ter mudado durante a evolução da doença, conforme o tratamento instituído; (b) pacientes provenientes de um centro terciário de atendimento e, portanto, constituindo uma amostragem de pacientes muita das vezes com diagnóstico firmado e tratamentos já instituídos.

Em resumo, encontramos um aumento nos níveis séricos de FGF-1 e FGF-2, uma diminuição nos níveis de VEGF e PDGF-AA e níveis ANG, ANGPT-1 e PDGF-BB comparáveis em pacientes com DM e controles saudáveis. Os níveis de FGF-1, PDGF-AA, ANG e AGPT-1 mostraram uma correlação positiva com parâmetros de atividade de doença, em contraste aos níveis de FGF-2. Além disso, FGF-1 e FGF-2 correlacionaram-se positivamente com as manifestações cutâneas de DM e a dose cumulativa de glicocorticoide, respectivamente. Esses dados reforçam a relevância da

vasculopatia e apoiam o possível envolvimento de citocinas angiogênicas na fisiopatologia da DM. Estudos adicionais serão necessários para validar os dados obtidos no presente estudo.

6. Conclusões

1. O presente estudo mostrou um aumento significativo no nível sérico de FGF-1 e FGF-2 e reduzido de VEGF e PDGF-AA em pacientes com DM, entretanto, não houve variação do nível sérico de ANG, ANGPT-1 e PDGF-BB.
2. Os níveis de FGF-1, PDGF-AA, ANG e AGPT-1 mostraram uma correlação positiva com parâmetros de atividade de doença, em contraste aos níveis de FGF-2. Além disso, FGF-1 e FGF-2 correlacionaram-se positivamente com as manifestações cutâneas de DM e a dose cumulativa de prednisona.

7. Referências

- Almeida PM, Wicherhause W. Critério de classe econômica da Associação Brasileira de Anunciantes (ABA) e Associação Brasileira dos Institutos de Pesquisa de Mercado (ABIPEME). In. Almeida PM, Wickerhauser W editors. O Critério ABA / ABIPEME, ABIPEME (São Paulo), p. 1-29, 1991.
- Andrae J, Gallini R, Besholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. **Genes Dev.** 22(10): 1276-312, 2008.
- Arahata K, Engel AG. Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. I: Quantitation of subsets according to diagnosis and sites of accumulation and demonstration and counts of muscle fibers invaded by T cells. **Ann Neurol.** 16(2): 193-208, 1984.
- Bates DO. Vascular endothelial growth factors and vascular permeability. **Cardiovasc Res.** 82(2): 262-71, 2010.
- Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology. pathophysiology and therapy. **Nat Rev Drug Discov.** 8(3): 235-53, 2009.
- Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). **N Engl J Med.** 292(7): 344-7, 1975a.
- Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts). **N Engl J Med.** 292(8): 403-7, 1975b.
- Bond MD, Strydom DJ, Vallee BL. Characterization and sequencing of rabbit, pig and mouse angiogenins: Discernment of functionally important residues and regions. **Biochim Biophys Acta.** 1162(1-2): 177-86, 1993.
- Bonner JC, Badgett A, Lindroos PM, Coin PG. Basic fibroblast growth factor induces expression of the PDGF receptor- α on human bronchial smooth muscle cells. **Am J Physiol.** 271: 880-888, 1996.
- Botet JC, Grau JM, Casademont J, Urbano-Márquez A, Rozman C. Characterization of mononuclear exudates in idiopathic inflammatory myopathies. **Virchows Arch Pathol Anat Histopathol.** 412(4): 371-4, 1988.
- Broadley KN, Aquino AM, Kicks B, Ditesheim JA, McGee GS, Demetriou AA, Woodward SC, Davidson JM. The diabetic rat as an impaired wound healing model: stimulatory effects of transforming growth factor-beta and basic fibroblast growth factor. **Biotechnol Ther.** 1(1): 55-68, 1989.

- Bruce B, Fries JF. The Stanford Health Assessment Questionnaire: dimensions and practical applications. **Health Qual Life Outcomes**. 1: 20, 2003.
- Brutsaert TD, Gavin TP, Fu Z, Breen EC, Tang K, Mathieu-Costello O, Wagner PD. Regional differences in expression of VEGF mRNA in rat gastrocnemius following 1 hour exercise or electrical stimulation. **BMC Physiol**. 2: 8, 2002.
- Burgmann H, Hollenstein U, Maca T, Zedwitz-Liebenstein K, Thalhammer F, Koppensteiner R, Ehringer H, Graninger W. Increased serum laminin and angiogenin concentrations in patients with peripheral arterial occlusive disease. **J Clin Pathol**. 49(6): 508-10, 1996.
- Butt C, Lim S, Greenwood C, Rahman P. VEGF, FGF1, FGF2 and EGF gene polymorphisms and psoriatic arthritis. **BMC Musculoskelet Disord**. 8: 1, 2006.
- Chang J, Most D, Thunder R, Mehrara B, Longaker MT, Lineaweaver WC. Molecular studies in flexor tendon wound healing: the role of basic fibroblast growth factor gene expression. **J Hand Surgery**. 23(6): 1052-8, 1998.
- Chaudhary LR, Avioli LV. Identification and activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in normal human osteoblastic and bone marrow stromal cells: attenuation of MAP kinase activation by cAMP, parathyroid hormone and forskolin. **Mol Cell Biochem**. 178(1-2): 59-68, 1998.
- Cipriani P, Guiducci S, Miniati I, Cinelli M, Urbani S, Marrelli, Dolo V, Pavan A, Saccardi R, Tyndall A, Giacomelli R, Cerinic MM. Impairment of endothelial cell differentiation from bone marrow-derived mesenchymal stem cells: new insight into the pathogenesis of systemic sclerosis. **Arthritis Rheum**. 56(6): 1994-2004, 2007.
- Craig CL, Marschall AL, Sjöström M, Bauman AE, Booth ML, Ainsworth BE, Pratt M, Ekelund U, Ungve A, Sallis JF, Oja P. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. **Med Sci Sports Exerc**. 35(8): 1381-95, 2003.
- Crowson AN, Magro CM. The role of microvascular injury in the pathogenesis of cutaneous lesions of dermatomyositis. **Hum Pathol**. 27(1): 15-9, 1996.
- Cui Q, Dighe AS, Irvine JN. Combined angiogenic and osteogenic factor delivery for bone regenerative engineering. **Curr Pharm Des**. 19(9): 3374-83, 2013.
- Dalakas MC. The future prospects in the classification, diagnosis and therapies of inflammatory myopathies: a view to the future from the "bench-to-bedside". **J Neurol**. 251(6): 651-7, 2004.

Dalakas MC. Inflammatory muscle diseases. **N Engl J Med.** 373(4): 1734-47, 2015.

D'Alessio G. New and cryptic biological messages from RNases. **Trends Cell Biol.** 4: 106-9, 1993.

Davies CA, Jeziorska M, Freemont AJ, Herrick AL. The differential expression of VEGF. VEGFR-2 and GLUT-1 proteins in disease subtypes of systemic sclerosis. **Hum Pathol.** 37(2): 190-7, 2006.

Davis S, Aldrich TH, Jonves PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor by secretion-trap expression cloning. **Cell.** 87(7): 1161-9, 1996.

De Marchis F, Ribatti D, Giampietri C, Lentini A, Faraone D, Scoccianti M, Capogrossi MC, Facchiano A. Platelet-derived growth factor inhibits basic fibroblast growth factor angiogenic properties in vitro and in vivo through its α receptor. **Blood.** 99(6): 2045-52, 2002.

Delbridge GJ, Khachigian, LM. FGF-1 induced platelet-Derived Growth Factor-A chain gene expression in endothelial cells involves transcriptional activation by early growth response factor-1. **Circ Res** 81: 282-8, 1997.

Dignass AU, Tsunekawa S, Podolsky DK. Fibroblast growth factors modulate intestinal epithelial cell growth and migration. **Gastroenterol.** 106(5): 1254-62, 1994.

Dimachkie MM, Barohn RJ, Amato A. Idiopathic inflammatory myopathies. **Neurol Clin.** 32(3): 595-628, 2014.

Distler O, Distler JH, Scheid A, Acker T, Hirth A, Rethage J, Michel BA, Gay RE, Müller-Ladner U, Matucci-Cerinic M, Plate KH, Gassmann M, Gay S. Uncontrolled expression of vascular endothelial growth factor and its receptors leads to insufficient skin angiogenesis in patients with systemic sclerosis. **Circ Res.** 95(1): 109-16, 2004.

Emslie-Smith AM, Engel AG. Microvascular changes in early and advanced dermatomyositis: a quantitative study. **Ann Neurol.** 27(4): 343-56, 1990.

Engel AG, Arahata K. Mononuclear cells in myopathies: quantitation of functionally distinct subsets, recognition of antigen specific cell-mediated cytotoxicity in some diseases. and implications for the pathogenesis of the different inflammatory myopathies. **Hum Pathol.** 17(7): 704-21, 1986.

- Facchiano A, De Marchis F, Turchetti E, Facchiano F, Guglielmi M, Denaro A, Palumbo R, Scoccianti M, Capogrossi MC. The chemotactic and mitogenic effects of platelet-derived growth factor-BB on rat aorta smooth muscle cells are inhibited by basic fibroblast growth factor. **J Cell Sci.** 113(Pt16): 2855-63, 2000.
- Fukuhara S, Sako K, Noda K, Zhang J, Minami M, Mochizuki N. Angiopoietin-1/Tie2 receptor signaling in vascular quiescence and angiogenesis. **Histol Histopathol.** 25(3): 387-96, 2010.
- Gao X, Xu Z. Mechanisms of action of angiogenin. **Acta Biochim Biophys Sin.** 40(7): 619-24, 2008.
- Gravallese EM, Pettit AR, Lee R, Madore R, Manning C, Tsay A, Gaspar J, Goldring MB, Godring SR, Oettgen P. Angiopoietin-1 is expressed in the synovium of patients with rheumatoid arthritis and is induced by tumor necrosis factor alpha. **Ann Rheum Dis.** 62(2): 100-7, 2003.
- Grundtman C, Tham E, Ulfgren AK, Lundberg IE. Vascular endothelial growth factor is highly expressed in muscle tissue of patients with polymyositis and patients with dermatomyositis. **Arthritis Rheum.** 58(10): 3224-38, 2008.
- Gustafsson T, Knutsson A, Puntchart A, Laijser I, Nordqvist AC, Sundberg CJ, Jansson E. Increased expression of vascular endothelial growth factor in human skeletal muscle in response to short-term one-legged exercise training. **Pflugers Arch.** 444(6): 752-9, 2002.
- Guthridge M, Wilson M, Cowlin J, Bertolini J, Heam MT. The role of basic fibroblast growth factor in skeletal muscle regeneration. **Growth Factors.** 6(1): 53-63, 1992.
- Heldin CH. Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment. **Cell Commun Signal.** 11: 97, 2013.
- Holland EC, Varmus HE. Basic fibroblast growth factor induces cell migration and proliferation after glia-specific gene transfer in mice. **Proc Nat Acad Sci U S A.** 95(3): 1218-23, 1998.
- Hossain WA, Morest DK. Fibroblast growth factors (FGF-1, FGF-2) promote migration and neurite growth of mouse cochlear ganglion cells in vitro: immunohistochemistry and antibody perturbation." **J Neurosci Res.** v. 62. n. 1. p. 40-55, 2000.
- Hu GF, Riordan JF. Angiogenin enhances actin acceleration of plasminogen activation. **Biochem Biophys Res Commun.** 197(2): 682-7, 1993.

- Isenberg DA, Allen E, Farewell V, Ehrenstein MR, Hanna MG, Lundberg IE, Oddis C, Pilkington C, Plotz P, Scott D, Vencovsky J, Cooper R, Rider L, Miller F; International Myositis and Clinical Studies Group (IMACS). International Myositis and Clinical Studies Group (IMACS). International consensus outcome measures for patients with idiopathic inflammatory myopathies. Development and initial validation of myositis activity and damage indices in patients with adult onset disease. ***Rheumatology (Oxford)***. 43(1): 49-54, 2004.
- Ishikawa A, Okada J, Nishi K, Hirohata S. Efficacy of serum angiopoietin-1 measurement in the diagnosis of early rheumatoid arthritis. ***Clin Exp Rheumatol***. 29(4): 604-8, 2011.
- Kadono T, Kikuchi K, Kubo M, Fujimoto M, Tamaki K. Serum concentrations of basic fibroblast growth factor in collagen diseases. ***J Am Acad Dermatol***. 35(3): 392-7, 1996.
- Kameda H, Suzuki M, Takeuchi T. Platelet-Derived Growth Factor as a therapeutic target for systemic autoimmune diseases. ***Drug Target Insights***. 2: 239-47, 2007.
- Kikuchi K, Kubo M, Kadono T, Yazawa N, Ihn H, Tamaki, K. Serum concentrations of vascular endothelial growth factor in collagen diseases. ***Br J Dermatol***. 139(6): 1049-51, 1998.
- Kim I, Moon SO, Park SK, Chae SW, Koh GY. Angiopoietin-1 reduces VEGF-stimulated leukocyte adhesion to endothelial cells by reducing ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression. ***Circ Res***. 89(6): 477-9, 2001.
- Kimura YN, Watari K, Fotovati A, Hosoi F, Yasumoto K, Izumi H, Kohno K, Umezawa K, Iguchi H, Shirouzu K, Takamori S, Kuwano N, Ono M. Inflammatory stimuli from macrophages and cancer cells synergistically promote tumor growth and angiogenesis. ***Cancer Sci***. 98(12): 2009-18, 2007.
- Koch AE. Angiogenesis: implications for rheumatoid arthritis [review]. ***Arthritis Rheum***. 41(6): 951-62, 1998.
- Koller RA, Montemarano A. Dermatomyositis. ***Am Fam Physician***. 64(9): 1565-72, 2001.
- Kuwahara A. Angiogenin expression in the sera and skin of patients with rheumatic diseases. ***Biosci Trends***. 6(5): 229-33, 2012.
- Lefaucheur JP, Sebillle A. Basic fibroblast growth factor promotes in vivo muscle regeneration in murine muscular dystrophy. ***Neurosci Lett***. 202(1-2): 121-4, 1995.

- Lioté F, Champy R, Moenner M, Boval-Boizard B, Badet J. Elevated angiogenin levels in synovial fluid from patients with inflammatory arthritis and secretion of angiogenin by cultured synovial fibroblasts. ***Clin Exp Immunol***. 132(1): 163-8, 2003.
- Lyons RM, Gentry LE, Purchio AF, Moses HL. Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor β 1 by plasmin. ***J Cell Biol***. 110(4): 1361-7, 1990.
- Mielnik P, Chwalinska-Sadowska H, Wiesik-Szewczyk E, Maslinski W, Olesinska M. Serum concentration of interleukin 15, interleukin 2 receptor and TNF receptor in patients with polymyositis and dermatomyositis: correlation to disease activity. ***Rheumatol Int***. 32(3): 639-43, 2012.
- Moenner M, Gusse M, Hatzi E, Badet J. The widespread expression of angiogenin in different human cells suggests a biological function not only related to angiogenesis. ***Eur J Biochem***. 226(2): 483-90, 1994.
- Mohle R, Green D, Moore MA, Nachman RL, Rafii S. Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. ***Proc Natl Acad Sci U S A***. 94(2): 663-8, 1997.
- Murphy M, Drago J, Bartlett PF. Fibroblast growth factor stimulates the proliferation and differentiation of neural precursor cells in vitro. ***J Neurosci Res***. 25(4): 463-75, 1990.
- Noss EH, Hausner-Sypek DL, Weinblatt M. Rituximab as therapy for refractory polymyositis and dermatomyositis. ***J Rheumatol***. 33(5): 1021-6, 2006.
- Olfert MI, Sun D, Reyes-Reyna SM, Waite LL, Michalek JE, McManus LM, Shireman PK. Muscle-specific VEGF deficiency greatly reduces exercise endurance in mice. ***J Physiol***. 587(8): 1755-67, 2009.
- Olsen NJ, Park JH. MRS and NIRS for muscle disease evaluation [review]. ***Bull Rheum Dis***. 44(5): 4-7, 1995.
- Olsen NJ, Park JH. Inflammatory myopathies: issues in diagnosis and management [review]. ***Arthritis Care Res***. 10(3): 200-7, 1997.
- Ostendorf T, Boor P, Van Roeven CR, Floege J Platelet-derived growth factors (PDGFs) in glomerular and tubulointerstitial fibrosis. ***Kidney Int Suppl***. 4(1): 65-69, 2014.

- Park MC, Chung SJ, Park YB, Lee SK. Relationship of angiogenic factors to disease activity and radiographic damage in rheumatoid arthritis. ***Clin Exp Rheumatol***. 26(5): 881-6, 2008.
- Pestronk A, Schmidt RE, Choksi R. Vascular pathology in dermatomyositis and anatomic relations to myopathology. ***Muscle Nerve***. 42(1): 53-61, 2010.
- Peters KG, Marie J, Wilson E, Ives HE, Escobedo J, Del Rosario M, Mirda D, Williams LT. Point mutation of an FGF receptor abolishes phosphatidylinositol turnover and Ca^{2+} flux but not myogenesis. ***Nature***. 358(6388): 678-81, 1992.
- Rider LG, Feldman BM, Perez MD, Rennebohm RM, Lindsley CB, Zemel LS, et al. Development of validated disease activity and damage indices for the juvenile idiopathic inflammatory myopathies: I. Physician, parent, and patient global assessments. Juvenile Dermatomyositis Disease Activity Collaborative Study Group. ***Arthritis Rheum***. 40(11): 1976-83, 1997.
- Rider LG, Giannini EH, Harris-Love M, Joe G, Isenberg D, Pilkington C, Lachenbruch PA, Miller FW; International Myositis Assessment and Clinical Studies Group. International Myositis Assessment and Clinical Studies Group. Defining Clinical Improvement in Adult and Juvenile Myositis. ***J Rheumatol***. 30(3): 603-17, 2003.
- Rider LG, Koziol D, Gannini EH, Jain MS, Smith MR, Whitney-Mahoney K, Feldman BM, Wright SJ, Lindsley CB, Pachman LM, Villalba ML, Lovell DJ, Bowyer SL, Plotz PH, Miller FW, Hicks JE. Validation of manual muscle testing and a subset of eight muscles for adult and juvenile idiopathic inflammatory myopathies. ***Arthritis Care Res***. 62(4): 465-72, 2010.
- Ryan NA, Zwetsloot KA, Westerkamp LM, Hickner RC, Pofahl WE, Gavin TP. Lower skeletal muscle capillarization and VEGF expression in aged vs. young men. ***J Applied Physiol***. 100(1): 178-85, 2006.
- Rybak SM, Fett JW, Yao QZ, Vallee BL. Angiogenin mRNA in human tumor and normal cells. ***Biochem Biophys Res Commun***. 146(3): 1240-8, 1987.
- Schollmann C, Grugel R, Tatje D, Hoppe J, Folkman J, Marmé D, Weich HA. Basic fibroblast growth factor modulates the mytogenic potency of the platelet-derived growth factor (PDGF) isoforms by specific upregulation of the PDGF alpha receptor in vascular smooth muscle cells. ***J Biol Chem***. 267(25): 18032-9, 1992.

- Shapiro R, Strydom DJ, Olson KA, Vallee BL. Isolation of angiogenin from normal human plasma. **Biochemistry**. 26(16): 5141-6, 1987.
- Shimizu T, Tomita Y, Son K, Nishinarita S, Sawada S, Horie T. Elevation of serum soluble tumor necrosis factor receptors in patients with polymyositis and dermatomyositis. **Clin Rheumatol**. 19(5): 352-9, 2000.
- Shimoyama S, Yamasaki K, Kawahara M, Kaminishi M. Increased angiogenin expression in pancreatic cancer is related to cancer aggressiveness. **Cancer Res**. 56(5): 2703-6, 1996.
- Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PCC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Requisite role of angiopoietin-1: a ligand for the TIE2 receptor. during embryonic angiogenesis. **Cell**. 87(7): 1171-80, 1996.
- Tengood JE, Ridenour R, Brodsky R, Russell AJ, Little SR. Sequential Delivery of Basic Fibroblast Growth Factor and Platelet-Derived Growth Factor for angiogenesis. **Tissue Eng Part A**. 7(9): 1181-9, 2011.
- Thomas JW, Thieu TH, Byrd VM, Miller GG. Acidic Fibroblast growth factor in synovial cells. **Arthritis Rheum**. 43(10): 2152-9, 2000.
- Volpi N, Pecorelli A, Lorenzoni P, Di Lazzaro F, Belmonte G, Aglianò M, Cantarini L, Giannini F, Grasso G, Valacchi G. Antiangiogenic VEGF isoform in inflammatory myopathies. **Mediators Inflamm**. 2013: 1-10, 2013.
- Wei N, Chen Z, Xue Z, Zhu Y. Polymorphism of VEGF gene in susceptibility to chronic immune-mediated inflammatory diseases: a meta-analysis. **Rheumatol Int**. 35(8): 1351-60, 2015.
- Yablonka-Reuveni Z, Seger R, Rivera AJ. Fibroblast growth factor promotes recruitment of skeletal muscle satellite cells in young and old rats. **J Histochem Cytochem**. 47(1): 23-42, 1999.
- Yuan Q, Sun L, Li JJ, An CH. Elevated VEGF levels contribute to the pathogenesis of osteoarthritis. **BCM Musculoskelet Disord**. 15: 437, 2014.
- Yun YR, Won JE, Jeon E, Lee S, Kang W, Jo H, Jang JH, Shin US, Kim HW. Fibroblast growth factors: biology, function and application for tissue regeneration. **J Tissue Eng**. 2010: 1-18, 2010.

Anexos

ANEXO A

Questionários da atividade da doença (dermatomiosite)

International Myositis Assessment and Clinical Studies Group (IMACS)

A) Escala visual analógica (EVA) do paciente

Pontuação: 0 - 10 cm

B) Escala visual analógica (EVA) do médico

Pontuação: 0 - 10 cm

C) MMT (Muscle Manual testing)

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

- Valor total de 0 à 80

Flexão cervical	_____
Deltoide	_____
Biceps braquial	_____
Gluteo máximo	_____
Gluteo médio	_____
Quadríceps	_____
Extensor do punho	_____
Dorsiflexão plantar	_____

D) HAQ (Health Assessment Questionnaire)

- Pontuação 0,00 à 3,00

Capacidade habitual DURANTE A SEMANA PASSADA

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

E) Enzimas musculares

Creatinofosfoquinase

Aldolase

aspartato aminotransferase

alanina aminotransferase

desidrogenase láctica

F) Myositis Disease Activity Assessment Visual Analogue Scales (MYOACT)

Pontuação total: 0 - 60

Referência: nas últimas 4 semanas

Escala visual analógica referente a:

Sintomas constitucionais (0 - 10 cm)

Acometimento cutâneo (0 - 10 cm)

Acometimento esquelético (0 - 10 cm)

Acometimento cardíaco (0 - 10 cm)

Acometimento pulmonar (0 - 10 cm)

Acometimento do trato gastrointestinal (0 - 10 cm)